

ÖZLEM OYARDI

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL.
ENST.**

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**CERAGENİNLER VE ANTİMİKROBİYAL
PEPTİDLERİN İNSAN HAVAYOLU EPİTEL HÜCRESİ
ÜZERİNDE OLUŞTURULAN PSEUDOMONAS
AERUGINOSA BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

ÖZLEM OYARDI

**DANIŞMAN
PROF.DR. ÇAĞLA BOZKURT GÜZEL**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Kedilerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim boyunca bana çok güzel fırsatlar veren, her zaman yanımda olan, pozitif konuşmalarıyla beni cesaretlendiren, tüm süreçte çok büyük emekleri için çok değerli danışman hocam Prof.Dr. Çağla BOZKURT GÜZEL'e,

Her zaman güler yüzlü, motive edici konuşmalarıyla daima yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli hocalarım Prof.Dr. Berna ÖZBEK ÇELİK, Prof.Dr. Seher BİRTEKSÖZ TAN ve Prof.Dr. Sibel DÖŞLER'e ve Kimyager Emine TUNCER'e,

Doktora programına başlayabilmem ve ilerleyebilmemde yardımları için sayın hocalarım Prof.Dr. Gülten ÖTÜK ve Prof.Dr. A. Alev GERÇEKER'e,

Doktora eğitimim süresince her zorlukta yanımda olan arkadaşlarım Doç.Dr. Emel MATARACI KARA, Dr.Öğr. Üyesi Mayram HACIOĞLU ve Arş. Gör. Fatıma Nur YILMAZ'a ve tüm doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Her zaman destekçilerim sevgili aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Genel Özellikleri.....	4
2.2. Antibiyotik Direnci.....	4
2.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri.....	6
2.3.1. Biyofilm Oluşumu	8
2.4. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilminin Klinik Önemi.....	12
2.5. Kistik Fibrozis	13
2.6. <i>P. aeruginosa</i> Biyofilm Enfeksiyonlarında Tedavi.....	15
2.7. Biyofilm Modelleri.....	17
2.8. Hücre Kültürü.....	21
2.8.1. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması	21
2.8.2. A549 Hücre Hattı	22
2.8.3. Sitotoksosite ve Hücre Canlılık Deneyleri	23
2.9. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler	28
2.9.1. Antimikrobiyal Peptidler	28
2.9.1.1. AMP'lerin Etki Mekanizması	28
2.9.1.2. Magainin	28
2.9.1.3. Cecropin	29
2.9.1.4. LL-37.....	31
2.9.2. Cerageninler	33
2.9.2.1. Cerageninlerin Kimyasal Yapısı ve Sentezi.....	33
2.9.2.2. Cerageninlerin Etki Mekanizması.....	35

2.9.2.3. Cerageninler ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	36
2.9.3. AMP'ler ve Cerageninlerle İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler	39
3.2. Antimikrobiyal Maddelerin Hazırlanması.....	39
3.3. Bakteri Suşu ve Kültür Koşulları	39
3.4. Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) Tespiti.....	40
3.5. Hücre Kültürü.....	40
3.5.1. Besiyerinin Hazırlanması	41
3.5.2. Hücrelerin Çözünmesi.....	41
3.5.3. Hücrelerin Çoğaltılması	41
3.5.4. Alt kültürlenme.....	41
3.5.5. Hücrelerin Dondurulması	42
3.6. Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	42
3.7. Hücre İçi Bakteri İnhibisyonunun Belirlenmesi.....	43
3.8. Cerageninler ve AMP'lerin Statik Ko-kültür Üzerine Etkileri.....	44
3.9. Ko-kültürün Sitotoksositeye Etkisi	45
3.10. Floresan Mikroskobu ile Görüntüleme.....	45
3.11. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. MİK ve MBK Sonuçlarına Ait Bulgular	47
4.2. Sitotoksosite Sonuçlarına Ait Bulgular	48
4.3. Hücre İçi Bakteri İnhibisyonuna Ait Bulgular	52
4.4. Biyofilm Oluşumun Engellenmesine Ait Bulgular	53
4.5. Floresan Mikroskobu Görüntüleri	57
4.6. LDH Deneyine Ait Bulgular	59
5. TARTIŞMA	62
KAYNAKLAR	72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	86

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Cerageninlerin ve AMP'lerin <i>P. aeruginosa</i> -GFP suşuna karşı MİK ve MBK değerleri (µg/ml)	47
Tablo 4-2: Cerageninlerin ve AMP'lerin A549 hücreğine karşı MTT yöntemi ile belirlenen IC ₅₀ (µg/ml) değerleri	48



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>P. aeruginosa</i> virülans faktörleri.....	8
Şekil 2-2: Biyofilm oluşumu.....	12
Şekil 2-3: A549 hücre hattı görünümü	23
Şekil 2-4: Tripan mavisinin kimyasal formülü	24
Şekil 2-5: MTT ve deney sonucu oluşan formazanın formülü	24
Şekil 2-6: XTT ve deney sonucu oluşan formazanın formülü.....	25
Şekil 2-7: Nötral kırmızısı kimyasal formülü	25
Şekil 2-8: LDH deneyinin prensibi.....	26
Şekil 2-9: Resazur ve resofurinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2-10: ATP biyoluminesans deneyi prensibi.....	27
Şekil 2-11: Magainin II kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2-12: Cecropin A kimyasal yapısı	31
Şekil 2-13: LL-37 kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2-14: Kolik asidin kimyasal yapısı	34
Şekil 2-15: Çalışmada kullanılan cerageninlerin kimyasal yapıları	35
Şekil 2-16: Pluronik F127 kimyasal yapısı.....	36
Şekil 4-1: Cerageninlerin A549 hücre hattına sitotoksiteleri.....	51
Şekil 4-2: AMP'lerin A549 hücre hattına sitotoksiteleri	52
Şekil 4-3: Cerageninlerin hücre içi <i>P. aeruginosa</i> 'ya etkisi	53
Şekil 4-4: AMP'lerin hücre içi <i>P. aeruginosa</i> 'ya etkisi	53
Şekil 4-5: Cerageninlerin A549 hücre üzerinde <i>P. aeruginosa</i> biyofilmi oluşumu üzerine etkileri	56
Şekil 4-6: AMP'lerin A549 hücre üzerinde <i>P. aeruginosa</i> biyofilmi oluşumu üzerine etkileri	57
Şekil 4-7: CSA-13'ün ko-kültüre etkisinin floresan mikroskobu görüntüleri.	58

Şekil 4-8: Cerageninlerin ko-kültüre sitotoksik etkileri 61

Şekil 4-9: AMP'lerin ko-kültüre sitotoksik etkileri..... 61



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMP: Antimikrobiyal Peptid
CSA: Katyonik Steroid Antimikrobiyal
CSA-131P: CSA-131-Poloksamer
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
WHO: World Health Organization
FDA: Food and Drug Administration
KF: Kistik Fibrozis
CFTR: Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Düzenleyici
GFP: Green Fluorescent Protein
MTT: 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide
LDH: Laktat Dehidrogenaz
ÇİD: Çoklu İlaça Dirençli
Ears-Net: Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağ
ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
UAMDSS: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi
THSK: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
CAESAR: Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç
T1SS: Tip 1 sekresyon sistemi
QS: Quorum Sensing
EPS: Ekzopolisakkarit
DNA: Deoksiribo nükleik asit
eDNA: Ekstraselüler DNA
RNA: Ribonükleik asit
sRNA: Small RNA
ECFS: European Cystic Fibrosis Society
UKKS: Ulusal Kistik Fibrozis Hasta Kayıt Sistemi
NIH: ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü
RSV: Solunum Sinsitiyal Virüsü
CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

XTT: (sodyum 3 ' - [1 - [(fenilamino) -karboni] -3,4-tetrazolyum] -bis (4-metoksi-6-nitro) benzen-sülfonik asit hidrat)

CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri

CFBE: KF Bronşiyal Epitelyal Hücre Hattı

RDW: Döner Duvarlı Biyoreaktör

ATP: Adenozin Trifosfat

DMSO: Dimetil Sülfoksit

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

FADH: Flavin Adenin Dinükleotit

FMNH: Flavin Mononükleotit

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

HaCaT: İnsan Keratinosit Hücre Hattı

CAMA: Cecropin-melittin

UPEC: Üropatojenik *Escherichia coli*

LPS: Lipopolisakkarit

Pluronic® F127: 2,3-bis- [2-metoksi-4-nitro-5-sülffeni]-2H-tetrazolium-5-karboksanilid ve menadion

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

TSA: Triptik Soy Agar

MHB: Mueller Hinton Buyyonu

MBK: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: Fetal Bovine Serum

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

PBS: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su

IC₅₀: Hücrelerin % 50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon

MOI: Multiplicity of Infection

KOB: Koloni Oluşturan Birim

ÖZET

Oyardı, Ö. (2021). Cerageninler ve Antimikrobiyal Peptidlerin İnsan Havayolu Epitel Hücresi Üzerinde Oluşturulan *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmi Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi, İstanbul.

Pseudomonas aeruginosa, özellikle kistik fibrozis (KF) hastalarının akciğerlerindeki kronik enfeksiyonlar sırasında konak dokular ve epitelyal yüzeylerde biyofilm oluşturabilen önemli bir patojendir. *P. aeruginosa*'nın uzun süre akciğerlerde kolonizasyonu, anormal havayolu epiteline sahip KF'li kişilerde mortalite ve morbiditenin en birincil nedenidir. Antimikrobiyal peptidler (AMP) ve AMP'ler ile aynı antimikrobiyal mekanizmalar aracılığıyla etki gösteren ve sentetik türevleri olarak tasarlanan cerageninler yeni nesil antimikrobiyal moleküllerdir. Bu çalışmada, cerageninler ve AMP'ler ile oluşturulan bir ko-kültür enfeksiyon modeline olan etkisi incelenmiştir. Çalışmada cerageninlerden CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131-poloksamer (CSA-131P), CSA-138, CSA-142, CSA-144 ve CSA-192; AMP'lerden ise cecropin, magainin ve LL-37 kullanılmıştır. Bu ajanların *P. aeruginosa* planktonik hücrelerine olan antimikrobiyal etkileri belirlendikten sonra, insan akciğer epitel hücre hattı olan A549 üzerine olan sitotoksiteleri de MTT testi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattı *P. aeruginosa* ile enfekte edilerek antimikrobiyallerin hem hücre içi bakterilere olan etkisi incelenmiş hem de hücre hattı üzerine *P. aeruginosa*'nın adezyon ve biyofilm oluşumunu inhibe etme etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bakteriyel enfeksiyon oluşumunun ve antimikrobiyal madde kullanımının hücreler üzerine olan sitotoksitesini anlamak için laktat dehidrogenaz (LDH) deneyi yapılarak, hücrelerden LDH salınımı belirlenmiştir. Tespit edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) sonuçlarına göre, antimikrobiyal etkinliği en yüksek ajan CSA-131 olarak belirlenirken, AMP'lerin antimikrobiyal etkisinin cerageninlerden çok daha düşük olduğu saptanmıştır. En düşük IC50 değerine sahip olan ceragenin, CSA-131'in pluronik F127 ile kombinasyonu olarak belirlenmiştir. CSA-13 hem hücre içi bakterilere etkili olması hem de biyofilm oluşumunu inhibe etme özelliği ile en etkili antimikrobiyal madde olarak saptanmıştır. CSA-13'ün sitotoksitesinin azaltılması amacıyla çeşitli kombinasyonları yapılarak ileri çalışmalarla devam edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cerageninler, Antimikrobiyal peptidler, *Pseudomonas aeruginosa*, Kistik fibroz, Hücre Kültürü

Bu çalışma, Tübitak tarafından desteklenmiştir. Proje No: 119S353

ABSTRACT

Oyardi, O. (2021). Effects of Ceragenins and Antimicrobial Peptides on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formed on Human Airway Epithelial Cell. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Microbiology PhD Thesis, İstanbul.

Pseudomonas aeruginosa is an important pathogen that can form biofilms in host tissues and epithelial surfaces, especially during chronic infections such as cystic fibrosis (CF) lung. Long-term colonization of *P. aeruginosa* in the lungs is the primary cause of mortality and morbidity in people with CF with abnormal airway epithelium. Antimicrobial peptides (AMP) and ceragenins, which act through the same antimicrobial mechanisms as AMPs and designed as synthetic derivatives of AMPs, are the new generation antimicrobial molecules. The effects of ceragenins and AMP were investigated in a co-culture infection model. In this study, CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131-poloxamer (CSA-131P), CSA-138, CSA-142, CSA-144 and CSA-192 as ceragenins and, cecropin, magainin and LL-37 as AMPs were used. After determining the antimicrobial effects of the substances on *P. aeruginosa* planktonic cells, their cytotoxicity on the A549 cell line was also determined by MTT test. After A549 cell line was infected with *P. aeruginosa*, the effect of antimicrobials on intracellular bacteria as well as the effects in inhibiting adhesion and biofilm formation of *P. aeruginosa* were investigated. In addition, Lactate dehydrogenase (LDH) release from cells was determined by performing an LDH experiment to understand the cytotoxicity of bacterial infection and antimicrobial treatment on cells. According to the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) results, CSA-131 was determined as the antimicrobial agent with the highest antimicrobial activity, while the antimicrobial effects of AMPs were found to be much lower than that of ceragenins. The ceragenin with the lowest IC₅₀ value was determined as the combination of CSA-131 with pluronic F127. CSA-13 has been determined to be the most effective antimicrobial with its effectiveness to both intracellular bacteria and biofilm formation. Further studies should be continued by making various combinations of CSA-13 in order to reduce its cytotoxicity.

Key Words: Ceragenins, Antimicrobial peptids, *Pseudomonas aeruginosa*, Cystic fibrosis, Cell culture

The present work was supported by Tubitak. Project No. 119S353

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antimikrobiyal maddeler, hastalıklardan korunmada ve tedavide yer aldıkları ilk dönemden günümüze kadar tıbbi ilerlemelere ve sağlık sisteminin sürdürülebilirliğine önemli katkı sağlamışlardır. Bununla birlikte, antimikrobiyallerin yaygın ve yanlış kullanımının beraberinde getirdiği antimikrobiyal direnci, her geçen gün hastalıkları tedavi etme yeteneğimizi kısıtlamaktadır ve bu sorun önemli bir küresel krize dönüşmektedir. Özellikle, hastane kaynaklı enfeksiyon hastalıkları etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa*, gerek doğal ve kazanılmış antimikrobiyal direnci, gerekse de biyofilm oluşumu gibi virülans faktörlerine sahip olması nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (World Health Organization-WHO) tarafından belirlenen öncelikli patojenler listesinde (WHO 2017). Bu nedenle, yeni antimikrobiyallerin keşfi ile ilgili çalışmalar çok önemlidir. Fakat çok sayıda çalışma yürütülmekle birlikte, az sayıda yeni antimikrobiyal madde klinik kullanıma girmektedir.

Cerageninler ve antimikrobiyal peptidler (AMP), iki yeni antimikrobiyal madde sınıfı olma potansiyeline sahip aday antimikrobiyal moleküller olup, günümüzde etkinlikleri ve güvenilirlikleri ile ilgili yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. AMP'ler, prokaryotlardan insanlara kadar değişen organizmalarda bulunan, patojenlerin vücuda girmesini takiben ilk basamak savunma hattında görev alan biyoaktif küçük moleküllerdir. Doğal olarak ciltte, solunum yollarında, gastrointestinal sistemde, idrar ve üreme yollarında bulunurlar ve patojenlere maruz kalan dokularda yüksek AMP konsantrasyonlarına rastlanabilmektedir. İmmün sistemi aktive etmek, inflamasyon mekanizmalarını kontrol etmek ve bakteri hücre membranını parçalamak gibi mekanizmalarla antimikrobiyal etkinlik göstermektedirler ve bu nedenle geniş spektrumludurlar ve hızlı etki gösterirler. İlk AMP'nin 1920'li yıllarda keşfedilmesinden bu yana, birçok peptid elde edilmiştir. Özellikle antimikrobiyal direncin yaygınlaşmasını takiben bilim insanlarının tekrar dikkatini çekmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Bazı AMP'ler klinik çalışmalara dâhil edilmiş, çok sayıda peptid bazlı ilaç Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından çeşitli hastalıkların tedavisi için onaylanmış veya onaylanmayı beklemektedir (Magana ve ark. 2020; Mercer ve ark. 2020). AMP'lerin geniş spektrumlu ve immün sistemi düzenleyici etkide olmaları gibi

avantajları bulunmakla birlikte, klinik kullanımlarını sınırlandıran dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan bazıları yüksek ölçekte üretilmelerinin çok maliyetli olması ve bakteriler tarafından salınan proteazlar tarafından parçalanabilme potansiyelleridir (Hashemi, Holden, Taylor ve ark. 2018). Ayrıca toksisite ve immünojenisite, ilaç direnci, hemolitik aktivite ve diğer yan etkiler gibi klinik uygulamalarda karşılaşılabilecek sorunlar ve endişeler bulunmaktadır. Bu gibi dezavantajların üstesinden gelmek adına AMP'lerin peptid yapıda olmayan sentetik türevleri geliştirilmiştir. Cerageninler adı verilen bu yeni antimikrobiyal sınıfı, safra asidinin çok sayıda farklı türevi olarak sentezlenmiştir. AMP'ler ile aynı etki mekanizmasına sahip olup, çoğu mikroorganizmaya karşı geniş spektrumlu etki göstermektedirler. AMP'lerden farklı olarak -üretimlerinin daha kolay olması, proteazlardan etkilenmemeleri gibi özelliklerinden dolayı- büyük çapta üretimleri ve olası klinik kullanımları daha kolaydır (Hashemi, Holden, Taylor ve ark. 2018).

Kistik fibrozis (KF), kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (cystic fibrosis transmembrane regulatory-CFTR) proteinini kodlayan 7. kromozom üzerindeki CFTR genindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal ve ölümcül bir hastalıktır. Bu protein, solunum yolu, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas ve erkek üreme sistemi dâhil olmak üzere vücudun çeşitli organlarında bulunur. Solunum yollarında, bu proteinin işlev bozukluğu, mukosilyer sistem tarafından temizlenemeyen mukus kalınlığının artmasına neden olur. Bu da solunum yollarında kronik enfeksiyona ve ardından da düzensiz iltihaplanmaya yol açabilmektedir (Blanchard ve Waters 2019). KF akciğeri, antimikrobiyal maddelerle tedaviye zayıf yanıt veren kronik bir inflamasyona sahiptir. KF hastalarının solunum yollarında baskın patojenlerden biri *P. aeruginosa*'dır ve özellikle hastane kaynaklı bir enfeksiyon ajanı olması hastaların hastane ve kliniklerden dolayı enfekte olmasına neden olmaktadır (Blanchard ve Waters 2019; Moreau-Marquis, Stanton ve ark. 2008). KF havayollarında meydana gelen *P. aeruginosa* biyofilmi nedeni ile mevcut antibiyotik rejimleri yetersiz kalmakta ve bu durum hastalarda prognozunu kötüleşmesine, solunum yetmezliğine ve ölüme neden olabilmektedir. *P. aeruginosa*'nın KF akciğerlerinde biyofilm yapabilme yeteneğinin, KF akciğerlerinde düşük oksijen ortamı sağlayan mukus tabakasının fazla sekresyonu ve nötrofillerin nekrozu ile ortaya çıkan deoksiribo nükleik asit (DNA) ve aktin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Moreau-Marquis, Stanton ve ark. 2008). Biyofilme neden olan bakteriler ve oluşturdıkları kompleks biyofilm yapıları,

antibiyotiklere ve vücudun doğal savunma mekanizmalarına çok daha dirençlidirler. Bu nedenle, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu KF akciğer enfeksiyonu olgularında tedavi başarısızlığı yüksektir ve yeni, etkili antibiyotiklerin tedavi rejimine girmesi gerekmektedir.

In vitro biyofilm çalışmaları cam veya propilen gibi cansız yüzeylere mikroorganizmaların yapışması prensibine dayanarak yürütülmektedir. Fakat KF gibi hastalıklarda mikroorganizmalar canlı dokular üzerine yapışarak biyofilm oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar patojen ile konakçı arasındaki etkileşimden bağımsız olarak yürütülmektedir. Bu çalışma kapsamında bir insan havayolu epitel hücre hattı olan A549 (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu-ATCC® CCL-185™) üzerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu incelenmiştir. Bu biyofilm oluşumuna cerageninlerin ve AMP'lerin etkisi araştırılmış ve bu antimikrobiyallerin sadece mikroorganizmaya karşı değil aynı zamanda canlı insan hücresine olan etkileşimi de incelenebilmiştir. Bu kapsamda, çalışmada kullanılan antimikrobiyallerin *P. aeruginosa*-Green fluorescent protein (GFP) (ATCC® 10145GFP™)'e karşı antimikrobiyal etkisi belirlendikten sonra, A549 hücresine karşı sitotoksitesi de MTT [3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] yöntemi ile belirlenmiştir. Patojen ve hücrenin bir arada oluşturduğu ko-kültüre karşı antimikrobiyallerin etkinlikleri test edilmiş ve tedavi rejiminin hücre üzerine sitotoksik etkisi laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksitesi testi ile incelenmiştir. Kullanılan *P. aeruginosa*-GFP suşunun floresan özelliğinden yararlanılarak floresan mikroskobu (Olympus cxx4) ile oluşan biyofilm ve tedavinin etkinliği görüntülenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *P. aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

P. aeruginosa, *Pseudomonadaceae* ailesine ait, aerobik, spor üretmeyen, yaklaşık 1-5 µm uzunluğunda, 0,5-1,0 µm genişliğinde Gram negatif bir basildir. Tek taraflı flagellası sayesinde hareketli bir mikroorganizmadır (Azam ve Khan 2019; Diggle ve Whiteley 2020). Toprak ve suda doğal olarak bulunmakla birlikte, bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi canlı kaynaklarda da kolonize olabilir (Botelho ve ark. 2019; Klockgether ve Tummler 2017). Yaklaşık 37°C sıcaklıklarda iyi büyümekle birlikte, 4–42°C arasında değişen sıcaklıklarda hayatta kalabilir. Toprakta polisiklik aromatik karbonları parçalayabilir. Bununla birlikte, özellikle insan ve hayvanlar tarafından kirletilen kanalizasyon suları, hastane atık suları gibi sularda sıklıkla tespit edilebilmektedir (Diggle ve Whiteley 2020).

P. aeruginosa insanlarda lokal veya sistemik enfeksiyonlar yapabildiği gibi, hayatı tehdit eden akut ve kronik enfeksiyonlara da neden olabilen fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu hastalıklar arasında, idrar yolu enfeksiyonları, yara ve yanık enfeksiyonları, folikülit gibi deri enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar, bakteriyemi, KF'li hastalarda solunum yolu enfeksiyonları sayılabilir (Botelho ve ark. 2019; Azam ve Khan 2019). Ayrıca önemli bir hastane enfeksiyon etkenidir. Bu nedenle ventilatör ilişkili hastane kökenli pnömoninin başlıca nedenlerinden biridir. Hastane enfeksiyon etkenlerinden biri olduğu ve antimikrobiyal maddelerin etkilerinden kaçabildiği için yani yüksek direnç geliştirme potansiyeli ve virülans özellikleri nedeniyle ESKAPE grubu bakteriler içerisinde dahil edilmiştir. Bu grupta hastane enfeksiyonu etkenlerinden *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri bulunmaktadır (Botelho ve ark. 2019; Mulani ve ark. 2019).

2.2. Antibiyotik Direnci

P. aeruginosa diğer bakteriler ile karşılaştırıldığında göreceli olarak daha büyük bir genom (5,5–7 Mbp) yapısına sahiptir ve önemli sayıda genler, organik bileşiklerin metabolizması, taşınması, hücre içine alımı ve hücre dışına atılması gibi önemli düzenleyici proteinleri kodlamaktadır. Bu geniş kodlama kapasitesi çeşitli çevresel

streslere karşı tepki verebilme yeteneği kazandırmaktadır (Hwang ve Yoon 2019; Pang ve ark. 2019). *P. aeruginosa*'nın kısıtlı dış zar geçirgenliği, antibiyotikleri hücreden dışarı pompalayan dışarı atım pompaları ve β -laktamazlar gibi antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerin üretimi yoluyla çoğu antibiyotiğe karşı yüksek düzeyde doğal dirence sahip olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın porin yapısındaki farklılıklar nedeniyle dış zar geçirgenliği oldukça kısıtlıdır. *Escherichia coli*'den 12 ila 100 kat daha az geçirgen olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hücre içine girerek etkinlik gösteren aminoglikozitler, kinolonlar gibi antibiyotiklerin geçirgenliğinin azalmasına ve direnç gelişimine neden olmaktadır. Ayrıca, yapısında bulunan dışarı atım pompaları antibiyotiklerin hücre dışına atılmasına neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu doğal direncin en önemli sebeplerinden biri de β -laktamazlar ve aminoglikozit-modifiye edici enzimler gibi antibiyotikleri modifiye ya da inaktive eden enzimlere sahip olmasıdır. Doğal direncin yanı sıra *P. aeruginosa* mutasyonlar veya gen transferi yolu ile kazanılmış antibiyotik direnci de gösterebilmektedir (Pang ve ark. 2019).

P. aeruginosa suşları üç ya da daha fazla antimikrobiyal grup içerisinde her birinden en az bir ilaca dirençli ise çoklu ilaca dirençli (ÇİD), en fazla 2 antibiyotik grubunda bir ya da daha fazla ilaca dirençli ise genişlemiş ilaç dirençli, tüm antibiyotiklere dirençli ise pan-resistant olarak isimlendirilmektedir (Magiorakos ve ark. 2012). Günümüzde *P. aeruginosa*'nın antimikrobiyal maddelere geliştirdiği direnç nedeniyle tedavi seçenekleri kısıtlı hale gelmiştir. Bazı *P. aeruginosa* suşları, karbapenemler, üçüncü kuşak sefalosporinler gibi ÇİD mikroorganizmaların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmişlerdir (Azam ve Khan 2019). Hatta dünyanın farklı yerlerinden tedavide kullanılan mevcut tüm antibiyotiklere direnç geliştirmiş yani pan-resistant *P. aeruginosa* suşları rapor edilmiştir (Xiong ve ark. 2017; Castañeda-Montes ve ark. 2018). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için yeni ve etkili antibiyotiklerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat kullanıma giren antibiyotikler mevcut antibiyotik sınıflarından olmakla birlikte, kullanıma girmesini takiben direncin çok hızla geliştiği gözlemlenmektedir. Terapötik alternatiflerin olmaması, dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların dünya çapında morbidite ve mortalite açısından önemli bir tehdit oluşturmaya neden olmuştur. Bu nedenle, DSÖ 2017'de karbapeneme dirençli *P. aeruginosa*'nın yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan "kritik" grupta listelendiğini bildirmiştir (WHO 2017).

Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağına (European Antimicrobial Resistance Surveillance Net-EARS-Net), 2019 yılında 30 Avrupa Birliği ülkesi tarafından veriler rapor edilmiştir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC) tarafından yayınlanan bu rapora göre, rapor edilen *P. aeruginosa* suşlarının %3,4'ünün sürveyans ağında takip edilen beş antimikrobiyal gruba (piperasilin-tazobaktam, florokinolonlar, seftazidim, aminoglikozidler ve karbapenemler) dirençli oldukları gösterilmiştir. Ayrıca suşların %31,8'i de en az bir antimikrobiyal gruba karşı dirençli bulunmuştur. Aynı raporda, 2015 yılından itibaren 2019 yılına kadar olan veriler karşılaştırıldığında Avrupa Birliği ülkeleri düzeyinde, küçük ama önemli sayılabilecek bir azalma olduğu vurgulanmıştır (ECDC 2019).

Ülkemizde de DSÖ'nün önerileri doğrultusunda Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) kurulmuştur. 2016 yılında Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) tarafından yayınlanan son rapora göre 2016 yılı içerisinde izole edilen suşların %32,6'sının ÇİD oldukları bildirilmiştir. En yüksek direnç prevalansı %46,1 ile karbapenemlere karşı saptanmıştır. Türkiye ve Avrupa Birliği ülkelerinin 2016 yılı direnç sürveyans verileri karşılaştırıldığında, ÇİD *P. aeruginosa* açısından Türkiye'nin yüksek bir yüzdeye sahip olduğu görülebilmektedir (THSK 2016). Benzer şekilde, DSÖ tarafından organize edilen ve Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç (CAESAR) Ağı 2018 raporuna göre, 2017 yılında en yüksek direnç prevalansı karbapenemlere (%44) karşı bulunmuştur (WHO 2018).

2.3. *P. aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

P. aeruginosa, patojenitesini arttıran ve antibiyotik direncine katkı sağlayan çok sayıda virülans faktörüne sahiptir.

Tek taraflı flagella, *P. aeruginosa*'ya bakteriyel kemotaksise yardımcı olan hareket kabiliyeti sağlar. Ayrıca hücre membranı veya diğer yüzeylere yapışmada görev alan adezinler olan çoklu hücre yüzeyi pilileri (Tip 4) bulunmaktadır. Yüzey pilileri adezyon sağlayarak biyofilm oluşumunda ve hedef dokularda mikrokoloniler oluşturarak antibiyotikler ve vücut savunma sistemlerinden kaçmada da görev alır (Newman ve ark. 2017; Gellatly ve Hancock 2013; Al-Wrafy ve ark. 2017).

P. aeruginosa'nın önemli virülans faktörlerinden biri de sekresyon sistemleridir. Bu salgılanan ürünler çoğu zaman enzimler, proteinler ve toksinler olabilir. Bu

sistemlerden *P. aeruginosa* için Tip 1 sekresyon sistemi (T1SS), T2SS, T3SS, T5SS ve T6SS olmak üzere beş tane rapor edilmiştir (Azam ve Khan 2019). *P. aeruginosa* dört tip ekzoenzim üretebilmektedir (Newman ve ark. 2017). T3SS, toksinleri doğrudan konakçı hücrelere enjekte etmeye yardımcı olur, akut invazif enfeksiyonlarda ekspresyonu artar ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gellatly ve Hancock 2013). *P. aeruginosa* dış membranında bulunan lektinler olan LecA ve LecB'nin, adezyon, biyofilm oluşumu ve akciğer hasarına katkı sağladığı gösterilmiştir (Al-Wrafy ve ark. 2017).

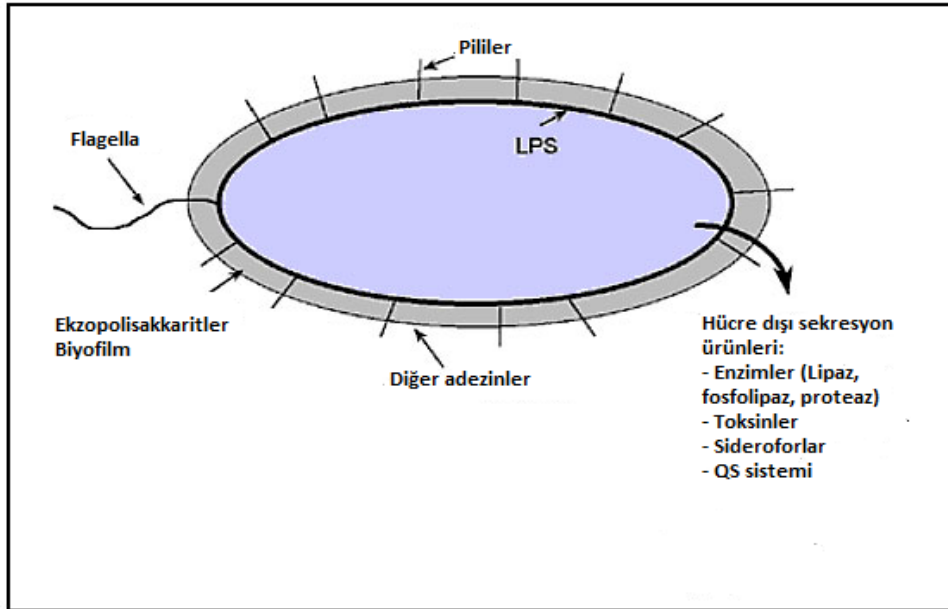
Lipopolisakkarit, dış zarın dış kısmını oluşturan kompleks bir glikolipiddir ve önemli bir virülans faktörüdür. Lipopolisakkarit, bakteriyel yapışmaya, hücrelerin birbirlerine yapışmasına ve biyofilmlerin viskoelastik özelliklerini etkileyerek biyofilm işlevine ve yapısına katkıda bulunur (Al-Wrafy ve ark. 2017; Gellatly ve Hancock 2013).

P. aeruginosa suşlarının büyük çoğunluğu proteolitik ve elastolitikdir. Proteolitik ve elastolitik proteinlerin *P. aeruginosa*'nın virülansına ve patojenitesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır (Newman ve ark. 2017). *P. aeruginosa* tarafından birçok proteaz salgılanır ve virülansa katkıda bulunur. Bu proteazlar, oküler enfeksiyonlarda ve sepsiste, immünoglobulinleri ve fibrini parçalayabilirler ve epitelyal dokuyu bozabilirler (Gellatly ve Hancock 2013). Benzer şekilde salgılanan lipaz ve fosfolipazlar, konakçı hücre membranlarındaki fosfolipitleri parçalayabildikleri gibi yüzey aktif maddelerde bulunan lipitleri de parçalayabilmektedirler (Gellatly ve Hancock 2013). Fosfolipazlar hemolitik ve non-hemolitik olabilmektedir ve hemolitik fosfolipazların insan eritristlerini parçalama özellikleri vardır. Yapılan çalışmalarda kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu bulunan KF'li hastaların tamamında hemolitik fosfolipazların sayısının arttığı belirlenmiştir (Newman ve ark. 2017).

Sidereforlar, özellikle ortamda sınırlı sayıda bulunan demiri şelatlayarak kullanımını sağlayan bileşiklerdir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen sideroforlardan iki tanesi piyoverdin ve piyokelindir (Newman ve ark. 2017; Al-Wrafy ve ark. 2017). Piyosiyanin bir diğer virülans faktörüdür ve konak solunum sisteminde oksidatif strese neden olur ve siliyer fonksiyonların bozulmasına yol açar (Gellatly ve Hancock 2013).

Mikroorganizmaların çevresel değişiklikleri algılaması ve bu değişikliklere uygun cevaplar vermesi patogenezi açısından önemlidir. Quorum sensing (QS),

bakterilerin çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu algılamasına ve farklı genleri düzenlenmesi ile bu uyarılara cevap oluşturulmasına izin veren bir mekanizmadır (Smith ve Iglewski 2003). Bakterinin çevresine salgılanan ve çeşitli virülans faktörlerinin ekspresyonunun ve biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan, oto-indükleyici olarak adlandırılan hücreler arası, küçük, sinyal moleküllerini içerir. *P. aeruginosa*'nın patogenezi indükleyen birçok geni QS sistemi tarafından düzenlenebilir. *P. aeruginosa* 3 temel oto-indükleyici üretir. Bunlardan iki tanesi açıl homoserin lakton (Las ve Ehl), bir tanesi ise kinolon bazlı sistemdir (PQS) (Al-Wrafy ve ark. 2017). *P. aeruginosa*'nın bazı virülans faktörleri Şekil 2-1'de şematize edilmiştir.



Şekil 2-1: *P. aeruginosa* virülans faktörleri

2.3.1. Biyofilm Oluşumu

P. aeruginosa'nın en önemli virülans faktörlerinden biri de biyofilm oluşumudur. Bakteriyel biyofilm, ilk olarak Costerton ve ark. (1978) tarafından bir yüzeye yapışan ve hücre dışı bir polisakkarit matriks üreten mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmıştır. Montana'daki Alpin Gölleri ve Akarsuları'ndaki kayaların yüzeylerini incelediklerinde biyofilmlerde oldukça fazla sayıda bakteri keşfetmişlerdir. Bu keşif sonucundaki verilere dayanarak biyofilmlerin doğadaki bakteriyel varlığın

önemli bir biçimi olduğunu doğrulamışlar ve aynı zamanda endüstriyel ve tıbbi alanlarda da önemini vurgulamışlardır (Costerton ve ark. 1978).

Biyofilm kütlesi, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan hücre dışı polisakkarit matriks ve mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Hücre dışı matriks, proteinler ($\%>2$), ekzopolisakkarit (EPS) ($\%1-2$), hücre dışı DNA (ekstraselüler DNA-eDNA) ($\%<1$), ribonükleik asit (RNA) ($\%<1$), lipidler ve iyonlar gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Matriksin en büyük bileşeni yüzde 97'sini kaplayan sudur. Biyofilm içeriğindeki temel besin maddelerinin akışı su içeriği sayesinde gerçekleşir (Lee ve Yoon 2017; Jamal ve ark. 2018). *P. aeruginosa*, çevresel değişikliklere yanıt olarak planktonik formdan daha sabit bir yaşam tarzı olan biyofilm yapısına kolaylıkla geçebilir. Bu durum antibiyotiklere, vücut bağışıklık sistemlerine, dezenfektanlara karşı artan dirence neden olurken, böylelikle kronik enfeksiyonlara zemin hazırlar (Thi ve ark. 2020).

Üç ekzopolisakkarit, yani Psl, Pel ve aljinat, yüzey yapışmasında, biyofilm oluşumunda ve biyofilm yapısının stabilitesinde büyük ölçüde rol oynar. Psl, hem mukoid olmayan hem de mukoid suşların biyofilm sentezi başlangıcı sırasında sabit hücrelerin (bir yüzeye bağlı hücreler) yüzeylere yapışması ve hücreden hücreye etkileşim için gereklidir. Biyofilm olgunlaşmasının son aşamasında, biyofilmin dışında biriktiği gösterilmiştir ve böylelikle biyofilme yapısal destek sağlar. Psl gibi Pel de, mukoid olmayan suşlarda biyofilmin temel bir matris bileşenidir ve yüzey bağlanmasının başlatılmasının yanı sıra biyofilm bütünlüğünün korunmasında da rol oynar (Thi ve ark. 2020; Lee ve Yoon 2017).

Aljinat, mukoid *Pseudomonas* suşlarının biyofilminde sıklıkla rastlanır ve özellikle KF akciğerlerinde kronik enfeksiyondan sorumludur. Aljinat, mannuronik asit ve glukuronik asit kalıntılarından oluşan negatif yüklü asetillenmiş bir polimerdir. Aljinat varlığı, mukoid olan ve olmayan suşların ayırtedilmesine yardımcı olur. Aljinat varlığının biyofilmin olgunlaşması, fagositozdan korunma, su ve besinleri tutma, antibiyotiklerin penetrasyonunu engellenme gibi önemli fonksiyonları olduğu belirlenmiştir. Mannurik ve glukuronik asit düzeyindeki farklılıkların biyofilmlerin viskozitesini değiştirdiği ve KF hastalarının akciğerlerini etkilediği gösterilmiştir (Thi ve ark. 2020; Lee ve Yoon 2017).

Bir diğerk hücre dışı matriks bileşeni eDNA'dır. Hücre dışı matrikste DNA'nın varlığı ile ilgili farklı teoriler bulunmaktadır. Bunlardan biri biyofilm oluşumu aşamasında bakterideki otoliz sonucu açığa DNA çıkmasıdır. eDNA'nın biyofilm matriksi içerisinde çok önemli görevleri vardır. Erken biyofilm oluşum aşamasında görev alır. Ayrıca antibiyotik direncine de katkı sağlar (Lee ve Yoon 2017). *P. aeruginosa*'da eDNA'nın önemli bir proinflatuar faktör olduğu ve nötrofil aktivasyonunu tetiklediğı gösterilmiştir (Fuxman ve ark. 2010).

P. aeruginosa, KF akciğer epitelinde DNA, protein ve ekzopolisakkarit üretimi ile biyofilm oluşturabilir ve kronik enfeksiyonlara neden olabilir. Biyofilm yaşam döngüsü düzenlenmesi temel faktörlerin etkisi ile gerçekleşir. Bunlar QS sistemi, ekzopolisakkaritler, Cyclic di-GMP ve iki düzenleyici sistem komponenti olan GacS/GacA and RetS/LadS'dir (Pang ve ark. 2019). Mikroorganizmaların içine gömülü olduğu biyofilm matriksi, toplam biyofilm kütlesinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır ve içeriğı suş, büyüme koşullarına, biyofilmin yaşına bağlı olmakla birlikte çoğunlukla, su, polisakkaritler, proteinler, eDNA ve lipidlerden meydana gelmektedir (Ciofu ve Tolker-Nielsen 2019; Moradali ve ark. 2017).

Bakteriyel biyofilmler birkaç saat içerisinde gerçekleşebilir. Biyofilm oluşumu kompleks süreçlerdir. Temel olarak 5 farklı aşamadan meydana geldiğı söylenebilir. Bunlar, geri dönüşümlü bağlanma, geri dönüşümsüz bağlanma, çoğalma ve matriks üretimi, olgunlaşma ve ayrılmasıdır.

Geri dönüşümlü bağlanma, çeşitli bakteriyel yapıların içerisinde bulunduğu bir dizi süreç sonucunda meydana gelmektedir. İlk olarak bakteriler çevresel sinyaller aracılığıyla uygun bir yüzey tespit eder ve flagellası yardımıyla hem yüzeye taşınır hem de biyofilm oluşumunu başlatır. İnaktif bir flagellanın varlığında biyofilm oluşumun gerçekleşmediğı gösterilmiştir (Vallet ve ark. 2001). Bu ilk yapışma aşaması geri dönüşümlüdür. Bu yapışma aşaması çevresel etkilerin yanı sıra yüzeyin yapısından da etkilenmektedir. Pürüzlü ve hidrofobik bir yüzey yapışmayı arttırırken, ortamda organik maddelerin varlığı da yapışma aşamasına katkıda bulunur. Bu aşama ilk yüzey ile temastan sonra birkaç saniye içerisinde gerçekleşir (Olivares ve ark. 2020).

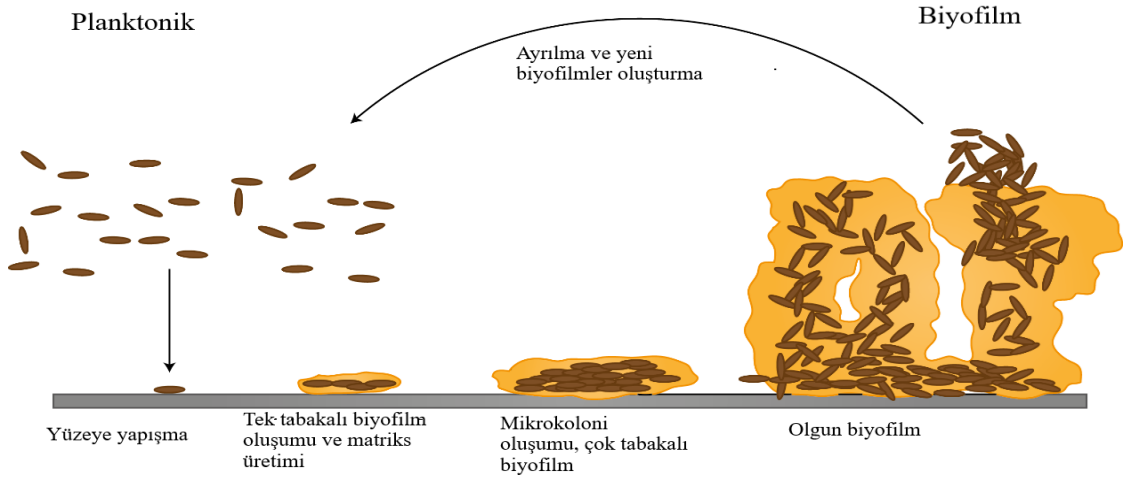
Geri dönüşümsüz bağlanmada adezinler, Tip IV pili ve liposakkaritler gibi yapılar görev almaktadır. Bu yapılar bakterilerin yüzeye geri dönüşümsüz daha sıkı bir şekilde bağlanmasına, yapışan bakterinin artmasına ve mikrokolonilerin oluşmasına

yardımcı olur. Hücre içi ikincil mesajcı olarak görev alan c-di-GMP'nin biyofilm oluşumu sürecinde artış gösterdiği belirlenmiştir. C-di-GMP artışının adezin ve diğer hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimini tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşumun sRNA (small RNA) ile de düzenlendiği ve *P. aeruginosa*'nın hareketli mikroorganizmadan sesil mikroorganizmaya geçişini sağladığı gösterilmiştir (Lee ve Yoon 2017; Tolker-Nielsen 2015). QS moleküllerinin hücreler arası iletişim ve belirli genlerin ekspresyonunu sağlamak gibi önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar QS molekülleri üretemeyen bir mutant suşun düz ve farklılaşmamış biyofilmler ürettiğini ve antibiyotiklere daha duyarlı olduklarını göstermiştir. Ayrıca QS inhibitörlerinin, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (O'Loughlin ve ark. 2013; Tolker-Nielsen 2015). QS molekülleri, biyofilm oluşumunda önemli görevleri olan, ramnolipitler, lektin ve sideroforların üretimini kontrol ederken, aynı zamanda biyofilm matriksinin önemli bir parçası olan eDNA'nın ortaya çıkmasında da önemli rol oynar (Tolker-Nielsen 2015).

Geri dönüşümsüz bağlanma aşamasını takiben, yüzeye yapışan bakteri büyümeye ve biyofilmi stabilize etmek için hücre dışı matriks üretmeye başlar. *P. aeruginosa* üç ekzopolisakkarit (aljinat, Pel ve Psl) salgılayarak biyofilmin stabilitesini sağlar. Bu aşamada bakteriyel mikrokoloniler oluşur, biyofilm çok katmanlı hale gelir ve biyofilm kalınlığı 10 µm'ye kadar çıkabilir. Biyofilmin ikinci olgunlaşma aşamasında bu mikrokoloniler, biyofilm olgunlaşmasının ayırt edici özelliği olan kapsamlı üç boyutlu mantar benzeri yapılara dönüşür ve kalınlığı yaklaşık 100 µm'ye ulaşır (Thi ve ark. 2020; Gupta ve ark. 2016). Bu yapılarda besinlerin ulaştırılması ve atıkların uzaklaştırılması amacıyla özelleşmiş su kanalları da oluşmaktadır. Biyofilm olgunlaştıkça, bakteriler çevresel koşullara göre fizyolojik, yapısal ve metabolik değişiklikler meydana getirebilir ve çevresel streslere daha dirençli hale gelirler (Lee ve Yoon 2017; Gupta ve ark. 2016).

Biyofilm oluşumun son aşaması ayrılmadır. Bu aşama, yeni bölgelerde biyofilm oluşumu için gerekmektedir. Bu ayrılma aşamasının farklı tipleri bulunmaktadır. Büyük parçaların biyofilm kütesinden ayrılması gerçekleşebileceği gibi, dış yüzeyden küçük parçaların erozyonu da görülebilmektedir. *P. aeruginosa* biyofilminde, aljinat liyaz enzimi salgılanarak biyofilm kütesinin parçalanması sağlanır, ayrıca biyofilmin merkezinden de tek tek bakteriler veya mikrokoloniler ayrılabilir. Ayrılma

mekanizmasında hücre dışı matriksin parçalanması ve bazı bakterilerin otolizi görülebilir. Bazen bakteriyel ayrılma çevre şartlarındaki değişikliklere bağlı olarak da meydana gelebilmektedir. Özellikle hücre içi c-di-GMP seviyelerindeki değişiklikler ayrılmayı doğrudan etkilemektedir (Lee ve Yoon 2017). Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 2-2’de şematize edilmiştir (Vasudevan 2014).



Şekil 2-2: Biyofilm oluşumu (Vasudevan 2014)

2.4. *P. aeruginosa* Biyofilminin Klinik Önemi

Günümüzde, biyofilmlerin hem ekolojik açıdan hem enfeksiyon hastalıkları açısından önemi daha net anlaşılmıştır. ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), tüm mikrobiyal enfeksiyonların %65’inin, tüm kronik enfeksiyonların ise %80’inin biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Olivares ve ark. 2020).

Biyofilmler kompleks yapıları nedeniyle dezenfektanlara ve antibiyotiklere daha dirençlidirler. Bu durum biyofilm ilişkili pek çok sorunu beraberinde getirmektedir. İçme suyu sistemlerinde kontaminasyon, ilaç endüstrisinde güvenlik sorunları gibi endüstriyel alanlarda problemlere neden olabileceği gibi, antimikrobiyallere ve vücut savunma sistemlerine dirençli kronik enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Biyofilmin bazı yararlı kullanımları da bulunmaktadır. Çevresel toksinler gibi çevre kirliliğine neden olan maddeleri yok etmek için kullanılan biyoremediasyon süreçlerinde biyofilmlerden faydalanılabilmektedir (Lee ve Yoon 2017; Jamal ve ark. 2018).

P. aeruginosa'nın biyofilm yapabilme yeteneği, şiddetli ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olan önemli bir faktördür. Biyofilmlerin, antimikrobiyallere ve savunma sistemlerine planktonik formlara göre gösterdiği direncin fazla olması mortalite ve morbiditeyi arttıran en önemli nedendir. *P. aeruginosa* biyofilm enfeksiyonu en sık vücuda yapay olarak yerleştirilen cihazların yüzeyinde gerçekleşmektedir. Bu cihazlara, endotrakeal tüpler, üriner kataterler, protezler, şantlar, yapay kalp kapakçıkları ve stentler, ortopedik implantlar gibi vücuda dışarıdan eklenen yapay cihazlar örnek olarak verilebilir. Bu yapay materyallerde biyofilm oluşumu materyalin insan vücuduna yerleştirilmesinden kısa süre sonra ortaya çıkabilir. Cihazın çıkarılması biyofilmin ve enfeksiyonun uzaklaştırılması için çoğunlukla tek yol olmaktadır (Maurice ve ark. 2018).

P. aeruginosa biyofilminin neden olduğu kronik enfeksiyonlara, KF hastalarında akciğer enfeksiyonları, endokardit, periodontitis, rinosinüzit, osteomyelit, iyileşmeyen kronik yaralar, menenjit ve böbrek enfeksiyonları örnek verilebilir (Khatoun ve ark. 2018). Endokardit, kalbin endotel yüzeyi ile bakterilerin etkileşimi ile gerçekleşir. Bakteriemi durumunda kanda bulunan mikroorganizmalar kalbin kapaklarına özellikle hasar durumunda yerleşerek biyofilm oluşturabilir. Periodontitis durumunda diş minesini ve diş etinde biyofilm oluşumu gözlemlenebilir ve bu durum diş kayıplarına neden olabilir. *Pseudomonas*'ın bazı türlerinin de periodontitisten sorumlu olduğu bilinmektedir. Osteomyelit, bakteriemi gibi bir iç kaynaktan ya da travma gibi bir dış kaynaktan gelen mikroorganizmanın kemiklerde enfeksiyon oluşturması ile meydana gelmektedir. *P. aeruginosa* ile enfekte olmuş yaraların daha geç iyileştiği ve daha büyük boyutta olduğu gösterilmiştir (Gupta ve ark. 2016).

2.5. Kistik Fibrozis

KF, vücutta epitel yüzeyler arasındaki ozmotik basıncı dengeleyen 7. kromozomda bulunan siklik AMP bağımlı klorür ve bikarbonat iyon taşıma kanalını kodlayan, CFTR adındaki bir gende meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır (Malhotra ve ark. 2019; Parkins ve ark. 2018). Otozomal resesif kalıtmı bir hastalıktır ve yaklaşık 2000 adet hastalık yapıcı mutasyon tanımlanmıştır. KF'nin kapsamı ve komplikasyonu, CFTR genindeki polimorfizmlere bağlıdır. Farklı popülasyonlarda oldukça değişkendir. KF'nin ilk olarak tanımlanması çok eski tarihlere dayanmakla

birlikte, genetik bir bozukluk olduğu ve otozomal resesif bir mutasyondan kaynaklandığı ilk olarak 1946 yılında tanımlanmıştır (Mirtajani ve ark. 2017).

KF, daha çok Kafkas popülasyonunu etkilemektedir ve Kafkas popülasyonu için insidansı 3.400 canlı doğumda 1'dir (Parkins ve ark. 2018). Doğu Avrupa'da bu oran 4.500 canlı doğumda 1, Kuzey ve Orta Avrupa'da ise 6.000 canlı doğumda 1'dir (Rossi ve ark. 2021). Avrupa Kistik Fibrozis Derneği (European Cystic Fibrosis Society-ECSF) tarafından 2018 yılında yayınlanan son rapora göre içerisinde Türkiye'nin de olduğu Avrupa ülkelerinde yaklaşık 50.000 çocuk ve genç yetişkinin KF hastası olduğu kaydedilmiştir (ECSF 2018).

Türkiye'deki hastalar Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları ve Kistik Fibrozis Derneği tarafından kurulan Ulusal Kistik Fibrozis Hasta Kayıt Sistemi (UKKS)'ne kaydedilmekte ve yıllık olarak ECSF'ye bildirilmektedir. Yayınlanan 2019 yılı son raporuna göre Türkiye'de kayıtlı 1623 hasta bulunmaktadır. Bu hastaların %47'i kız, %53'ü ise erkektir. Hastaların yaşları ortalama 8,92 olarak kaydedilmiştir (UKKS 2019). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar Asya ve Afrika ülkelerinde KF prevalansını gösteren verilerin yetersiz olduğunu göstermiştir (Mirtajani ve ark. 2017). Yoğun olarak tedavi edilirse, KF hastalarının ortalama beklenen yaşam süresi >35 yıldır. Bu nedenle, KF tedavisindeki her türlü yeni gelişme ve ilerleme KF hastaları için önemlidir ve yaşam süresini arttıracaktır (Høiby 2011).

Klorür iyonu taşınmasında meydana gelen problem, epitel yüzeylerden sodyum ve suyun fazla emilmesine ve dolayısıyla hava yolu yüzey sıvı hacminde azalma ve mukosilyer klirensde bozulmaya yol açar (Malhotra ve ark. 2019; Smith ve ark. 2017). KF, gastrointestinal sistem, pankreas ve üreme sistemi gibi bir dizi organ ve sistemi etkileyebilmekle birlikte, KF'li hastalarda en büyük mortalite ve morbidite nedeni solunum yolu hastalıklarıdır. KF hastalarının semptomları arasında inatçı mukuslu öksürük, tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, gastrointestinal sistem bozuklukları, büyüme hormonu bozuklukları, artmış kan şekeri gibi semptomlar sayılabilir. Bağırsak sıvılarının azalması bağırsak tıkanıklıklarına neden olabilir. Hastalık genellikle bebeklik veya çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır (Mirtajani ve ark. 2017).

KF akciğerlerinde mukus yapısının bozulması, mikrobiyal kolonizasyon ve enfeksiyonun kalıcılığı için ideal bir ortam yaratır. KF ilerledikçe, akut ve kronik enfeksiyonlar ciddi akciğer hasarına neden olur ve solunum yetmezliği hastaların

kaybedilmesine neden olur (Parkins ve ark. 2018). KF'li hastaların %95'inin ölümüne solunum yetmezliği neden olmaktadır (Rossi ve ark. 2021).

KF akciğer enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan patojen *P. aeruginosa*'dır. KF'li yetişkinlerin yaklaşık %80'inde kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu vardır (Høiby 2011). Çevresel *P. aeruginosa* suşları KF havayollarındaki kalın mukus tabakasının da etkisiyle kolonize olur. Sürekli antibiyotikler ve savunma sistemi ile uyarılan *P. aeruginosa* suşlarında zamanla mutasyonlar birikir ve genetik çeşitliliğe neden olur. Ayrıca konakçı enflamatuvar yanıtın sürekli aktivasyonu doku hasarına neden olur. KF hastalarında *P. aeruginosa* enfeksiyon prevalansının yaş ilerledikçe arttığı bilinmektedir. Geçmişte, *P. aeruginosa* enfeksiyonu KF'nin kaçınılmaz bir sonucu olarak görülürken ve KF hastalarının %50'sinde kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonunun başlangıcından sonraki 5 yıl içerisinde mortalite görülürken, günümüzde erken dönem etkin eradikasyon protokolleri ile hastalığın kronikleşmesinin önüne geçilmeye veya hastalığın geciktirilmesine çalışılmaktadır (Parkins ve ark. 2018; Høiby 2011). KF'de izole edilmiş veya saptanmış diğer fırsatçı patojenler arasında *S. aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* kompleks (çoğunlukla *B. multivorans* ve *B. cenocepacia*), *Achromobacter xylosoxidans* ve *Mycobacterium abscessus* gibi bakteriler; *Aspergillus* ve *Candida spp.* gibi mantarlar; ve virüsler (ör. rinovirüs, influenza virüsü ve solunum sinsitiyal virüsü [RSV]) sayılabilir (Malhotra ve ark. 2019; Høiby 2011).

2.6. *P. aeruginosa* Biyofilm Enfeksiyonlarında Tedavi

Biyofilmlerin, antimikrobiyal maddelere planktonik mikroorganizmalara göre 500-5.000 kez daha dirençli oldukları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Khatoon ve ark. 2018; Prabu ve ark. 2020). Bu antimikrobiyal dirence farklı mekanizmalar katkıda bulunabilmektedir. Daha fazla bakteri popülasyonu nedeniyle biyofilmin iç kısımlarında besin ve oksijen azlığı ortaya çıkmakta, çevresel stres nedeniyle bakterilerin stres genleri eksprese olmakta, oksijen azlığı anaerobik ortam oluşmasını sağlamakta ve bu durum antibiyotiklerin penetrasyonunu yavaşlatmaktadır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların metabolizmalarının planktonik hücrelere göre daha yavaş olması ve antibiyotiklerin aktif büyüyen hücrelere etkili olması nedeniyle etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır. Tobramisin gibi bazı antibiyotiklerin aktivitesinin eDNA tarafından nötralize edildiği bildirilmiştir. Beta laktamazlar, beta laktam

antibiyotiklerini inhibe ederek antibiyotiklerin biyofilm içine penetrasyonunu engeller. Penetrasyonun başarısız olması antibiyotiklerin etkinliğini yok eder. Ayrıca, biyofilm içerisindeki bakteriler arasında horizontal gen transferi gerçekleşerek direnç genleri aktarılabilmektedir (Khatoon ve ark. 2018).

Antibiyotikler çeşitli sebeplerle KF akciğer enfeksiyonunda kullanılmaktadır. Hastanın enfeksiyon kapmasının önlenmesi, erken dönem enfeksiyonun eradikasyonu, kronik enfeksiyonun kontrolü ve pulmoner alevlenmenin tedavisi gibi nedenlerle antibiyotiklerden yararlanılmaktadır. Tedavide sistemik etki elde etmek için oral ve intravenöz, lokal etki elde etmek için ise inhale antibiyotik formları kullanılabilmektedir (Smith ve ark. 2017). KF’de sistemik antibiyotik tedavisi genellikle kan damarlarının yoğun olduğu alveolleri etkilemektedir. Bu nedenle mukus tabakasının yoğun olduğu trake, bronş ve bronşiyollerde tedavi edici etkiye ulaşabilmek için geleneksel antibiyotiklerin inhale formları geliştirilmiştir ve bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (Taccetti ve ark. 2021; Smith ve ark. 2018).

KF hastalarının akciğerlerinde oluşan *P. aeruginosa* enfeksiyonu biyofilm oluşturan mukoid suşlar tarafından oluşturulmaktadır. KF’li hastaların akciğerlerindeki bu enfeksiyonun tedavisindeki en büyük zorluk, *P. aeruginosa*’nın antibiyotiklere ve savunma sistemlerine dirençli biyofilm büyüme evresine geçmesidir. *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumunu engellemek için erken dönemde agresif profilaktik tedavi kullanılırken, tedavi için kronik baskılayıcı antibiyotik tedavisi gerekmektedir (Høiby 2011).

İnhale tobramisin ve oral azitromisinin KF’de görülen kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonun tedavisinde etkili oldukları ve akciğer kapasitesini ve yaşam kalitesini arttırdığı bilinmektedir (Nichols ve ark. 2017). Fakat KF akciğerlerinde görülen *P. aeruginosa*’nın *S. aureus* ile birlikte biyofilm oluşturabildikleri ve bu iki bakteri arasındaki polimikrobiyal etkileşimin inhale tobramisine karşı direnç gelişimini desteklediği ve tedavinin olumsuz etkilenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Beaudoin ve ark. 2017). Riethmüller ve ark. (2016) kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonlu KF hastalarında sıralı inhale tobramisin ve kolistin kombinasyonunun hastalar tarafından iyi tolere edildiğini, akciğer fonksiyonu ve solunum semptomları açısından faydalı etkileri olabileceğini göstermiştir. Antibiyotiklere alternatif tedavilerle ilgili de çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Kolpen ve ark. (2016) tarafından yürütülen bir çalışma,

hiperbarik oksijen tedavisinin siprofloksasin ile kombine edilmesinin siprofloksasinin biyofilme karşı etkinliğini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, KF hastalarında tekrarlayan *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için düşük doz nitrik oksitin *ex-vivo* KF balgamda biyofilm parçalanmasına neden olduğu gösterilmiş ve randomize klinik çalışma ile doğrulanmıştır (Howlin ve ark. 2017). Ayrıca, antibiyotiklere sürekli maruziyet nedeniyle, KF hastalarında ÇİD bakterilerle enfeksiyon gelişme riski daha yüksektir.

Tedavide antibiyotik seçimi, yaş ve enfeksiyon etkeni dikkate alınarak kültür sonucuna göre gerçekleştirilmektedir. Özellikle ileri yaştaki hastaların akciğerlerinde ÇİD *P. aeruginosa* ile kolonizasyon riski artmaktadır. Bu nedenle, bu popülasyonda ÇİD *P. aeruginosa* enfeksiyonları için yeni antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesi önceliklidir (Law ve ark. 2019; Smith ve ark. 2017). Uzun süre boyunca antibiyotik kullanılması KF hastaları için çok önemlidir. Fakat uzun süre antibiyotik kullanımı, aminoglikozitlere bağlı ototoksisite ve nefrotoksisite gibi antibiyotiğe bağlı toksik etkilere neden olmaktadır. Ayrıca, antibiyotik tedavisi akciğer mikrobiyotasını da etkilemektedir. Alerjik reaksiyonlar ve advers etkiler de antibiyotik kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerle de yeni antimikrobiyallere ihtiyaç günden güne artmaktadır (Smith ve ark. 2017).

2.7. Biyofilm Modelleri

Biyofilm enfeksiyonları, tüm kronik enfeksiyonlar içerisinde önemli bir yer tutmakla birlikte, güncel tedavi eksiklikleri önemli bir sorundur. Biyofilm araştırmaları ile ilgili en önemli sorunlardan biri ise bu tarz enfeksiyonların klinik özelliklerini yansıtacak uygun test modellerinin olmamasıdır. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından standardize edilmiş Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) tayini gibi standardize bir biyofilm modeli bulunmamaktadır. Biyofilmin yapısını ve oluşumunu taklit etmek için çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* model geliştirilmiştir ve biyofilm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Wu ve ark. 2021). Farklı biyofilm modellerinin birbirlerine karşı zayıf ve güçlü yönleri bulunabilmektedir. Çalışmanın türüne göre çalışılacak biyofilm modeline karar verilebilir. Biyofilm çalışmaları saf kültür ile yürütülebileceği gibi iki ya da daha fazla mikroorganizmanın bir arada bulunduğu çoklu biyofilmler de olabilir.

In vitro biyofilm modelleri kapalı sistem ve açık sistem biyofilm modelleri olarak iki temel gruba ayrılabilir. Besin maddelerinin ve havalandırmanın kısıtlı olduğu kapalı sistem (statik model) biyofilmlerinden en sık kullanılan modeller agar pleyt ve çok kuyulu mikrolak biyofilm modelleridir. Agar pleyt modeli temel olarak agar yüzeyinde büyüyen koloninin biyofilm formu oluşturmastır. Tekrarlanabilir ve basit bir yöntem olmasının yanı sıra yüksek verimlilikte kullanıma uygundur. Antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi ve morfolojik gözlem için kullanılabilir (McBain 2009; Lebeaux ve ark. 2013; Merritt ve ark. 2005).

Mikrolak biyofilm modeli, bakteriyel yapışma ve biyofilm oluşumu çalışmalarında kullanılabilen basit bir kantitatif yöntemdir. Genellikle polistiren, polipropilen veya polikarbonattan oluşan kuyularda zamana bağlı yapışma esasına dayanır. Antimikrobiyal maddelerin biyofilm oluşumunu engelleme veya eradike etme potansiyelleri farklı konsantrasyonlarda maddelerin olgun veya yeni oluşan biyofilmlere eklenmesi ile test edilebilir. Biyofilm oluşumu kristal viyole gibi boyalarla yapışan hücrelerin boyanması ve spektrofotometrik olarak ölçülmesi yolu ile tespit edilebileceği gibi oluşan biyofilmin parçalanması sonucunda koloni sayılarak da belirlenebilir (McBain 2009; Macia ve ark. 2014). Ayrıca biyofilm içerisindeki canlı hücrelerin varlığı da XTT (sodyum 3' - [1 - [(fenilamino) -karboni] -3,4-tetrazolyum] -bis (4-metoksi-6-nitro) benzen-sülfonik asit hidrat) deneyi gibi kantitatif tespit yöntemleri ile de belirlenebilir (Lebeaux ve ark. 2013).

Açık sistem (dinamik sistem) biyofilm modellerinde prensip, metabolik artıkların, ölü hücrelerin taze besiyeri ile sürekli değiştirilmesidir. Çevresel parametlerin değiştirilmesine olanak sağlamakla birlikte biyofilmin fiziksel ve kimyasal dayanıklılığını da tespit etmeyi sağlar. Fakat yürütülebilmesi için teknik ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Lebeaux ve ark. 2013; Macia ve ark. 2014). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) biyofilm reaktörleri, dönen disk reaktörleri, Mikrofermantörler, Modifiye Robbins cihazı, Akış hücresi örnek olarak verilebilir. CDC reaktörleri, tutarlı büyüme koşulları altında antimikrobiyal maddelerin ve yüzey temizleyicilerinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. CDC reaktörlerde biyofilm, reaktörün tabanında bulunan kuponlar üzerinde geliştirilir. Sıvı besiyeri kapta dolaştırılır ve devamlı kültür sağlanır. Kuponların sonikasyonu, vortekslenmesi ve

homojenizasyonu ile direkt canlı mikroorganizma sayımı yapılabilir (Williams ve Bloebaum 2010; McBain 2009).

Ex vivo biyofilm modelleri, *in vivo* ve *in vitro* biyofilm modellerinin ortasında yer alan biyofilm modelleridir. *Ex vivo* biyofilmler, canlı bir organizmadan çıkarılan doku veya organların laboratuvar ortamında yapay bir besiyerine yerleştirildiği ve biyofilm çalışmalarında kullanıldığı modellerdir. Diş hekimliğinde diş kök kanal biyofilmleri modeli, kalp kapakçığı *ex vivo* modeli, vajinal mukozada kandidiyaz oluşturma modeli, trakea epiteli modeli sıklıkla kullanılan *ex vivo* biyofilm modellerine örnektir (Lebeaux ve ark. 2013; Anderson ve ark. 2013). Hashemi, Holden, Taylor ve ark. (2018) cerageninlerin etkinliğini sağlıklı domuzlardan çıkarılan trakea ve akciğer dokusu üzerinde oluşturulan biyofilm üzerinde test etmişlerdir.

In vitro biyofilm çalışmaların konakçı ortamını taklit etmede kısıtlamalara sahip olması nedeniyle *in vivo* biyofilm modelleri geliştirilmiştir. *In vivo* modellemelerde omurgasız canlılar ve kemirgenler kullanılabildiği gibi domuz gibi daha gelişmiş canlıların da kullanılabildiği karmaşık modeller bulunmaktadır. Biyofilm modellemelerinde kullanılan omurgasız canlılara örnek olarak *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster* verilebilir (Lebeaux ve ark. 2013). *In vivo* biyofilm modelleri genellikle kompleks çalışmalardır ve insan koşullarını çoğu zaman yansıtamayabilmektedir. Ayrıca en büyük kısıtlamaları, etik kaygılar dolayısıyla özellikle memeli gelişmiş canlıların kullanımının yasal düzenlemelerle kısıtlandırılmasıdır (Wu ve ark. 2021).

Biyofilmler konakçıya yerleştirilen yapay cihazlarda meydana gelen biyofilmler olabileceği gibi doku ile ilişkili biyofilmler de olabilir. *In vitro* veya *in vivo* olarak yapay cihazlarda biyofilm oluşumu gerçekleştirilebilir ve çalışmalarda kullanılabilir. Cihaz ile ilişkili biyofilm modellerine, vasküler katater, üriner katater, ortopedik implantlar, endotrakeal tüpler, vasküler greftler, kontakt lensler, dental implantlar üzerinde oluşturulan biyofilm modelleri örnek olarak verilebilir. *In vivo* çalışmalarda, yapay cihazlar insanlarda kullanılan bölgelere uygun şekilde deney hayvanına yerleştirilerek biyofilm modeli oluşturulabileceği gibi cihazın deri altına yerleştirilmesi ile de biyofilm modeli çalışılabilir (Lebeaux ve ark. 2013). *In vitro* çalışmalarda endotrakeal tüpler gibi vücuda yerleştirilen cihazların üzerlerinde laboratuvar ortamında biyofilm oluşturulması amaçlanmaktadır. Latorre ve ark. (2021) tarafından geliştirilmiş

bir *in vitro* biyofilm modelinde ceragenin ile kaplanmış endotrakeal tüplerde *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* biyofilmi oluşumu test edilmiş ve kontrol grubuna göre biyofilm oluşumu açısından anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

Doku ile ilişkili biyofilmler de *in vivo* olarak çalışılabileceği gibi *in vitro* modeller ve omurgasızlarda *in vivo* modeller de kullanılabilir. Doku ile ilişkili *in vivo* biyofilm modelleri, KF akciğer enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, sistit, kronik bakteriyel prostatit, sindirim sistemi enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, endokardit, kulak, burun, boğaz enfeksiyonları, dental biyofilmler gibi enfeksiyonlar modellenerek gerçekleştirilmektedir (Lebeaux ve ark. 2013).

In vitro biyofilm modelleri, kullanımı kolay, ucuz ve etik açıdan sorunsuz olduğu için *in vivo* modellerden daha fazla sıklıkta kullanılmaktadır. Fakat çoğunlukla canlı olmayan yüzeylerde oluşturulan biyofilm modelleri konakçı dokusu ve biyofilm arasındaki etkileşimi yansıtamamaktadır. Bu nedenle hücre kültürlerinin kullanıldığı çalışmalar ile KF akciğer enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, peridontal enfeksiyonlar, implant ilişkili enfeksiyonlar gibi biyofilm enfeksiyonlarını taklit eden modeller oluşturulmuştur (Moreau-Marquis ve ark. 2010; Kim ve ark. 2010; Zaatreh ve ark. 2016; Ramage ve ark. 2017). Moreau-Marquis ve ark. (2010), insan KF bronşiyal epitelyal hücre hattı (CFBE) ve *P. aeruginosa* ko-kültürü ile KF akciğer enfeksiyonlarını modellemişlerdir. Yaptıkları çalışmada hücre hattı üzerinde direkt bakteriyel biyofilmin oluşturulduğu kapalı sistem (statik) ko-kültür biyofilm modeli ile akış hücresi aparatı kullanarak açık sistem ko-kültür modeli oluşturmuşlardır (Moreau-Marquis ve ark. 2010). Ayrıca cam gibi abiyotik yüzeylerde büyütülen biyofilmlere kıyasla *P. aeruginosa* biyofilmleri hava yolu hücrelerinde büyütüldüğünde tobramisin direncin >25 kat arttığı bildirilmiştir (Moreau-Marquis, Bomberger ve ark. 2008). Zamanla hücre kültürü çalışmaları basit 2 boyutlu kültürlerden daha kompleks 3 boyutlu hücre kültürü yöntemlerine doğru değişmektedir. Konakçı dokusunda oluşan biyofilmin yapısını taklit etmek için 3 boyutlu hücre kültürü çalışmaları da yürütülmüştür (Crabbé ve ark. 2017; Montefusco-Pereira ve ark. 2020). Crabbé ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Döner duvarlı biyoreaktör (RDW) kullanarak 3 boyutlu A549 hücre hattı geliştirmişlerdir. 3 boyutlu hücre hattının 11-14 gün içerisinde olgunlaşmasını takiben, *P. aeruginosa* PAO1 kültürü ekleyerek biyofilm oluşmasını sağlamışlardır (Crabbé ve ark. 2017).

Wu ve ark. (2021) çalışmalarında *in vitro* insan organoid biyofilm modelini geliştirmiş ve doku ile ilişkili biyofilm enfeksiyonlarını *in vitro* modellemişlerdir. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan deri enfeksiyonlarını taklit etmek amacıyla *in vivo* benzeri insanlaştırılmış, hava-sıvı arayüzlü bir deri epidermal modeli geliştirmişlerdir. Deri modeli oluşturmak için N/TERT keratinosit hücreleri kullanmışlar ve epiderminin gelişmesi ve kalınlaşmasını sağlamışlardır. Oluşan epidermise bakterilerin eklenmesi ile biyofilm oluşumu gerçekleştirilmiş ve AMP kullanılarak tedavi başarısı değerlendirilmiştir. Bu sistemin hayvan deri enfeksiyon modellerine alternatif olduğu ve yeni antibiyofilm ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark. 2021).

Çevresel biyofilmlerin çoğunlukla birden fazla mikroorganizmanın bir arada bulunduğu biyofilmlerden oluştuğu uzun zamandır bilinmekle birlikte, insan enfeksiyonlarında çoklu biyofilmlerin varlığı yakın zamanda araştırılmıştır. Son zamanlarda çalışmalar tekli biyofilm çalışmaları yanı sıra çoklu mikroorganizmaların oluşturduğu karışık biyofilm çalışmalarına da odaklanmaktadır. Otitis media, vajinoz, yara enfeksiyonları gibi pek çok enfeksiyon hastalığının çoklu mikroorganizmaların varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jung ve ark. 2017; Bair ve ark. 2020; Dalton ve ark. 2011).

2.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının tarihi, Harrison ve ark. (1907) tarafından yürütülen sinir liflerinin kökenini ve gelişimini inceledikleri bir çalışmada hücre kültürü kullanılması ile başlamıştır. O tarihten itibaren çok sayıda hücre kültürü temelli çalışma yapılmıştır. Hücre kültürü bankaları bu çalışmaların çok daha kolay yürütülmesine katkı sağlamışlardır.

2.8.1. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması

Hücre kültürü tipleri temel olarak birincil ve ikincil hücre kültürü olarak ikiye ayrılmaktadır. Birincil hücreler, mekanik veya kimyasal parçalama veya enzimatik sindirim yoluyla doku ve organlardan direkt olarak elde edilen hücrelerdir. Hücre hatlarına göre elde edildikleri dokuyu daha fazla temsil ettikleri için avantajlıdır fakat üretilmeleri zor ve yavaştır. Ayrıca ömürleri sınırlıdır. En önemli dezavantajlarından biri de elde edilmeleri ve izolasyonları sırasında mikrobiyal kontaminasyona maruz kalabilmeleridir. Kültürdeki hücrelere göre yapışkan hücreler ve süspansiyon hücreler

olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yapışkan hücreler büyümek ve çoğalmak için biyolojik olarak inert bir yüzeye yapışmaya ihtiyaç duyarlar. Süspansiyon kültürler ise sıvı besiyeri içerisinde çoğalabilirler, bir yüzeye ihtiyaç duymazlar. Kan hücreleri süspansiyon kültürüne örnek olarak verilebilir (Verma ve ark. 2020).

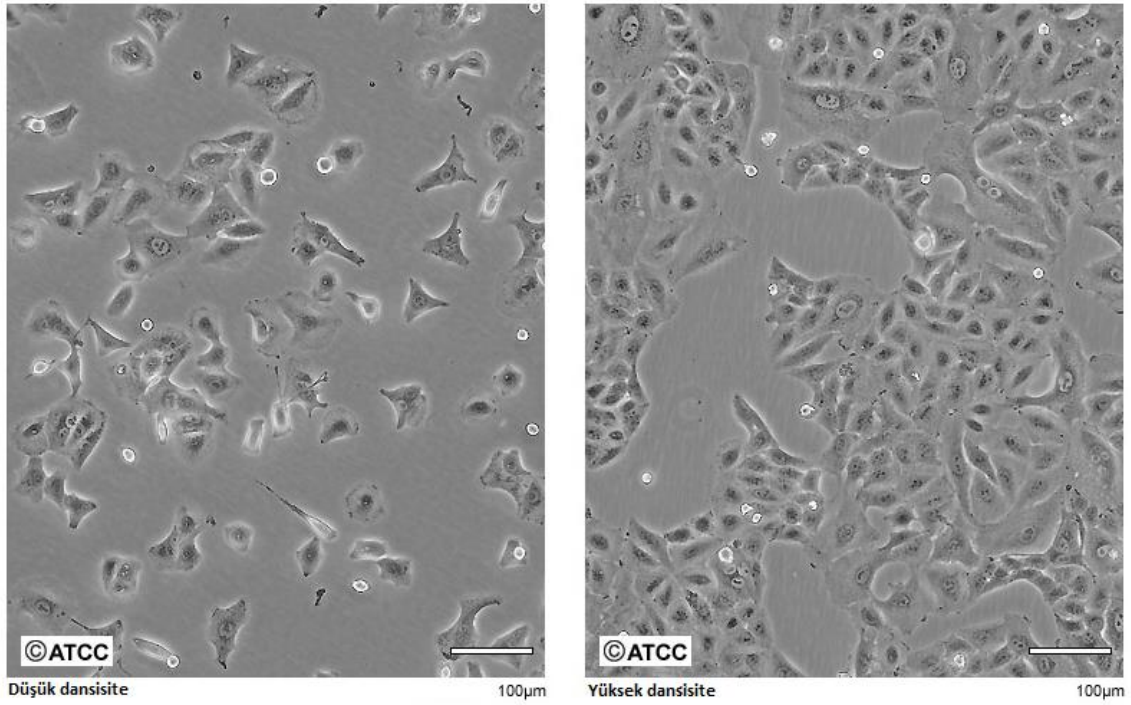
Birincil hücre kültürleri uzun süreler taze besiyerinde çoğaltıldığında ve pasajlandığında ikincil kültürleri oluştururlar. Birincil kültürlerden farklı olarak daha uzun ömürlüdürler. Birincil kültürler heterojenken, bu tür kültürler benzer bir hücre popülasyonunda çalışma imkânı verir. Ayrıca süresiz büyüme özelliklerine sahip olabilirler. Fakat uzun pasajlamalar sonucunda bu hücrelerde farklılaşma ve anormal hücreler oluşturma eğilimi ortaya çıkabilmektedir (Verma ve ark. 2020).

Birincil hücre kültürleri altkültürlendiğinde bir hücre hattı meydana gelir. Hücre hatları ömürlerine bağlı olarak sonlu hücre hattı ve sonsuz hücre hattı olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Sonlu hücre hatları sınırlı büyüme sayılarına sahiptir. Yavaş büyüyen hücrelerdir. *In vitro* olarak transforme edilmiş veya kanserli hücre hatları sonsuz hücre hatlarıdır. Sınırsız altkültürlenme potansiyeline sahiptirler ve hızlı çoğalma özelliği gösterirler (Verma ve ark. 2020).

Çok sayıda hücre hattı ticari olarak bulunmakta ve çalışmalarda kullanılmaktadır. Hücre hattı seçiminde çalışmanın gereklilikleri yanı sıra, hücre hattının büyüme özellikleri de dikkate alınmalıdır.

2.8.2. A549 Hücre Hattı

A549 hücre hattı, çalışmalarda yaygın olarak kullanılan hücre hatlarından bir tanesidir. İlk olarak Giard ve ark. (1973) tarafından beyaz bir erkek bireyin kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi ile elde edilmiştir. A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleridir. Yapışkan hücreler olup kısa sürede çoğalabilmektedirler (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: A549 hücre hattı görünümü

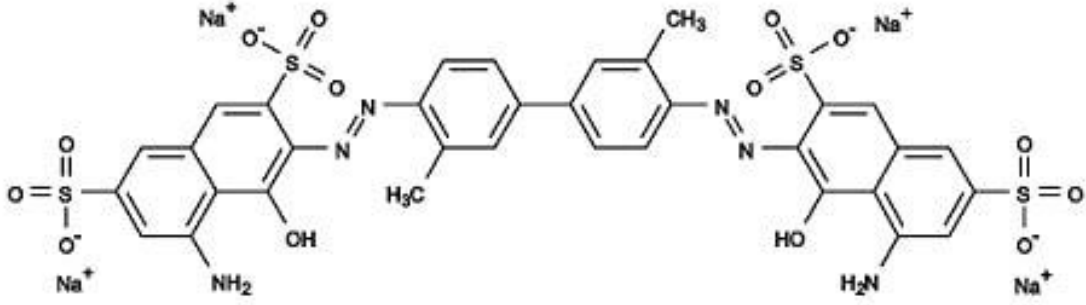
2.8.3. Sitotoksosite ve Hücre Canlılık Deneyleri

Hücre kültüründe, bir maddenin sitotoksitesini/hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla farklı yöntemler kullanılabilmektedir.

- Boyama yöntemleri: Tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı, eritrosin B.
- Kolorimetrik yöntemler: MTT, XTT, LDH, nötral kırmızısı alımı, WST-1, WST-8, Kristal viyole testi vs.
- Florometrik yöntemler: AlamarBlue testi, CFDA-AM testi vs.
- Luminometrik yöntemler: ATP (adenozin trifosfat) testi, gerçek zamanlı hücre canlılığı belirleme testi vs. (Erkekoğlu ve Baydar 2021; Aslantürk 2018).

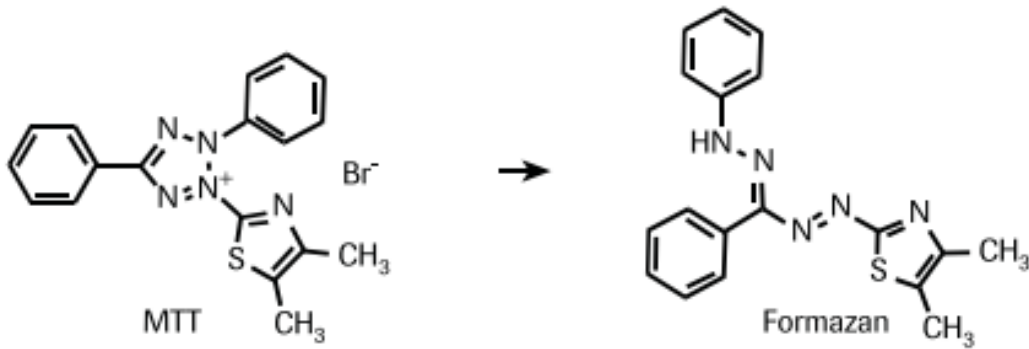
Boyama yöntemlerinde en sık kullanılan boya tripan mavisidir (Şekil 2-4). Yöntemin prensibi, hücre ortamına konulan boyaları canlı hücrelerin almaması, ölü hücrelerin ise hücre zarı geçirgenliği arttığı için boyayı tutarak renklenmesidir. Mikroskop kullanılarak canlı hücre yüzdesi belirlenebilir (Erkekoğlu ve Baydar 2021). Prosedür oldukça kolay olmakla birlikte, yüksek sayılı örneklerde uygulaması zordur ve

zaman alıcı bir yöntemdir. Tripan mavisi dışında aynı yöntem ile eozin, kongo kırmızısı ve eritrosin B de kullanılabilir.



Şekil 2-4: Tripan mavisinin kimyasal formülü

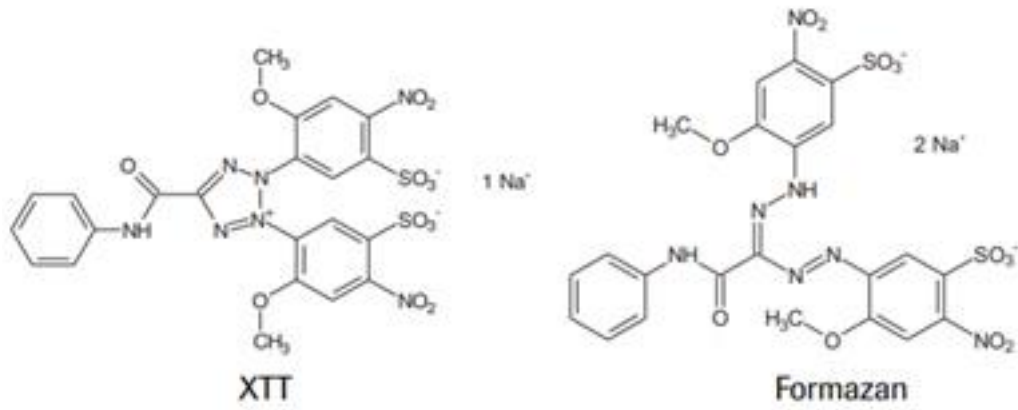
MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür), suda çözünebilir bir tetrazolyum tuzudur (Şekil 2-5). Mitokondride bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tetrazolyum halkasını kırmakta ve sonuçta çözünmeyen mor renkli formazon kristalleri oluşmaktadır. Oluşan kristaller canlı hücrelerin hücre zarlarından geçemez ve hücre içerisinde birikir. Oluşan formazon kristalleri Dimetil sülfoksit (DMSO) gibi ajanlarla çözündürülebilir (Fotakis ve Timbrell 2006).



Şekil 2-5: MTT ve deney sonucu oluşan formazanın formülü

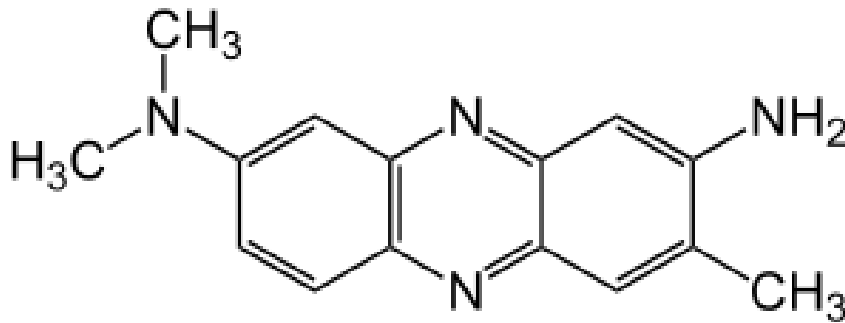
XTT, ikinci nesil tetrazolyum tuzudur (Şekil 2-6). XTT'deki tetrazolyum halkası MTT'de olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimi

aracılığıyla parçalanır ve açığa suda çözünen mor renki formazan kristalleri çıkar. MTT'den farklı olarak oluşan kristaller suda çözündüğü için DMSO gibi ajanların uygulanmasına gerek yoktur. MTT ile aynı deney hassasiyetine sahip olmakla birlikte, daha kısa sürede test olanağı sunar (Roehm ve ark. 1991).



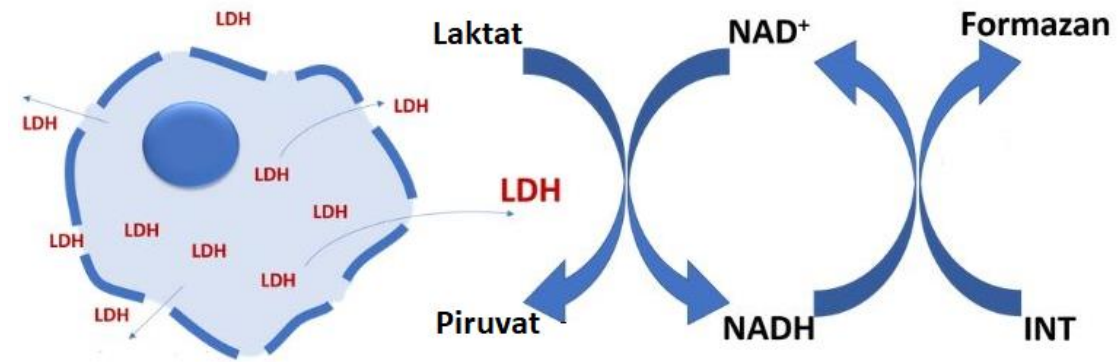
Şekil 2-6: XTT ve deney sonucu oluşan formazanın formülü

Nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetil-amino-2- metilfenazin hidroklorür) alımı deneyinde, lizozim membranlarının bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerde, nötral kırmızısının lizozim içerisine alımı gerçekleşmektedir (Şekil 2-7). Nötral kırmızısı hafif katyonik bir boya olarak sitoplazmaya rahat bir şekilde geçmekte ve lizozom içerisinde yüklü hale gelerek birikmektedir. Nötral kırmızısı ile boyanan canlı hücrelerde rengi çözmek için asitlendirilmiş etanol kullanılmaktadır (Erkekoğlu ve Baydar 2021; Liu ve ark. 2018).



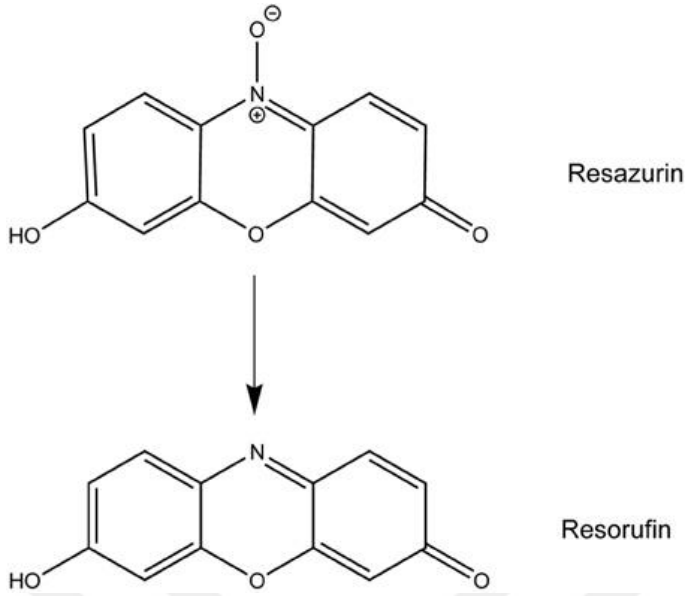
Şekil 2-7: Nötral kırmızısı kimyasal formülü

LDH sitotoksosite deneyi, hasarlı hücrelerden açığa çıkan laktat dehidrogenaz enzimini kantitatif olarak ölçmeye dayanan kolorimetrik bir yöntemdir (Şekil 2-8). LDH enzimi normalde hücre sitoplazmasında bulunan bir enzim olmakta birlikte, hücre hasarı durumunda sitoplazma içeriğinin hücre dışına çıkması ile birlikte hücre kültürü besiyerine geçer. LDH salınımının miktarı, bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazana dönüşmesi ile sonuçlanan birkaç enzimatik reaksiyonun bir arada olması ile belirlenir (Aslantürk 2018).



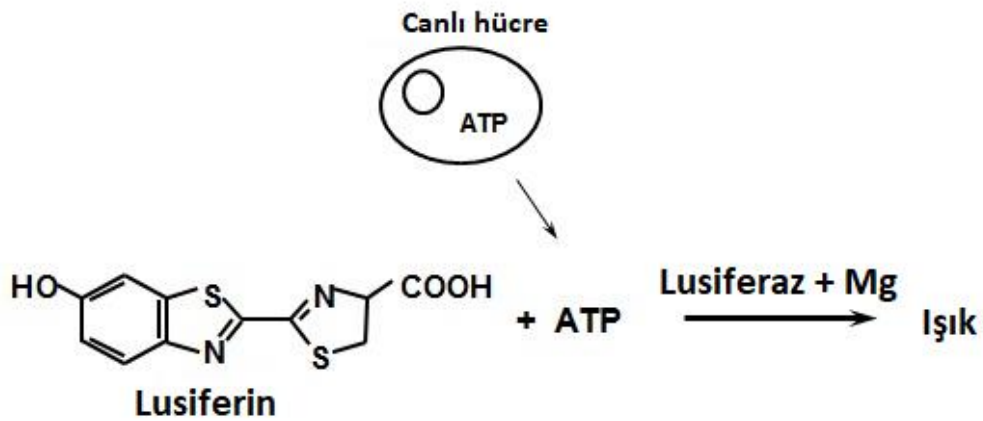
Şekil 2-8: LDH deneyinin prensibi

AlamarBlue testi, boyanın floresan özellik kazanmasına dayanan bir testir. AlamarBlue, fenoksazin-3-on yapısında rezasurin olarak da bilinen bir boyadır. Rezasurin, hücre kültürüne eklendiğinde metabolik olarak aktif canlı hücrelerin sitozolüne girer ve Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), Flavin adenin dinükleotit (FADH), Flavin mononükleotit (FMNH), Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'in yanı sıra sitokromlardan gelen elektronları alarak mitokondriyal enzimler yardımıyla indirgenmiş formuna dönüşür (Şekil 2-9). Rezasurin mavi renkli floresan olmayan bir boya olmakla birlikte indirgenmiş formu olan resofurin ileri derece pembe renkli floresan veren bir boyadır. Floresan şiddeti kolorimetrik veya florometrik okuma ile ölçülerek hücre canlılığı kantitatif olarak belirlenebilir (Al-Nasiry ve ark. 2007; Aslantürk 2018; Erkekoğlu ve Baydar 2021).



Şekil 2-9: Resazur ve resofurinin kimyasal yapısı

ATP biyoluminesans testi, canlı hücrelerin ATP aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Canlı hücreler metabolik aktiviteleri için ATP kullanmaktayken, ölü hücrelerde ATP açığa çıkmaz. ATP'nin Mg^{+2} iyonları eşliğinde lusiferini, luminesans sinyali veren oksilusiferine dönüştürmesi sonucunda, luminesansın dolaylı olarak da ATP'nin ölçülmesi ile gerçekleştirilir (Şekil 2-10). ATP miktarı da hücre canlılığının göstergesidir (Erkekoğlu ve Baydar 2021).



Şekil 2-10: ATP bioluminesans deneyi prensibi

2.9. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

2.9.1. Antimikrobiyal Peptidler

İnsan terapötik ajanı olarak kullanım potansiyeli bulunan yeni bir antimikrobiyal sınıf olan AMP'lerden günümüze kadar çok sayıda keşfedilmiştir. Bunların en önemlilerinden bazıları magainin, cecropin ve LL-37'dir.

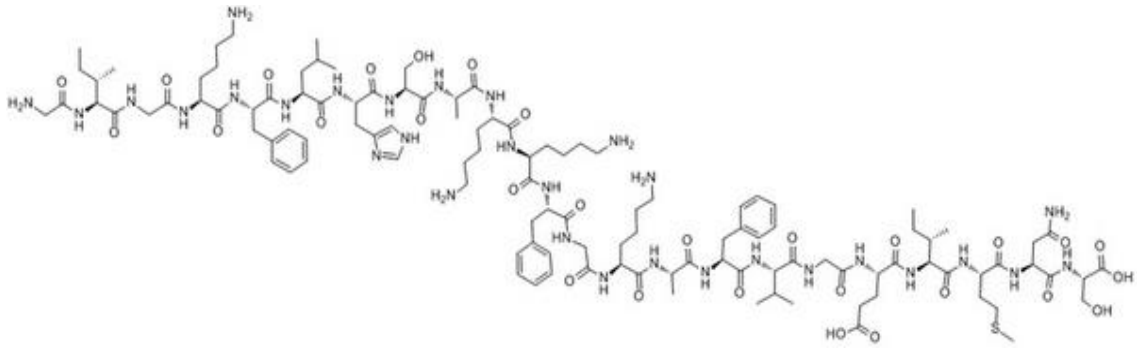
2.9.1.1. AMP'lerin Etki Mekanizması

AMP'lerin en önemli etki mekanizması hücre membranına olan etkisidir. Fakat yapılan çalışmalar başka etki mekanizmaları yolu ile de antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemiştir. AMP'lerin iki temel etki mekanizması vardır. Bunlardan biri doğrudan mikroorganizma üzerine öldürücü etkisi, diğeri ise immun sistem modülasyonudur. Bazı AMP'ler hücre membranındaki reseptörler ile etkileşerek etki gösterirken, çoğu AMP reseptör ile etkileşime girmeden hücre membranını hedefler. Gram pozitif bakterilerin dış yüzeyinde bulunan teikoik asit ve Gram negatif bakterilerin yüzeyinde bulunan LPS negatif yüklüdür ve pozitif yüklü AMP, elektrostatik olarak bu moleküllerle etkileşir ve antibakteriyel etki gösterir. Hücre membranına etkisinin yanı sıra bazı AMP'lerin hücre duvarı sentezinin inhibisyonu veya hücre içi hedefler aracılığıyla etki gösterdiği de belirlenmiştir (Kumar ve ark. 2018).

2.9.1.2. Magainin

Magainin ilk olarak 1987 yılında Afrika pençeli kurbağa *Xenopus laevis*'in derisinden izole edilmiş, geniş spektrumlu bir peptiddir (Zasloff 1987). Magaininin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkinliği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Kim ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada magainin 2'nin ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii*'ye karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkili olduğunu ve insan keratinosit hücre hattına (HaCaT) sitotoksik etkili olmadığını belirlemişlerdir. Magainin II etki mekanizmasının bakterinin hem iç hem de dış membranını etkilemek olduğunu göstermişlerdir. Geitani ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışma AMP'lerin antibiyotiklere duyarlı veya dirençli *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın hem laboratuvar hem de klinik izolatları üzerindeki güçlü ve hızlı antibakteriyel aktivitesini göstermiştir. Ayrıca, AMP'ler antibiyotiklerin etkinliğini arttırarak sinerjizm göstermiş ve test edilen iki insan akciğer epitel hücre hattı üzerinde toksik etkiye neden olmamışlardır. Çalışmada AMP olarak LL-37, magainin II, nisin ve CAMA (Cecropin-melittin) kullanmışlar ve CAMA çalışmada test edilen suşlara karşı en etkili AMP

olarak belirlenmiştir. Etkili AMP'lerden CAMA ve LL-37'nin kolistin ve imipenem ile kombinasyonları *P. aeruginosa*'ya karşı sinerjistik aktivite göstermiştir. Ayrıca, *in vitro* direnç indüklenme çalışmasında CAMA ve LL-37 için düşük düzey ve geçici direnç gelişimi gözlemlenmiştir. Fakat bununla birlikte yapılan başka çalışmalar AMP'lere karşı direnç gelişiminin de gözlemlendiğine dikkat çekmektedir (Cardoso ve ark. 2018). Özellikle bakteriler tarafından salgılanan proteazlar AMP'lerin parçalanmasına ve inaktif olmalarına neden olmaktadır (Sieprawska-Lupa ve ark. 2004; Schmidtchen ve ark. 2002). Magainin II'nin yapısı Şekil 2-11'de görülebilmektedir.

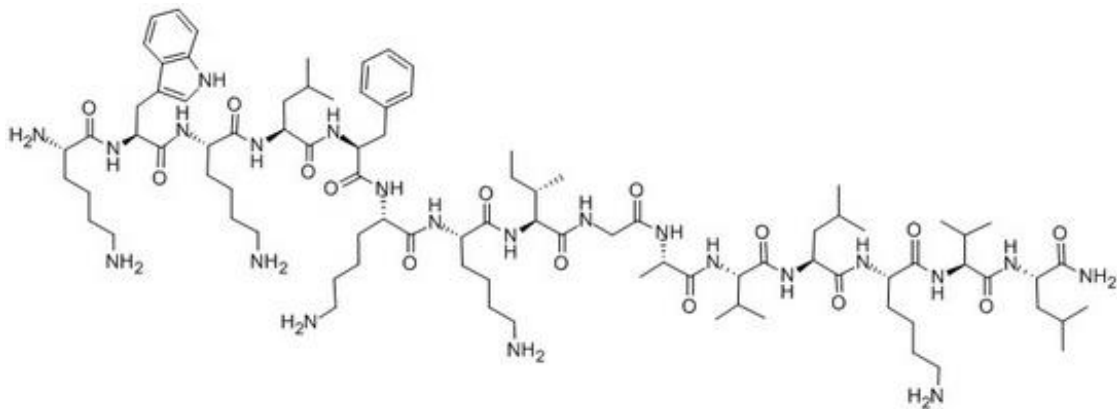


Şekil 2-11: Magainin II kimyasal yapısı

2.9.1.3. Cecropin

Cecropin grubu AMP'ler 5 ana alt türden oluşmaktadır (A-E) ve sarkotoksinler, stomoksinler, papiliosinler, enbosinler ve spodopsinler gibi farklı isimlerde başka AMP'ler de bu gruba dâhildir (Romoli ve ark. 2019). Cecropin A, ilk olarak *Hyalophora cecropia* güvesinden izole edilmiş bir AMP'dir. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu etkinlik gösterir. Pozitif yüklü yapısı ile negatif yüklü membran lipidlerine bağlanır, por oluşumuna neden olur, membran geçirgenliğini artırır ve nihayetinde bakterinin ölümüne neden olur. Bu nedenle yapısı gereği Gram negatiflere etkinliği daha fazladır (Wang, Lin ve ark. 2019). Cecropin A gibi peptidlerin dezavantajlarını azaltmak için çok sayıda doğal veya yapay modifikasyonlar denenmektedir. *Bombyx mori* ipek böceğinden izole edilmiş iki farklı CecB izoformunun *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliklerinin test edildiği bir çalışmada, iki peptid de yüksek antimikrobiyal ve membranolitik aktivite göstermelerine rağmen, yapısındaki farklılıklar dolayısıyla glutamin içeren Q53 CecB izoformunun pH,

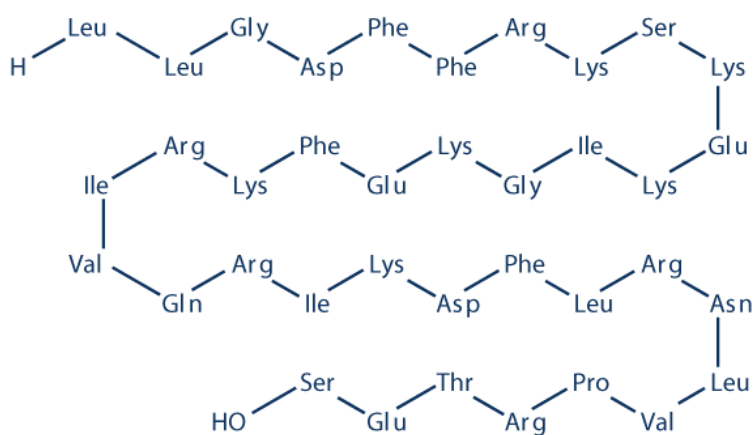
sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonlarındaki stabilitesi açısından daha avantajlı olduğu gösterilmiştir (Romoli ve ark. 2019). Kalsy ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada CecA'nın üropatojenik *E. coli* (UPEC) biyofilmine karşı hem tek başına hem de nalidiksik asit ile kombinasyon halinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma CecA'nın UPEC biyofilmini çok sayıda farklı etki mekanizması ile etkilediğini göstermiştir. Bu mekanizmalar; atım pompasının aktivitesini azaltmak, hücre içi ve dışı nükleik asitler ile etkileşim ve dış membran geçirgenliğini arttırmaktır. CecA'nın nalidiksik asit ile kombinasyonun dış zar geçirgenliğini daha fazla arttırdığı ve böylelikle sinerjist etki gösterdikleri floresan mikroskobu görüntüleri ile doğrulanmıştır. Zheng ve ark. (2017) tarafından yürütülen bir başka çalışmada ise *Aedes aegypti*'den izole edilen cecropin A2 ve tetrasiklin kombinasyonunun *P. aeruginosa*'ya karşı sinerjist etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sinerjizm *P. aeruginosa*/*Galleria mellonella* modeli ile de doğrulanmıştır. CecA2 tek başına hücre membran lipopolisakkaritine (LPS) bağlanarak, membran geçirgenliğini arttırmakta ve bakteriyel DNA ile de etkileşmektedir. Aynı zamanda tetrasiklin ile kombinasyonu antibiyotığın hücre içerisine alınımını arttırmakta ve böylelikle bakterisidal aktivitede artış göstermektedir. CecA2'nin tetrasiklin ile birlikte kullanımı hemolitik aktivitesini ve memeli hücrelere sitoksisitesini de azaltmaktadır. Wang, Lin ve ark. (2019), cecropin A'nın dezavantajlarını düşünerek, biyoinformatik programları aracılığı ile hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı daha güçlü antibakteriyel etki gösteren, yüksek konsantrasyonlarda dahi hemolitik aktivite göstermeyen ve yüksek sıcaklıklarda, nötral ya da alkali solüsyonlarda, proteinaz K, pepsin ve tripsin varlığında stabil yeni bir CecA türevi peptid geliştirmişlerdir. Cecropin A kimyasal yapısı Şekil 2-12'de gösterilmiştir.



Şekil 2-12: Cecropin A kimyasal yapısı

2.9.1.4. LL-37

LL-37, insanlardan izole edilen doğal immün sistemde görevli bir peptittir. Mukozal yüzeylerde, fagositlerin granüllerinde ve vücut sıvılarında düşük konsantrasyonlarda bulunur. KF akciğerleri gibi inflamasyonlu dokularda ise daha yüksek konsantrasyonlarda vardır. LL-37 kimyasal yapısı Şekil 2-13'te gösterilmiştir. Overhage ve ark. (2008), yaptıkları çalışma ile LL-37'nin çok düşük konsantrasyonlarda bile (0,5 µg/ml) mikropalak üzerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiğini göstermişlerdir.



Şekil 2-13: LL-37 kimyasal yapısı

Diğer AMP'lere benzer şekilde LL-37 de yeni ve daha etkili AMP'ler geliştirmek için şablon olarak kullanılmıştır. LL-37 baz alınarak tasarlanmış iki yeni peptidin, *P. aeruginosa* biyofilm oluşumuna tek başlarına kullanımlarında etkili oldukları, olgun biyofilmin parçalanması için ise antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanımlarında etkili oldukları gösterilmiştir (Mishra ve Wang 2017). AMP'ler ve cerageninler bakteri membranı üzerine etkili membran aktif bileşikler olduklarından, manyetik nanopartiküller ile yapılan kombinasyonları *P. aeruginosa* Xen 5'e karşı sinerjist etki göstermişlerdir. Ayrıca manyetik nanopartiküller, katyonik steroid antimikrobiyal (CSA)-13, CSA-131 ve LL-37'nin biyofilm oluşumunu inhibe etme yeteneklerini arttırmışlardır (Niemirowicz ve ark. 2016). Yapılan bir başka çalışmada ise LL-37 ve CSA-13 manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiştir. Elde edilen formülasyonların vücut sıvılarındaki inhibitör maddelerden daha az etkilendikleri ve fungal biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettikleri gösterilmiştir (Niemirowicz ve ark. 2017). LL-37'nin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal etkinlik göstermesinin yanı sıra, doğal immün sistemin bir parçası olarak bağışıklık tepkisini de modüle ettiği bilinmektedir. Ayrıca, KF akciğerlerinde bakterisidal konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen, düşük pH veya proteoliz nedeniyle etkinliğinin azaldığı düşünülmektedir (Malhotra ve ark. 2019).

KF akciğerlerinde görülen *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı çok sayıda AMP etkinliği test edilmiştir. LL-37 ile ilgili yapılan bir çalışmada *Pseudomonas*'ın 96 kuyulu mikropiçte yapışmasının inhibe edildiği ve oluşan biyofilm miktarının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *Galleria mellonella in vivo* modeli ile de etkinlik doğrulanmıştır (Dean ve ark. 2011). Beaudoin ve ark. (2018), tasarladıkları 6K-F17 isimli membran aktif bir AMP'nin, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı *in vitro* etkinliğini test etmişler ve biyofilmi parçalayarak biyofilm kütesini azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, tobramisin ile birlikte kullanıldığında, düşük doz peptidin tobramisinin etkisini artırarak biyofilm parçalanmasına neden olduğu gösterilmiştir. Kombinasyon tedavisi tek başına kullanılan ilaçların daha düşük dozlarının kullanılabilmesini sağladığından, ilaca bağlı olası advers etkilerin önüne de geçebilmesi açısından önemlidir. Özellikle ÇİD mikroorganizmaların varlığında kombinasyon tedavisi oldukça önem kazanmaktadır.

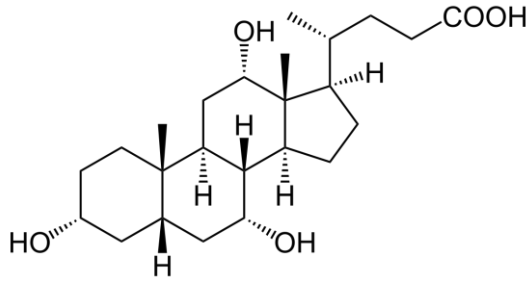
2.9.2. Cerageninler

Cerageninler, AMP'lerin antimikrobiyal ve kimyasal özelliklerini geliştirmek için AMP'lerin peptit olmayan taklitleri olarak geliştirilen yeni bir antimikrobiyal ajan sınıfıdır. Cerageninlerin özellikle Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakteriler, mantarlar, sporlar vb. üzerine antimikrobiyal aktivitelerini araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Oyardi ve ark. 2021; Wnorowska ve ark. 2019; Piktel ve ark. 2017; Hashemi, Holden ve Savage 2018; Bozkurt-Guzel, Oyardi ve ark. 2018; Bozkurt-Guzel ve ark. 2011; Hacıoglu ve ark. 2020).

2.9.2.1. Cerageninlerin Kimyasal Yapısı ve Sentezi

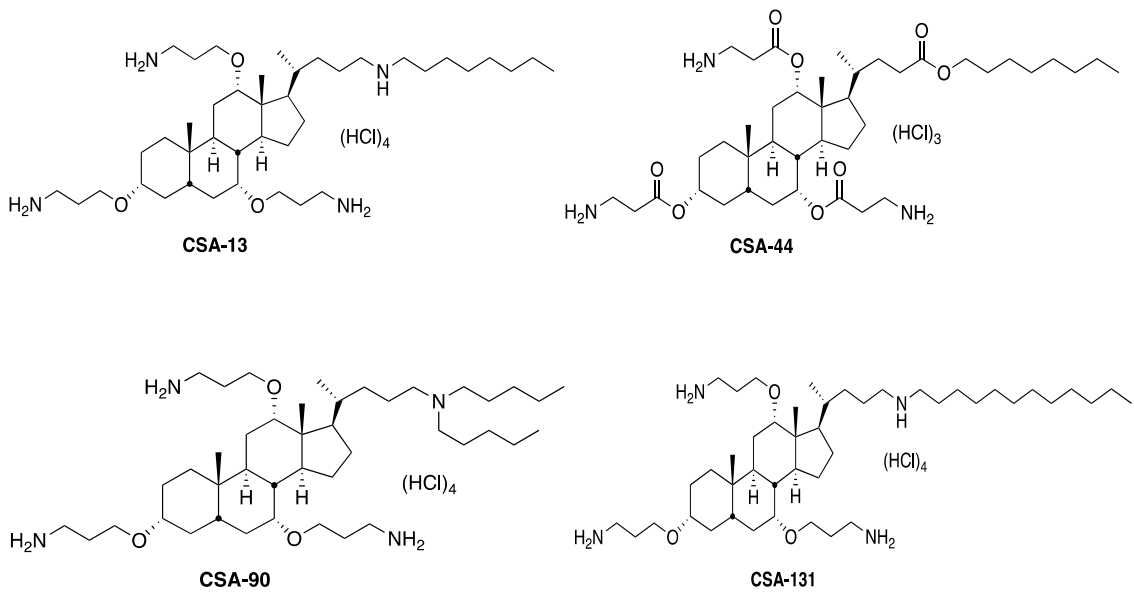
Cerageninler ilk olarak polimiksin B'nin Lipit A'ya bağlanma bölgesine göre tasarlanmıştır (Li ve ark. 1998; Ding ve ark. 2004). Polimiksin B'ye uygun olarak yapılan bu tasarlama *E. coli*'ye karşı iyi bir etki bulunmasını sağlamıştır. Yapı aktivite çalışmaları yapılarak çok sayıda ceragenin sentezlenmiştir. Sentezlenen cerageninler sırası ile numaralandırılmıştır. Yapılan çalışmalar ile aktivitesi dikkat çeken cerageninlere CSA-8, CSA-13, CSA-131 örnek olarak verilebilir. CSA-50'ye kadar olan cerageninler birinci kuşak, 50'den sonra numaralandırılanlar ise ikinci kuşak cerageninler olarak sınıflandırılabilir (Hashemi, Holden ve Savage 2018).

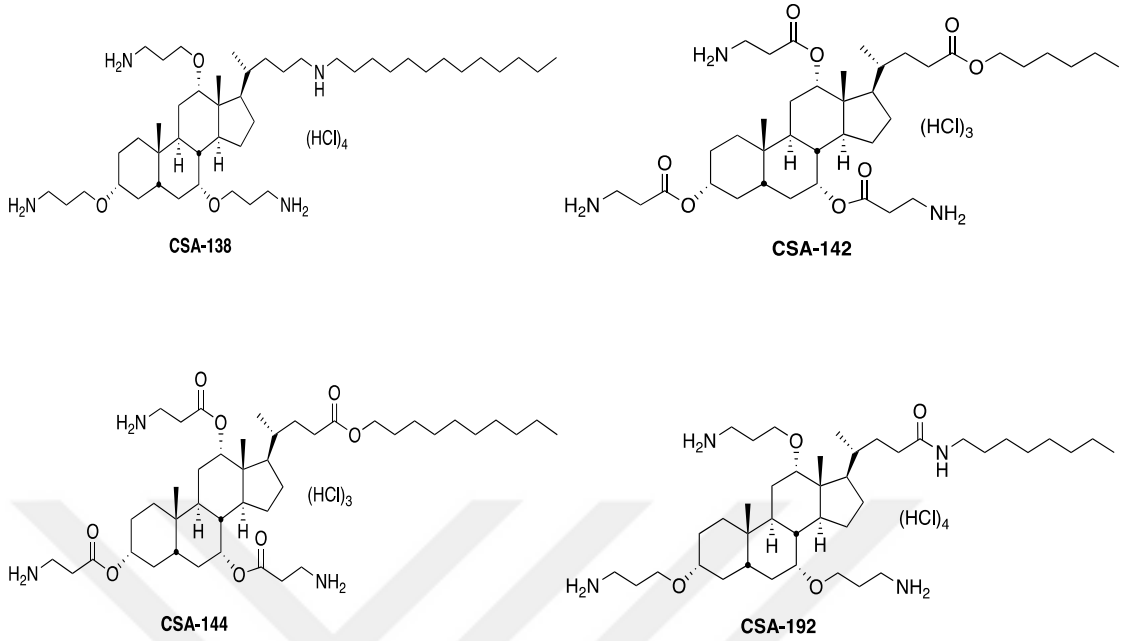
Cerageninlerin kimyasal yapısında bir safra asidi yer almaktadır (Şekil 2-14). Bu safra asidine bağlı D halkasında uzanan zincirin (C24) Gram negatif bakterilere karşı duyarlılıkta önemli bir yer aldığı belirlenmiştir. Bu zincire lipofilik grupların eklenmesi ile hem Gram negatiflere hem de Gram pozitiflere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel etki elde edilmiştir. CSA-13 lipofilik grup içeren cerageninlere örnektir ve geniş spektrumludur. Lipofilik grubun olmaması durumunda Gram pozitiflere karşı aktivite devam ederken, Gram negatiflere karşı aktivitenin yok olduğu gösterilmiştir. İlk tasarlanan grup cerageninlerden olan CSA-8, yapısında lipofilik grup içermediğinden sadece Gram pozitiflere karşı etkilidir ve bu nedenle bu çalışmada da yer almamıştır (Hashemi, Holden ve Savage 2018).



Şekil 2-14: Kolik asidin kimyasal yapısı

Cerageninler arasındaki birincil farklar, C24'teki ester veya aminden uzanan lipid zincirlerinin uzunluklarıdır. Daha uzun lipid zincirleri, cerageninlerin Gram negatif bakterilerin dış zarlarını geçebilmesine ve sitoplazmik membran ile etkileşerek antibakteriyel etki göstermesine neden olmaktadır. Gram pozitiflerde dış membran olmadığından lipid zincirinden etkilenmemektedir. Bir diğer fark ise bazı cerageninlerin ester yapısı içermesi, diğerlerinin ise eter yapısı içermesidir. Yapılan yapı aktivite çalışmaları sonucunda eter bağları ester grupları ile değiştirilmiştir. Ester bazlı bileşiklerin (örneğin CSA-44) büyük ölçekte hazırlanması daha kolaydır, ancak daha az kararlıdır ve suda kendiliğinden hidrolize olabilmektedirler (pH 7'de 37 günlük yarı ömür) (Hashemi, Holden ve Savage 2018). Bu çalışmada, Gram negatif etkinlikleri bilinen CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138, CSA-142, CSA-144 ve CSA-192 kullanılmıştır (Şekil 2-15).





Şekil 2-15: Çalışmada kullanılan cerageninlerin kimyasal yapıları

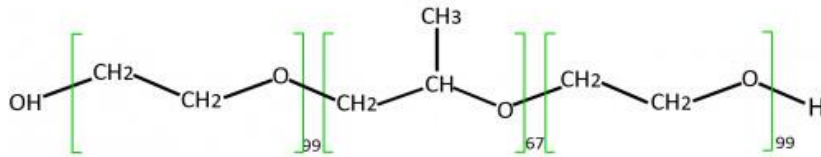
2.9.2.2. Cerageninlerin Etki Mekanizması

Cerageninler de AMP'ler gibi pozitif yüklü moleküllerdir. Yapılarında bulunan pozitif yük, negatif yüklü bakteri membranları ile etkileşmesine ve membran yapısında bulunan ve bakteriyel endotoksin olan LPS ve teikoik asit gibi yapılarla birleşerek etkinliğini kaybetmesine olanak sağlar (Wimley 2010; Ding ve ark. 2002). AMP'lere benzer şekilde cerageninlerle muamele edilmiş Gram negatif bakterilerin dış membranlarında kabarcık benzeri yapılar ortaya çıkmaktadır. Fakat dış zarın zarar görmesi yeterli olmadığından cerageninlerin bakteri ölümünü sağladığı gerçek hedef bakterilerin hücre membranıdır. Cerageninlerin hücre membranı ile birleşmesi sonucunda, membranda geçici defektler oluşur, membran depolarize olur ve sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (Hashemi, Holden ve Savage 2018). Cerageninlerin antifungal ve antiviral etki mekanizmalarının da benzer olduğu düşünülmektedir. Özellikle zarflı virüslerin yapısında bulunan lipid zarfta değişiklikler elektron mikroskobu ile gösterilmiştir (Howell ve ark. 2009). Mantarların da hücre membranında hasara ve işlev bozukluğuna neden olduğu düşünülmektedir. Hem AMP'lerin hem de cerageninlerin *C. albicans*'ın hücre membranını hedeflendikleri ve membranda deformasyona neden oldukları floresan ve elektron mikroskopları ile gösterilmiştir (Durnas ve ark. 2016).

2.9.2.3. Cerageninler ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Tabletler, parenteral solüsyonlar, oral solüsyonlar gibi konvansiyonel ilaç dozaj şekilleri, düşük biyoyararlanım, ilk geçiş etkisi, intolerans, kararsızlık, plazma kan düzeylerinde stabilite olmaması ve istenmeyen etkiler gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu istenmeyen etkileri ortadan kaldırmak ve ilaç etkinliğini arttırmak için ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Ayrıca, antimikrobiyallerin biyofilmlere etkileri çok kısıtlıdır ve yüksek dozda kullanımı gerektirir. Yüksek dozlarda kullanım ise antimikrobiyallerin sitotoksik etkilerini açığa çıkarmaktadır. Bu durumdan kaçınmak için de ilaç taşıyıcı sistemler sıklıkla test edilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemler lipozomlar, emülsiyonlar, mikroküreler ve kolloidal jeller şeklinde üretilebilir.

Bir ilaç taşıyıcı sistem olan pluronikler (diğer adıyla poloksamer), suda çözünebilir, polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit (PEO-PPO-PEO)'in üç bloklu kopolimerleridir ve FDA tarafından farmasötik kullanım için onaylanmışlardır. Misel oluşumu kritik misel konsantrasyonuna, sıcaklığa ve polimer bileşimine bağlıdır. Bu ailenin en bilinen üyesi Pluronik F127'dir (Şekil 2-16). Pluronik F127 tarafından oluşturulan miseller sıcaklık değişikliklerine duyarlıdır (Shriky ve ark. 2020; Wang, Williams ve ark. 2019).



Şekil 2-16: Pluronik F127 kimyasal yapısı

Cerageninlerin Pluronik F127 ile kapsüllenmesi zar geçirgenliğine katkı sağlayarak sitotoksisiteyi azaltabilmektedir. Böylelikle yüksek konsantrasyonlarda kullanımı sağlanabilir. Yapılan çalışmalar, ilaç taşıyıcı sistemlerin cerageninlerin antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklerini değiştirmedığını göstermiştir (Oyardi ve ark. 2021; Hashemi, Holden ve Savage 2018). Sitotoksisitenin bir ölçüsü olan hemolitik aktivite ölçüldüğünde, CSA-13'ün bakterisidal konsantrasyonundan çok daha yüksek konsantrasyonlarda (50 µg/ml) eritrositleri hemolize uğrattığı belirlenmiştir (Moscoso ve ark. 2014). Bu çalışmada, sitotoksisiteyi azaltmak ve antibiyofilm etkinliği korumak

için CSA-131'nin poloksamer formu oluşturulmuş ve test edilmiştir. Pluronik F127, düşük sitotoksositeye sahip olması, çözünürlük kapasitesinin yüksek olması, ısı değişimi ile kolayca ilaç salma özelliği gibi avantajları nedeniyle tercih edilmiştir.

Bir diğer ilaç taşıyıcı sistemler manyetik nanopartiküllerdir. CSA-131 ve manyetik nanopartiküllerin kombinasyonu ile ilgili yapılan bir başka çalışma ise kolon ve akciğer kanser hücrelerine olan sitotoksik etkinin kombinasyon durumunda artış gösterdiğini belirlemiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalara paralel şekilde cerageninlerin manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonlarının cerageninlerin hemolitik aktivitesini azalttığı bulunmuştur (Piktel ve ark. 2020).

2.9.3. AMP'ler ve Cerageninlerle İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar

Bozkurt-Guzel ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, CSA-13'ün *P. aeruginosa* planktonik hücrelerine karşı antimikrobiyal etkinliği yüksek (MIC₉₀: 2 µg/ml) bulunmuştur. *P. aeruginosa*'nın tek başına veya *C. albicans* ile birlikte yaptığı polimikrobiyal biyofilmlere ise cerageninlerin etkisi AMP'lere göre daha fazla bulunmuştur (Hacioglu ve ark. 2020).

Günümüzde, AMP'lerin cerageninler ile birlikte kombinasyonlarının etkili olabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar LL-37 seviyelerinin, idrar yolu enfeksiyonu döneminde hem hastanın idrarında hem de plazmasında önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Babikir ve ark. 2018). LL-37'nin idrar yolu enfeksiyonu etkeni *E. coli*'ye karşı cerageninlerle birlikte kullanıldığında artmış bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada insan mesane epitel hücre hattı olan T24 (ATCC® HTB4™) üzerine LL-37 ve cerageninlerin güçlü bakterisidal etki gösterdiği dozlarda sitotoksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir. LL-37'nin cerageninler ile kombinasyonunun sadece hücre dışı değil hücre içi bakteri konsantrasyonunu azaltmada da tek başlarına kullanımlarından daha etkili olduğu belirlenmiştir (Wnorowska ve ark. 2019). *In vivo* yürütülen bir çalışmada domuzların derilerinde oluşturulan yanık yaralarda *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumu sağlanmıştır. CSA-44 ve CSA-144'ün jel, krem ve sulu formülasyonları test edildiğinde %0,05 CSA-44 ve CSA-144 sulu formülasyonlarının pozitif kontrolden daha etkili oldukları belirlenmiştir (Savage 2020).

AMP'ler ve cerageninler birincil olarak antiinfektif ajanlar olarak çalışılsalar da antimikrobiyal etki mekanizmasına benzer şekilde antitümör aktivite gösterdiğine dair ikna edici kanıtlar bulunmaktadır (Wnorowska ve ark. 2020). AMP'ler ve cerageninler

yapılarındaki pozitif yük nedeniyle negatif yüklü bakteri hücre membranına bağlanmakta ve hücre geçirgenliğini arttırarak etki göstermektedirler. Ökaryotik hücrelerin membranlarının dış yüzeyinde pozitif yüklü kemoterapötiklerin ilgisini çekebilecek bir negatif yük bulunmamaktadır. Fakat bunun aksine kanser hücrelerinin membranlarının dış yüzeyine fosfatidilserin eklenmesinden dolayı kısmi negatif yüke rastlanır ve bu durum membran aktif ajanlar olan AMP ve cerageninlerin antikanser etkilerini açıklamaktadır (Wnorowska ve ark. 2020). Kurado ve ark. (2013) katelisinidin peptidlere benzer şekilde CSA-13'ün de kolon kanseri türevi hücre hattı olan HCT116'nın proliferasyonunu doz bağımlı olarak baskıladığını ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

Yapılan literatür çalışmasında, cerageninlerin ve AMP'lerin *P. aeruginosa* biyofilmine olan etkileri ile ilgili kapsamlı bir çalışma bulunmamakla birlikte, konakçı mikroorganizma ilişkileri açısından değerlendirildiğinde bu çalışma bir ilk olma özelliğindedir. Çalışmamızda cerageninlerin ve AMP'lerin, insan havayolu epitel hücre hattı üzerinde oluşan *P. aeruginosa* biyofilmine karşı etkileri araştırılmıştır. CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131-poloksamer (CSA-131P), CSA-138, CSA-142, CSA-144 ve CSA-192 olmak üzere dokuz adet ceragenin ve magainin, cecropin ve LL-37 olmak üzere üç adet AMP çalışılmış ve akciğer kanser hücre hattına olan sitotoksik etkileri de belirlenmiştir. Ayrıca, sonuçlar floresan mikroskobu kullanılarak da doğrulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

Bu çalışmada cerageninlerden CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131P, CSA-138, CSA-142, CSA-144 ve CSA-192 kullanılmıştır. AMP'lerden ise magainin, cecropin ve LL-37 çalışmaya dâhil edilmiştir. Cerageninler kolik asit scaffold-yapılandırma tekniği ile (Prof.Dr. Paul B. SAVAGE tarafından) sentezlenmiştir. Peptidler ve CSA-131P hazırlamak için kullanılan Pluronic® F127 (2,3-bis- [2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil]-2H-tetrazolium-5-karboksanilid ve menadion) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

3.2. Antimikrobiyal Maddelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan cerageninler ve AMP'lerin her birinden uygun miktarlarda hassas terazide (Sartorius,CP224S) tartılarak, yeterli miktarda uygun çözücünde (distile su) çözündürüldükten sonra stok çözeltileri hazırlanmış ve -20°C'lik derin dondurucuda en fazla altı ay bekletilmiştir.

Pluronic F127 kuru tozundan, çözünene kadar ısı uygulanarak 15 mg/ml konsatrasyonda su içerisinde solüsyonu hazırlanmıştır. CSA-131, %4 Pluronic F-127 ile birleştirilerek CSA-131-poloksamer formu elde edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.3. Bakteri Suşu ve Kültür Koşulları

Çalışmada biyofilm pozitif *P. aeruginosa*-GFP (ATCC® 10145GFP™) suşu kullanılmıştır. Bu suşun -80°C'deki derin dondurucuda saklanan kültürlerinden petri kutusundaki triptik soy agar (TSA) besiyerine azaltma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra oluşan birbirine benzeyen 3 - 4 koloniden, içinde 5 ml Mueller Hinton buyyonu (MHB) bulunan tüplerde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Ekim yapılan bu tüplerdeki bakteri süspansiyonlarının McFarland'da 0,5 absorbsiyon veren, 10⁸ kob/ml'lik süspansiyonları elde edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan bu bakteri süspansiyonları mikrodilüsyon deneylerinde kullanılmak üzere MHB'de seyreltilerek inokulumlar hazırlanmıştır. Bunun için 10⁸ kob/ml'lik bakteri süspansiyonundan 10⁶ kob/ml'lik inokulumunun hazırlanabilmesi için 1/100 oranında seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan inokulumlardaki bakteri sayısını saptamak amacıyla steril fizyolojik tuzlu suda 10³ ve 10⁴ oranında seyreltmeler

yapılmış ve hazırlanan her seyreltmeden 100'er µl alınarak petri kutusundaki TSA besiyerinin tüm yüzeyine yayılmıştır. Petri kutuları 37°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra, ertesi gün oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü ile çarpılarak kob/ml belirlenmiştir.

3.4. Minimum İnhibitor Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) Tespiti

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal maddelerin MİK değerlerini saptamak için, 50 µl katyon ilaveli (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) MHB içerisinde antimikrobiyal maddelerin istenilen son konsantrasyonlarının 2 katı konsantrasyonu hazırlanarak, mikroplağın 1 ve 2 numaralı kolonlarına eklenmiştir. Mikroplağın 1 numaralı kolonu dışındaki tüm diğer kuyularına katyon ilaveli (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) MHB'den 50'şer µl dağıtılmış ve çift katlı seri dilüsyonları yapılmıştır. En son mikroplağın tüm kuyularına, kuyulardaki son konsantrasyonu 5×10^5 kob/ml olacak şekilde 10^6 kob/ml'lik bakteri süspansiyonundan 50'şer µl ilave edilmiştir. Bakteriyel üremeyi kontrol etmek için mikroplağın son bir sırasına sadece bakteri konulmuştur. Deneyin doğruluğunu kontrol etmek için standart antibiyotik olarak siprofloksasin, standart bakteri olarak ise *P. aeruginosa* ATCC 27853 deneyde kullanılmıştır. Mikroplağın üstü steril bir kapak ile kapatıldıktan sonra, buharlaşmaması için naylon bir kılıfa konulmuştur. Mikroplak 37°C'de 18-20 saat etüvde inkübe edilmiştir. Ertesi gün üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Antimikrobiyallerin MBK'ları da belirlenmiştir. MİK'ler belirlendikten sonra, üreme göstermeyen her bir kuyudan ikişer kez olmak üzere 0,01 ml numuneler alınarak petri kutusundaki TSA üzerine damlatılmıştır. Hazırlanan petri kutuları 37°C'de 18-20 saat etüvde inkübe edilmiştir. MBK'lar, canlı bakteri sayısından en az % 99,9 (üç log) azalma sağlayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Tüm deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Deneyler, CLSI tarafından belirlenen standartlara uygun olarak yapılmıştır (CLSI 2006; CLSI 2018).

3.5. Hücre Kültürü

İnsan Akciğer Karsinoma hücresi olan A549 hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere -152°C'lik derin dondurucuda saklanmış ve

çalışma öncesinde çözündürülmüş ve 3.4.1. bölümünde anlatılan besiyeri içerisinde mikrobiyolojik güvenlik kabini kullanılarak üretilmiştir.

3.5.1. Besiyerinin Hazırlanması

Besiyeri aşağıdaki formülasyon kullanılarak hazırlanmıştır.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- %10 Fetal Bovine Serum (FBS)
- 2mM L-glutamin
- %1 Penisilin-streptomisin çözeltisi

Tüm besiyeri bileşenleri 37°C sıcaklığa getirilmiştir. Uygun miktarlarda karıştırılmış ve 500 ml hacminde 0,22 µm vakum filtre sistemi (Sartorius) kullanılarak steril edilmiştir.

Ko-kültür deneylerinde farklı olarak bakterilerin hücre tek tabakalı yapısını bozmasını engellemek amacıyla arjinin eklenmiş farklı bir deney besiyeri oluşturulmuştur. DMEM içerisine %10 FBS, 2mM L-glutamin ve %4 arjinin eklenmiş ve filtrasyonla steril edilmiştir. Antibiyotik ko-kültürdeki bakteriyi etkilememesi için besiyerine eklenmemiştir.

3.5.2. Hücrelerin Çözünmesi

Derin dondurucuda bekletilen donmuş hücre 37°C'deki su banyosu içerisinde hızlıca çözündürülmüştür. İçerisindeki dondurma sıvısını uzaklaştırmak için, santrifüj tüpüne 9 ml besiyeri konulmuş ve yaklaşık 1 ml hücre steril tek kullanımlık pasteur pipet ile alınıp 9 ml besiyeri üzerine eklenmiştir. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek dondurma sıvısı uzaklaştırılmıştır.

3.5.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Dondurma sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml besiyeri tüpün alt kısmında kalan hücre üzerine eklenmiş ve resüspande edilmiştir. Daha sonra hücre, içerisinde 4 ml besiyeri bulunan T25 flaska aktarılmıştır. 37°C ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün hücre canlılığı mikroskop altında incelenerek besiyeri değiştirilmiştir. Besiyeri her 2-3 günde bir değiştirilerek hücreler çoğaltılmıştır.

3.5.4. Alt kültürleme

Hücreler belirli hızda büyüdükleri için belirli bir süre sonra flask yüzeyini kaplamaktadırlar. Hücreler, flask yüzeyinin ortalama %80'ini kapladığında

tripsin/EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmış ve büyümelerine devam etmeleri için başka bir flaska aktarılmışlardır. Bunun için öncelikle flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmış, daha sonra üzerine fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) eklenip, dökülerek yıkama işlemi yapılmıştır. 3 ml %0,05'lik tripsin/EDTA solüsyonu flaska eklenmiş ve en fazla 10 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı tespit edilmiştir. 9 ml besiyeri flask içerisine eklenerek, hücre içeren tüm sıvı çekilmiş, 5 dakika 1.500 rpm'de santrifüj edilmiş, çöken hücreler yeni besiyeri ile resüspande edilerek yeni bir flaska alınmıştır.

3.5.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler her üretim aşamasını takiben DMEM içerisinde %5 DMSO solüsyonu kullanılarak dondurulmuş ve -152°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.6. Sitotoksitenin Belirlenmesi

A549 hücresinde cerageninlerin (CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131P, CSA-138, CSA-142, CSA-144, CSA-192) ve AMP'lerin (magainin, cecropin, LL-37) sitotoksitelerinin belirlenebilmesi için çalışmalar yapılmıştır. T75 flasklarda besiyeri içerisinde hücre üretilmiştir. Hücreler her gün kontrol edilmiş, iki gün ara ile besiyeri değiştirilmiş ve en az %80 konfluent olduktan yani tüm alanı kapladıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Üzerine 3 ml Tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek en fazla 10 dakika olmak üzere 37 °C ve %5 CO₂'li etüvde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden arındırıldığından invert mikroskop yardımıyla emin olunduktan sonra hücreler bir tüp içerisine aktarılmıştır. Tripsinin etkilerinden kurtulmak için üzerine besiyeri ilave edilmiş ve 5 dakika 1.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırılmış ve hücreler besiyeri ile tekrar süspande edilmiştir. Hücrelerin sayısının belirlenmesi için 10 µl hücre süspansiyonu ile 10 µl Tripan mavisi karıştırılmış ve 10 µl örnek alınarak hemositometre üzerine konulmuştur. Mikroskop kullanılarak hücreler sayılmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak ml'deki hücre sayısı belirlenmiştir.

ml'deki hücre sayısı= Sayılan hücre sayısı x Seyreltme faktörü x 10.000

96 kuyulu düztaban mikroplağın her bir kuyusuna 10⁴ hücre gelecek şekilde hesaplamalar yapılmış ve hücreler kuyulara eklenmiştir. 24 saat 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda antimikrobiyal maddelerin artan konsantrasyonları (µg/ml) (cerageninler için 5, 10, 20, 50, 75 ve 100; AMP'ler için 5,

10, 20, 50, 75, 100, 150 ve 200) kuyulara ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Antimikrobiyal maddelerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksisitelerini belirlemek için MTT testi kullanılmıştır.

Toz halinde bulunan MTT'nin PBS içerisinde 5 mg/ml stok solüsyonu hazırlanmıştır. MTT deneyi için kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 10 µl MTT solüsyonu ve 90 µl fenol kırmızısı içermeyen DMEM eklenerek 3 saat inkübe edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol olarak boş bir kuyuya sadece 100 µl besiyeri ve başka bir kuyuya da 90 µl besiyeri + 10 µl MTT solüsyonu eklenmiştir. İnkübasyon sonucunda üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için üzerine 100 µl DMSO ilave edilmiş ve çalkalayıcıda 10 dakika bekletilmiştir. 96'lık well plate ELISA Reader (EON-BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ile 570 nm'de sonuçlar okutularak belirlenmiştir. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir.

GraphPad Prism 8 programı kullanılarak hücrelerin % 50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri hesaplanmıştır.

3.7. Hücre İçi Bakteri İnhibisyonunun Belirlenmesi

IC₅₀ değerleri belirlenen cerageninlerin ve AMP'lerin 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonları ile çalışılmaya karar verilmiştir. Cerageninlerin ve AMP'lerin hücre içi bakterilere olan etkisi test edilmiştir (Chi ve ark. 1991; Noore ve ark. 2013). Antimikrobiyallerin, hücre içi bakterilere olan aktivitesinin belirlenmesi için A549 hücre kültürü ile çalışılmıştır. *P. aeruginosa*-GFP suşu enfeksiyon oranı (MOI: Multiplicity of infection) 2 olacak şekilde hücrelere ilave edilmiştir.

MOI: Koloni Oluşturan Birim (kob)/Hücre sayısı

Bunun için ilk olarak 12 kuyulu düztaban mikropiğin her bir kuyusuna 2x10⁵ sayıda hücre ekilmiştir. Hücreler 2 gün boyunca tek tabakalı oluncaya kadar bekletilmiştir. *P. aeruginosa*-GFP suşu bir gün önce TSA besiyerinde çoğaltıldıktan sonra oluşan tek düşmüş kolonilerden alınarak McFarland cihazı ile 10⁸ kob/ml'ye denk gelecek şekilde 0,5 McFarlanda deney besiyeri içerisinde ayarlanmıştır. Deney besiyeri kullanılarak 4x10⁵ kob/ml'ye seyreltilmiştir. Hücre iki kere PBS ile yıkanmış ve hücre üzerine 1 ml bakteri süspansiyonundan eklenmiştir. 1 saat boyunca 37 °C'de %5'lik CO₂'li etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda 2 kere PBS ile yıkanmıştır. 50 µg/ml gentamisin solüsyonu hazırlanmış ve 1 ml hücre üzerine eklenerek hücre dışı

bakterilerin öldürülmesi için 1 saat inkübatörde bekletilmiştir (Garcia-Medina ve ark. 2005). Tekrar PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Antimikrobiyaller 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarda ortama eklenerek bir gece 37°C’de %5’lik CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün PBS ile yıkama işleminden sonra DMEM içerisinde %0,5 Triton-X solüsyonu ile hücreler parçalanarak açığa çıkan hücre içi canlı bakteri sayıları canlı bakteri hücre sayım metodu ile belirlenmiştir. Bunun için kuyulardan süspansiyonlar toplanmış, gerekli seyreltmeler yapılarak TSA besiyerine damlatma yolu ile tatbik edilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler sayılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir.

3.8. Cerageninler ve AMP’lerin Statik Ko-kültür Üzerine Etkileri

Üretilen A549 hücreleri inverted mikroskobu kullanılarak sayılmış ve 24 kuyulu hücre kültürü plağında her bir kuyuya 2x10⁵ hücre denk gelecek şekilde hesaplanarak uygun miktarda eklenmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂’li etüvde bir hafta boyunca yoğun tek tabakalı olması için bekletilmiş ve besiyeri 2-3 gün arayla değiştirilmiştir (Anderson ve ark. 2008; Anderson ve ark. 2013; Moreau-Marquis ve ark. 2010).

Bakteri bir gün önce TSA besiyerine ekilmiş, 37°C’de etüvde bir gece inkübe edildikten sonra oluşan kolonilerden alınarak 5 ml BHI besiyeri içine eklenmiş ve 37°C’de 18 saat büyütülmüştür. Ertesi gün McFarland cihazı kullanılarak, DMEM, %10 FBS, 2mM glutamin ve %0,4 arjinin içeren deney besiyerinde McFarland 0,5 yani 10⁸ bakteri yoğunluğuna ayarlanmıştır.

Antibiyotiklerin 4 katı konsantrasyonları (µg/ml) (80, 40, 20 ve 4) uygun tüplerde deney besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Yoğun tek tabakalı A549 hücreleri üzerindeki besiyeri aspire edilmiş ve bir kez PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyuya 1 birim antibiyotik (125 µl) ve 3 birim bakteri (375 µl) eklenmiştir. Başlangıçta ekilen A549 hücrelerinin sayısına göre yaklaşık 30:1’lik bir enfeksiyon sıklığında *P. aeruginosa* ile inoküle edilmiştir. Bu miktar 24 kuyulu plakta her bir kuyu için 1x10⁶-6x10⁶ kob/ml’ye denk gelmektedir. Kontrol amacıyla kuyulardan birine antibiyotik eklenmeden sadece bakteri eklenmiştir.

Elde edilen ko-kültür 37°C’de ve %5 CO₂’li etüvde 2, 4 ve 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu metod, epitel hücreleri üzerinde *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumu ile sonuçlanmıştır. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılıp sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. Inverted mikroskop kullanılarak hücrenin

katman bütünlüğü kontrol edilmiştir (Anderson ve ark. 2008; Anderson ve ark. 2013; Moreau-Marquis ve ark. 2010).

İnkübasyon sonunda, planktonik bakterileri uzaklaştırmak için ko-kültür 2-3 kez 0,5 mL PBS ile yıkanmış ve epitel hücrelerinin parçalanması ve biyofilmin dağılması için 0,5 mL DMEM içinde %0,5'lik Triton-X 100 ile 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 dakika vortekslenmiş ve süspansiyon toplanarak seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlar TSA besiyerine damlatma yöntemi ile ekilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir ve kob'u belirlemek için ertesi gün koloniler sayılmıştır. (Anderson ve ark. 2008; Anderson ve ark. 2013; Moreau-Marquis ve ark. 2010). Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

3.9. Ko-kültürün Sitotoksositeye Etkisi

Bakteri ve antimikrobiyal maddelerin epitel hücreler üzerine toksisitelerini belirlemek için, PBS ile yıkama yapılmadan ve epitel hücreleri tahrip edilmeden önce biyofilm üzerindeki süpernatant toplanmıştır ve -20°C'de saklanmıştır. Bu süpernatant 16.000 g'de santrifüj cihazında 2 dakika santrifüj edilmiştir. LDH sitotoksosite test kiti (Promega, Madison, USA) kullanılarak 10 µl süpernatant iki kez test edilmiş ve LDH salınımı belirlenmiştir. (Price ve ark. 2016).

LDH deneyi için öncelikle çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. 10 µl süpernatant, 100 µl LDH reaksiyon karışımı 96'lık mikropiğin her bir kuyusuna eklenmiştir. Arka plan kontrolü olarak hücre besiyeri, düşük kontrol olarak sadece hücre içeren kuyunun süpernatantı, yüksek kontrol olarak ise parçalama solüsyonu (Triton X) ile parçalanmış hücrenin süpernatantı kullanılmıştır. Ayrıca deneyin doğruluğunu test etmek amacıyla LDH enzimi içeren 5 µl pozitif kontrol de eklenmiştir. Örnekler ve LDH reaksiyon karışımı eklenmiş mikropiğler 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Sonuçlar ELISA Reader (EON-BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ile 450 nm'de okunmuştur. Deneyler iki kere tekrarlanmıştır.

Yüzde sitotoksosite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% sitotoksosite: $(\text{Test Örneği Absorbansı} - \text{Düşük Kontrol Absorbansı}) / (\text{Yüksek Kontrol Absorbansı} - \text{Düşük Kontrol Absorbansı}) \times 100$

3.10. Floresan Mikroskobu ile Görüntüleme

Anabilim dalımızda bulunan floresan mikroskobu (Olympus cxx4) kullanılarak hücre ve bakterinin oluşturduğu biyofilm tabakası görüntülenmiştir. Bunun için, *P.*

aeruginosa-GFP'yi görüntülemek için floresan mikroskobu, hücre tabakasını görüntülemek için ise inverted mikroskobu kullanılmıştır. Tüm deneylerde yeşil floresan proteini kodlayan plazmid içeren *P. aeruginosa*-GFP suşu kullanılmıştır. Biyofilm oluşum yoğunluğu tespit edilmiş ve biyofilm oluşumun inhibisyonu floresan mikroskobu ile doğrulanmıştır (Moreau-Marquis ve ark. 2010).

3.11. İstatistiksel Analiz

Sonuçları istatistiksel olarak değerlendirmek için GraphPad Prism versiyon 8 (San Diego, CA, USA) programı kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak hesaplanmıştır. Veri analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc olarak Bonferroni analiz testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. P değeri 0,05'den düşük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MİK ve MBK Sonuçlarına Ait Bulgular

Cerageninlerin ve AMP'lerin *P. aeruginosa*-GFP suşuna karşı etkinliğini belirlemek için MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. Deneyin doğruluğunu kontrol etmek için *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı standart antibiyotik olan siprofloksasinin CLSI tarafından önerilen sınırlar içerisinde olmasına (0,12-1 µg/ml) dikkat edilmiştir (CLSI 2018). CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-131P, CSA-138, CSA-142, CSA-144 ve CSA-192 için MİK değerleri (µg/ml) sırası ile 16, 8, 32, 4, 8, 16, 8, 32 ve 32 olarak belirlenirken; MBK değerleri (µg/ml) sırası ile 32, 16, 64, 4, 8, 16, 8, 64 ve 64 olarak belirlenmiştir. Test edilen AMP'lerin hepsinin MİK ve MBK değerleri 128 µg/ml'den büyük bulunmuştur. Elde edilen MİK ve MBK verileri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Cerageninlerin ve AMP'lerin *P. aeruginosa*-GFP suşuna karşı MİK ve MBK değerleri (µg/ml)

Antimikrobiyal maddeler	<i>P. aeruginosa</i> -GFP		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
	MİK	MBK	MİK
CSA-13	16	32	
CSA-44	8	16	
CSA-90	32	64	
CSA-131	4	4	
CSA-131P	8	8	
CSA-138	16	16	
CSA-142	8	8	
CSA-144	32	64	
CSA-192	32	64	
Magainin	>128	>128	
Cecropin	>128	>128	
LL-37	>128	>128	
Siprofloksasin			0,5

4.2. Sitotoksosite Sonuçlarına Ait Bulgular

Cerageninlerin ve AMP'lerin A549 hücre hattına olan sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. GraphPad Prism 8 programı kullanılarak IC₅₀ değerleri belirlenmiş ve ayrıca test edilen konsantrasyonların sitotoksisiteleri istatistiksel olarak belirlenmiştir. Cerageninler için IC₅₀ değerleri 11,37±3,88 ila 40,05±2,65 µg/ml aralığında belirlenirken, AMP'ler için 40,76 ± 5,35 ila >200 µg/ml aralığında belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

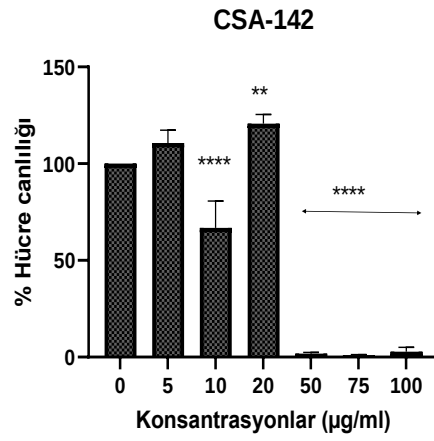
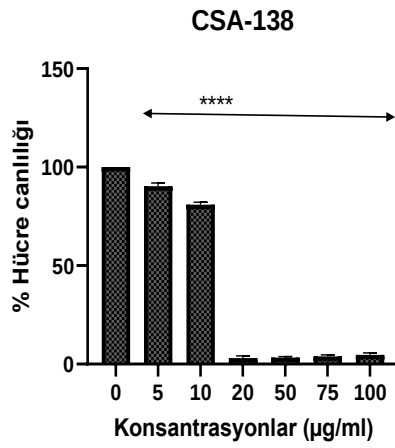
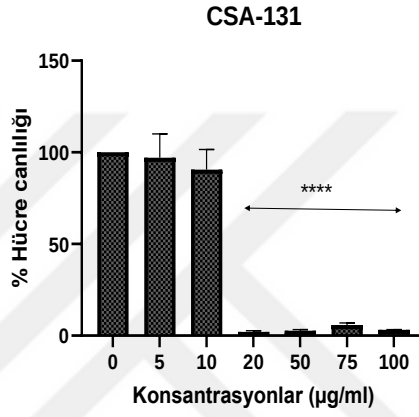
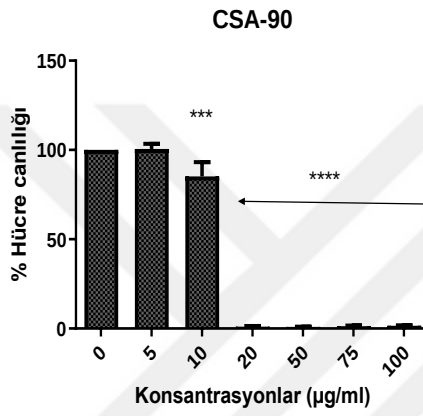
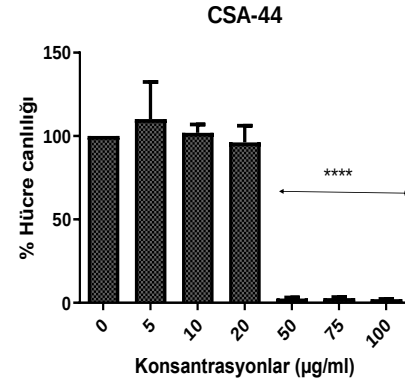
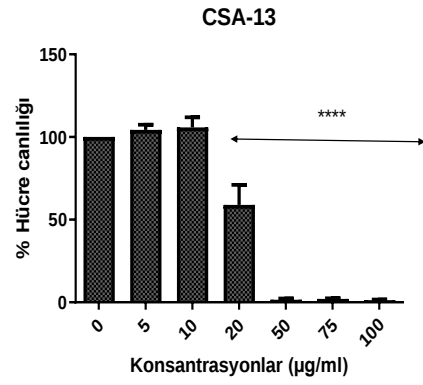
Tablo 4-2: Cerageninlerin ve AMP'lerin A549 hücrelerine karşı MTT yöntemi ile belirlenen IC₅₀ (µg/ml) değerleri

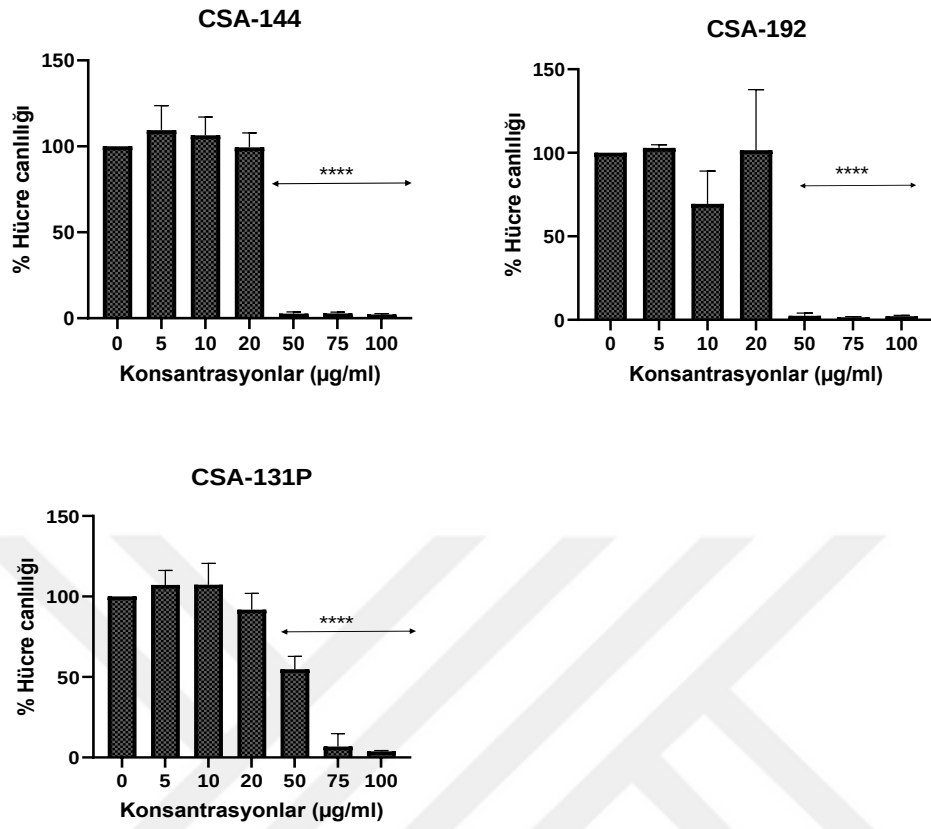
Cerageninler	IC ₅₀ değerleri (µg/ml)
CSA-13	20,68 ± 4,34
CSA-44	26,03 ± 0,95
CSA-90	11,62 ± 4,05
CSA-131	11,37 ± 3,88
CSA-131P	40,05 ± 2,65
CSA-138	11,78 ± 2,38
CSA-142	36,15 ± 1,25
CSA-144	26,03 ± 2,08
CSA-192	27,65 ± 5,02
Magainin	>200
Cecropin	>200
LL-37	40,76 ± 5,35

Antimikrobiyal maddelerin sitotoksosite profilleri grafikler ile gösterilmiştir. CSA-90 ve CSA-142'nin 10 µg/ml konsantrasyonları ile CSA-13 ve CSA-131'in 20 µg/ml ve üzeri konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkiye sahiptir ($P < 0,05$). CSA-44, CSA-144, CSA-192 ve CSA-131P'nin ise 50 µg/ml ve üzeri konsantrasyonları sitotoksosite açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,0001$). CSA-138 ise diğer cerageninlerden daha düşük konsantrasyonlarda (5 µg/ml) bile sitotoksik etki göstermiştir. AMP'lerden magainin test edilen konsantrasyonlarda sitotoksositeye sebep olmazken, cecropin ve LL-37 ise 50 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksositeye neden olmuştur ($P < 0,01$).

Cerageninlerin sitotoksisite profillerini gösteren grafikler Şekil 4-1’de ve AMP’lerin sitotoksisite profillerini gösteren grafikler ise Şekil 4-2’de gösterilmiştir.

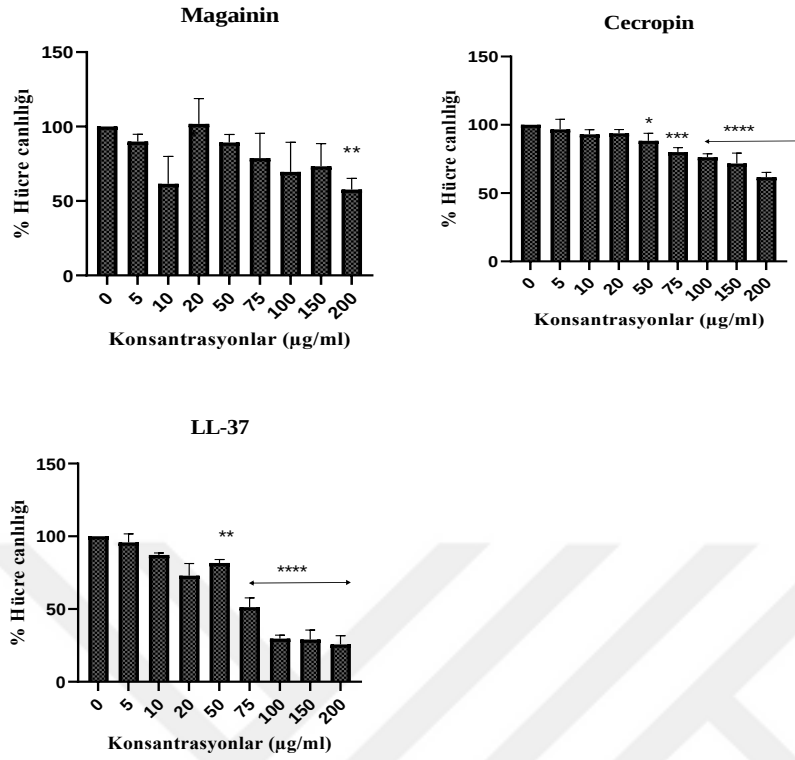






Şekil 4-1: Cerageninlerin A549 hücre hattına sitotoksisitei

*, $P < 0,05$ **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ ****, $P < 0,0001$

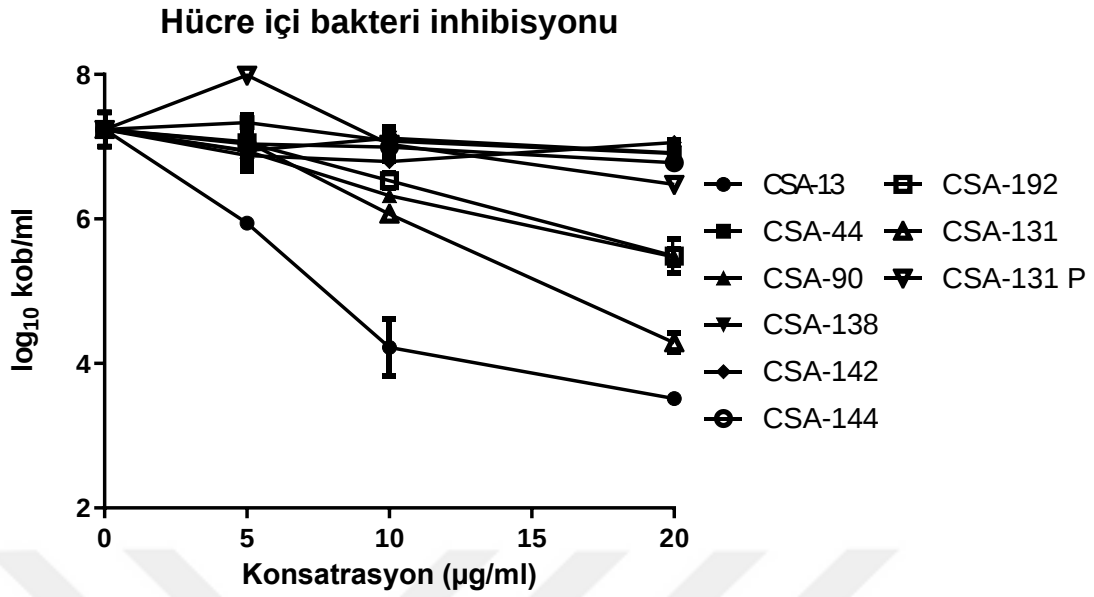


Şekil 4-2: AMP'lerin A549 hücre hattına sitotoksisiteleri

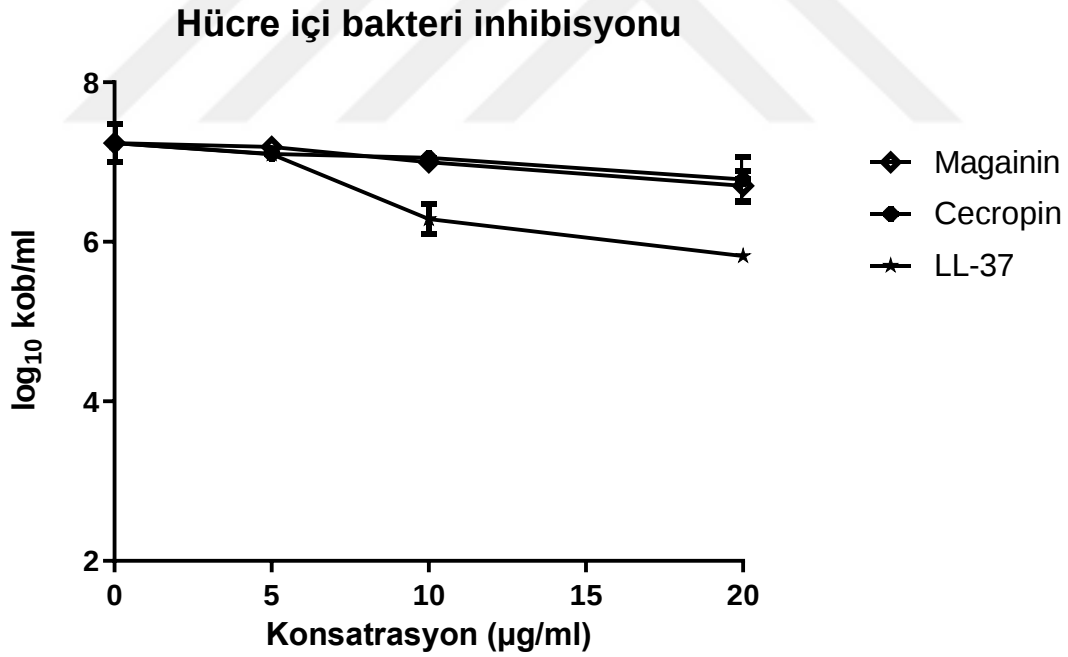
*, $P < 0,05$ **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ ****, $P < 0,0001$

4.3. Hücre İçi Bakteri İnhibisyonuna Ait Bulgular

Cerageninlerin ve AMP'lerin hücre içindeki *P. aeruginosa* bakterilerine karşı etkinlikleri belirlenmiş ve elde edilen bulgular GrapPad Prism programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4-3 ve 4-4'te gösterilmiştir. CSA-13'ün 10 µg/ml ve yüksek konsantrasyonları hücre içi bakteri sayısını en az 3 log azaltmışlardır. CSA-131'in 20 µg/ml konsantrasyonu da benzer şekilde 3 log'luk bir azalmaya neden olmuştur. CSA-90 ve CSA-192'nin 20 µg/ml konsantrasyonları uygulandığında hücre içi bakteri sayısı yaklaşık 2 log azalma göstermiştir. AMP'lerden sadece LL-37 hücre içi bakterilere etki göstermiştir. LL-37'nin 20 µg/ml konsantrasyonu hücre içi bakteri sayısını yaklaşık 2 log azaltmıştır (Şekil 4-4).



Şekil 4-3: Cerageninlerin hücre içi *P. aeruginosa*'ya etkisi



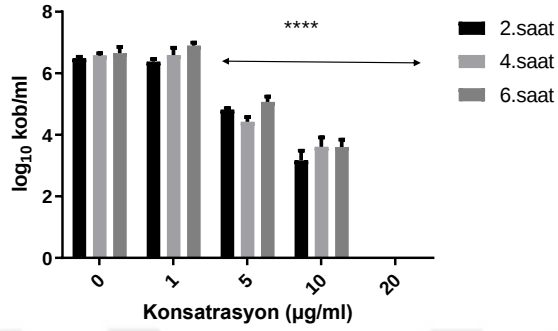
Şekil 4-4: AMP'lerin hücre içi *P. aeruginosa*'ya etkisi

4.4. Biyofilm Oluşumun Engellenmesine Ait Bulgular

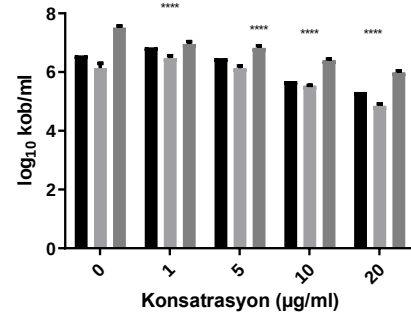
Çalışmada kullandığımız antimikrobiyal maddelerin A549 hücre hattı üzerinde *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumuna olan etkileri tespit edilmiştir. Bu amaçla oluşturulan

A549 hücresi ve *P. aeruginosa* ko-kültürüne ceragenin ve AMP'ler eklenmiş ve biyofilm oluşumuna olan etkileri 2., 4. ve 6. saatin sonlarında hem canlı bakteri sayımı belirleme yöntemi ile belirlenmiş hem de floresan görüntüleme yapılmıştır. Antimikrobiyal madde eklenmemiş kontrol grubu ile antimikrobiyal maddelerin farklı konsantrasyonları eklenmiş deney gruplarının biyofilm oluşumları logaritmik olarak kob belirlenerek karşılaştırılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve elde edilen grafikler Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da gösterilmiştir. Bulgulara göre CSA-13, 5 µg/ml ve üstü konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe etmiştir ($P < 0,05$). 20 µg/ml konsantrasyonda biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği görülmektedir. Tüm cerageninler içerisinde CSA-142 test edilen tüm saatler ve konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olamamıştır (Şekil 4-5). En etkili AMP, LL-37 olarak belirlenmiştir. Özellikle 20 µg/ml konsantrasyonda 6. saat sonunda kontrol grubuna göre anlamlı azalmaya neden olmuştur ($P < 0,0001$). Magainin ise etkinliği en düşük AMP olarak belirlenmiştir (Şekil 4-6).

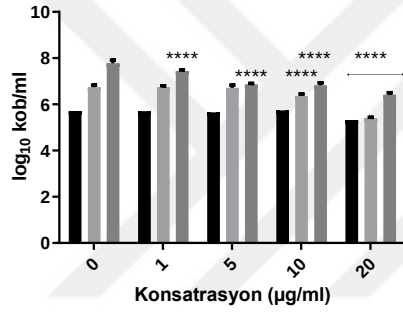
CSA-13



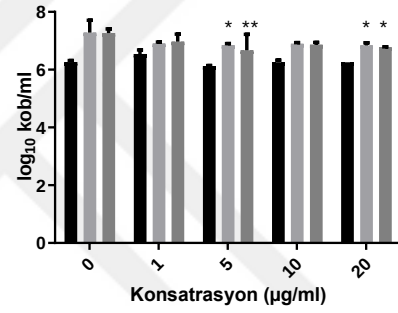
CSA-44



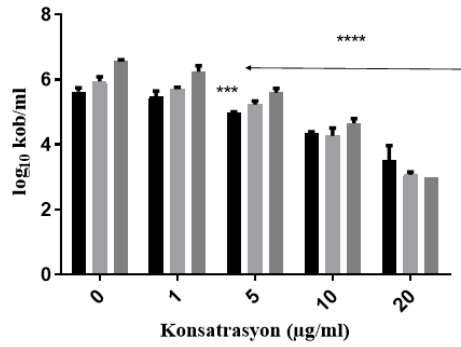
CSA-90



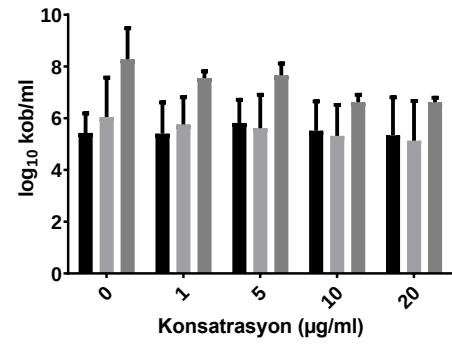
CSA-131

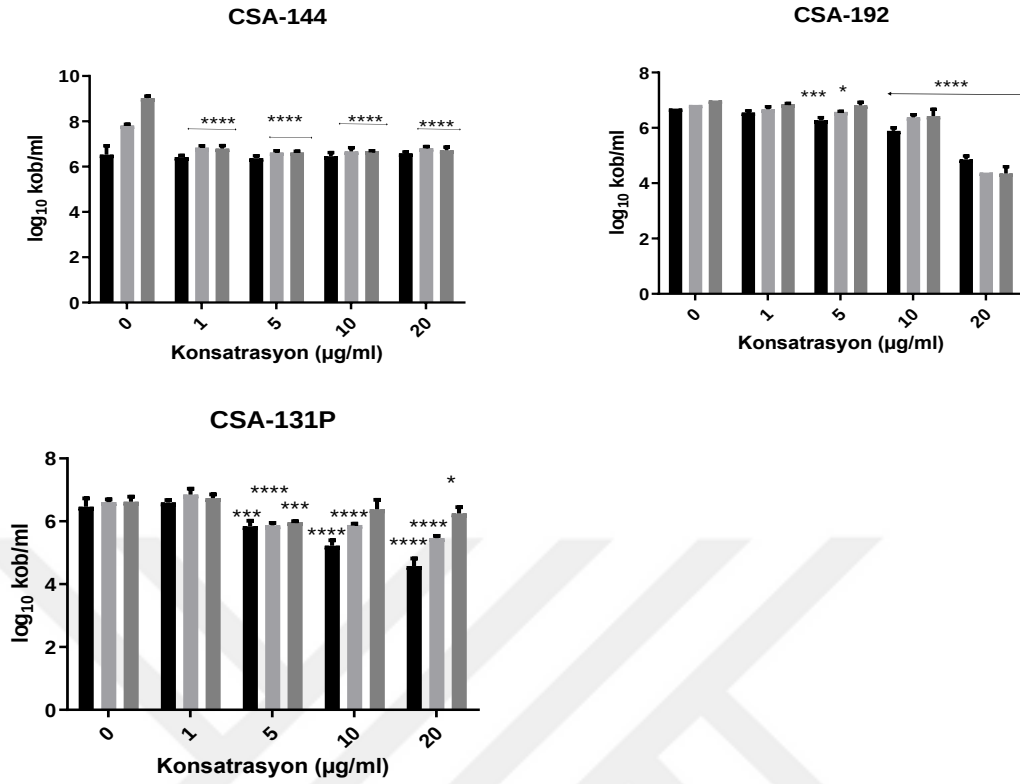


CSA-138



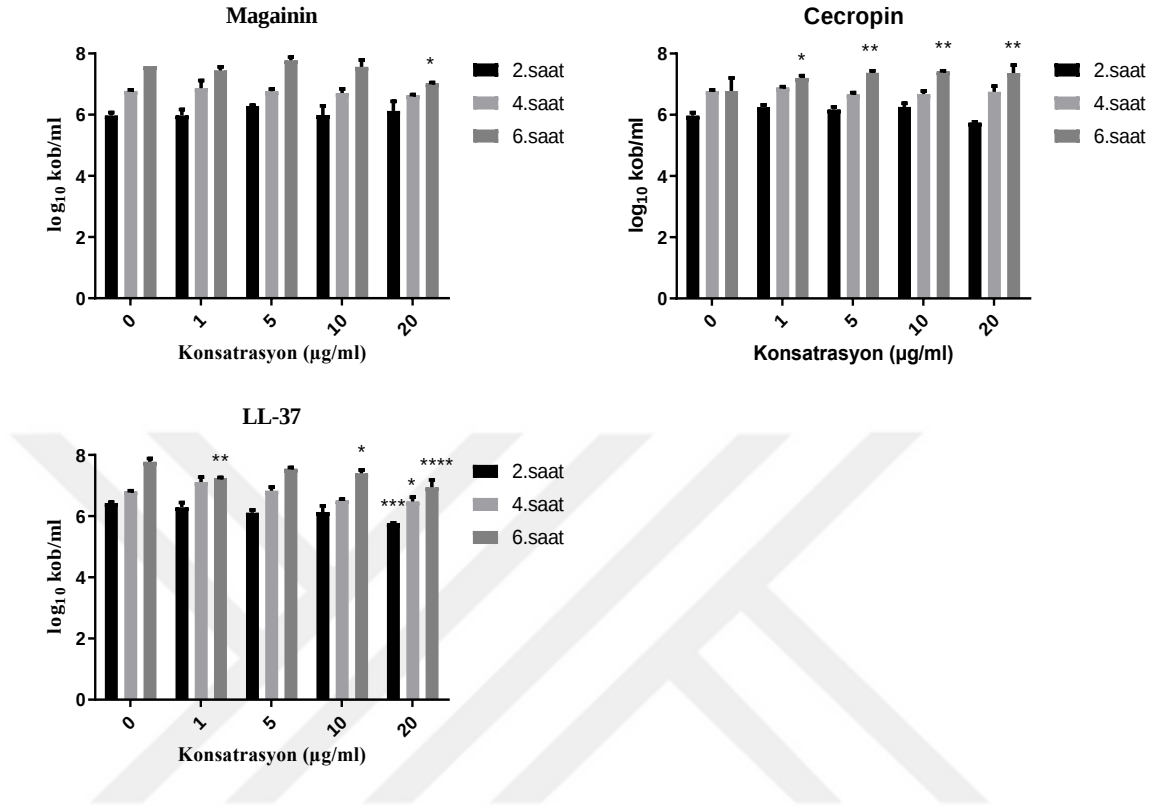
CSA-142





Şekil 4-5: Cerageninlerin A549 hücre üzerinde *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumu üzerine etkileri

*, $P < 0,05$ **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ ****, $P < 0,0001$

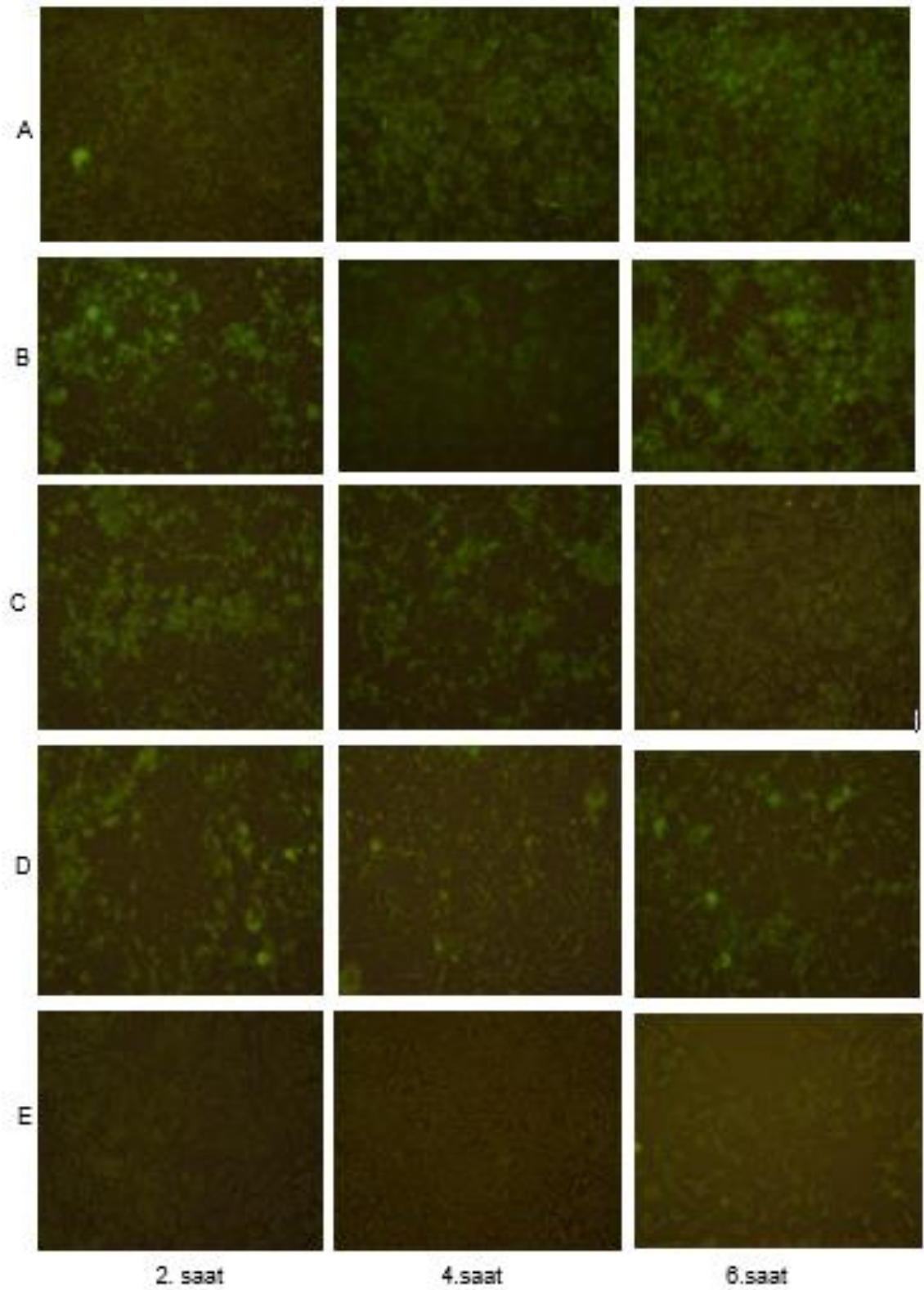


Şekil 4-6: AMP'lerin A549 hücre üzerinde *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumu üzerine etkileri

*, $P < 0,05$ **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ ****, $P < 0,0001$

4.5. Floresan Mikroskopu Görüntüleri

Elde edilen bulgulara dayanarak en etkili bulunan CSA-13'ün etkinliği floresan mikroskopu kullanılarak gösterilmiştir. CSA-13'ün 1, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının 2., 4. ve 6. saat sonucunda biyofilm oluşumu üzerine etkileri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Görüntülerde yeşil renkli olarak *P. aeruginosa*-GFP suşunun özellikle hücre etrafında oluşturduğu biyofilm yapıları görülebilmektedir. Kontrol grubuna göre CSA-13'ün uygulandığı grupta daha az yeşil renkli floresan elde edilmiştir. Görüntüler Şekil 4-7'de gösterilmiştir.

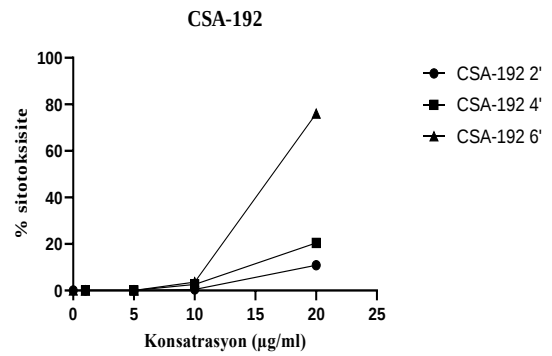
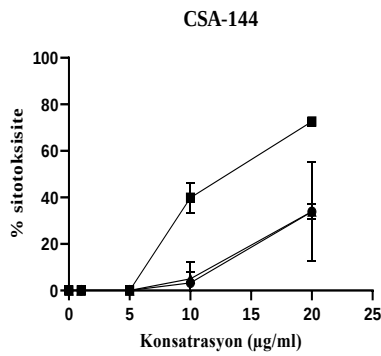
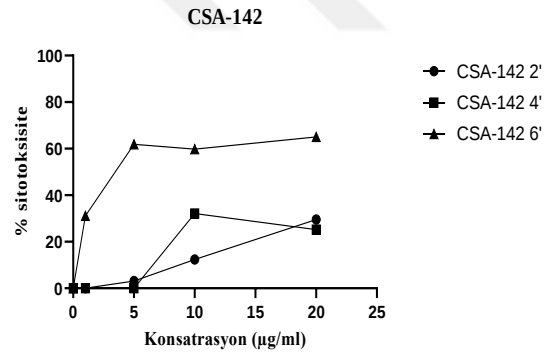
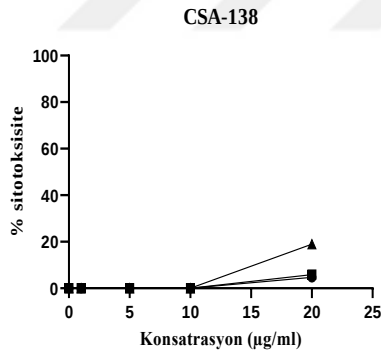
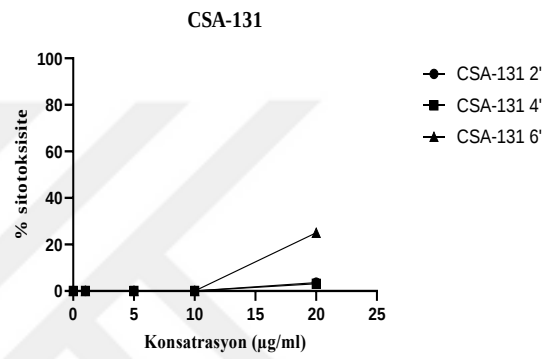
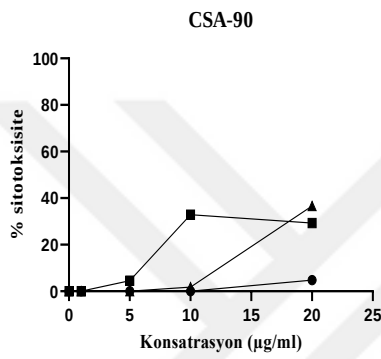
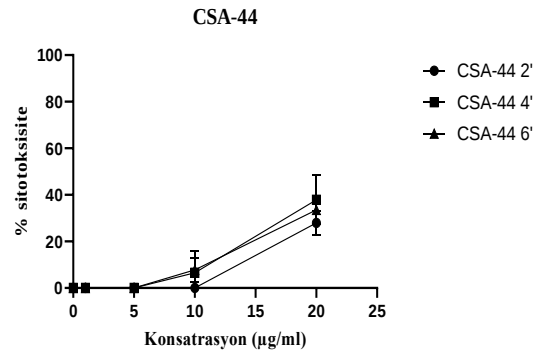
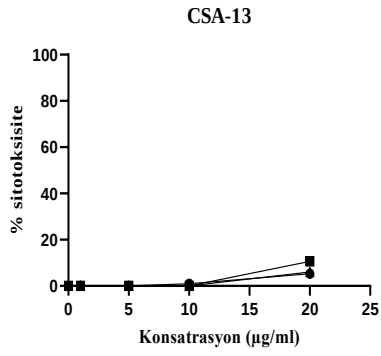


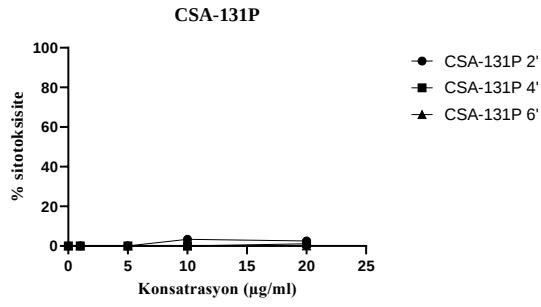
Şekil 4-7: CSA-13'ün ko-kültüre etkisinin floresan mikroskobu görüntüleri.

Yukarıdan aşağıya doğru A: Kontrol; B: 1 µg/ml; C: 5 µg/ml; D: 10 µg/ml; E: 20 µg/ml. Yeşil renk *P. aeruginosa*-GFP'yi göstermektedir (Büyütme x40, bar=20 µm).

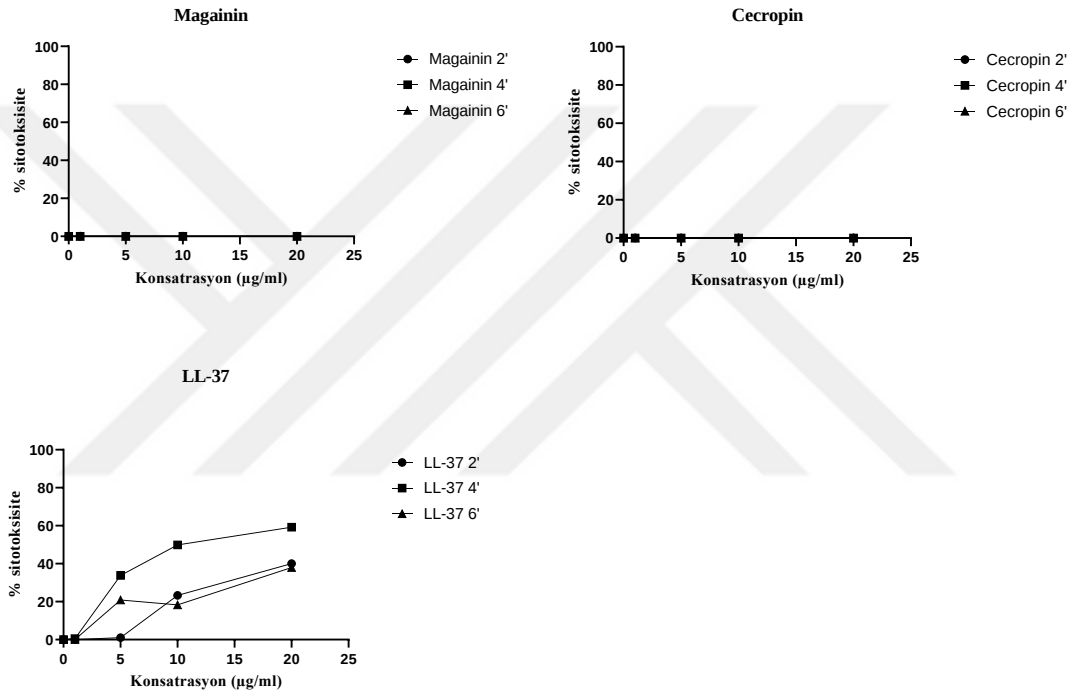
4.6. LDH Deneyine Ait Bulgular

Cerageninlerin ve AMP'lerin 2., 4. ve 6. saatin sonunda ko-kültüre olan sitotoksik etkileri LDH sitotoksisite testi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak hem antibiyotik ve bakteri içermeyen hem de sadece bakteri içermeyen hücreler kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, sadece bakterilerin 2. 4. ve 6. saat boyunca, bakteri içermeyen hücreye göre karşılaştırıldığında anlamlı sitotoksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Bulgular bakteri içeren kontrol grubu kuyulara göre hesaplanmıştır. Bulgulara göre sadece *P. aeruginosa* içeren kontrol grubuna göre cerageninler farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye neden olmuştur. Konsantrasyon arttıkça yüzde sitotoksisitenin arttığı görülmektedir. Cerageninler içerisinde en yüksek yüzde sitotoksisiteyi CSA-192'nin 20 µg/ml konsantrasyonu 6. saatin sonunda göstermiştir. CSA-131'in 20 µg/ml konsantrasyonu, 6. saatin sonucunda hücrelerin %20'sinden fazlasının ölümüne neden olmasına rağmen, CSA-131'in poloksamer içindeki formülasyonu sitotoksisiteyi azaltmıştır (Şekil 4-8). AMP'lerden magainin ve cecropin çalışılan saatler sonucunda sitotoksisiteye neden olmamıştır. LL-37 ise diğer AMP'ler ile karşılaştırıldığında neden olduğu sitotoksisite daha yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4-9).





Şekil 4-8: Cerageninlerin ko-kültüre sitotoksik etkileri



Şekil 4-9: AMP'lerin ko-kültüre sitotoksik etkileri

5. TARTIŞMA

P. aeruginosa KF hastalığında olduğu gibi akciğerlerde meydana gelen enfeksiyonlarda yüksek etiyolojiye sahip bir Gram negatif bakteridir. Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* küresel bir sorun oluşturmaktadır (Miyoshi-Akiyama ve ark. 2017). Antibiyotik direnci nedeniyle cerageninler ve AMP'ler gibi yeni antimikrobiyal adaylarının keşfi ve tedavide kullanımı önem taşımaktadır. Çalışmamızda cerageninlerin ve AMP'lerin KF gibi hastalıklarda karşımıza çıkan canlı doku yüzeyine mikroorganizmaların adezyonu, yapışması ve biyofilm oluşumuna olan etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada yer alan antimikrobiyal maddelerin *P. aeruginosa*-GFP suşunun planktonik hücrelerine karşı etkileri belirlenmiştir. Elde edilen MİK ve MBK değerleri Tablo 4-1'de gösterilmiştir. Cerageninlerin MİK değerleri 4-32 µg/ml arasındayken, AMP'lerin MİK değerlerinin 128 µg/ml'den daha yüksek olduğu bulunmuştur. Cerageninler içerisinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi CSA-131 (MİK: 4 µg/ml) göstermiştir. MBK değerleri MİK değerlerine eşit veya iki katıdır. Daha önce yaptığımız çalışmalardan elde edilen duyarlılık verileri ile kıyaslandığında cerageninlerin bakterisidal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Bozkurt-Guzel, Oyardi ve ark. 2018). Xavier Vila-Farrés ve ark. (2015) tarafından yayınlanan bir çalışmada cerageninlerin kolistin dirençli *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en etkili ceragenin CSA-131 bulunmakla birlikte CSA-13, CSA-44 ve CSA-138'in de düşük MİK değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir.

Cerageninler AMP'lerin etkilerini arttırmak ve dezavantajlarını azaltmak amacıyla sentezlenmiş bileşiklerdir. En eski izole edilmiş AMP'lerden olan ceragenin, magainin ve LL-37'yi kullandığımız bu çalışmamızda cerageninlerin etkinliğinin AMP'lerden çok üstün olduğu saptanmıştır. Diğer araştırmacıların da yaptığı çalışmalarda magainin, cecropin ve LL-37'nin *P. aeruginosa* suşlarına karşı cerageninlerden daha az etkili olduğu gösterilmektedir (Wnorowska ve ark. 2015; Dosler ve Karaaslan 2014). AMP'lerin aktivitelerini arttırmak için çeşitli modifikasyonları veya kombinasyonları yapılmıştır. Cecropin-A ve Melittin-A'nın hibridi olan CAMA, *P. aeruginosa*'ya karşı LL-37 ve magaininden daha etkili bulunmuştur. Benzer şekilde biyofilmi eradike eden

en düşük konsantrasyonları (MBEK) karşılaştırıldığında ise LL-37 ve CAMA için de 640 µg/ml konsantrasyonları belirlenmiştir (Dosler ve Karaaslan 2014). İleri çalışmaların diğer hibrid ve modifiye AMP'ler ile sürdürülmesi gerekmektedir.

Antimikrobiyal direnç yeni antimikrobiyaller için de bir tehdit unsurudur. AMP'ler neredeyse tüm organizmalarda patojenlere karşı yüzyıllardır savaşmaktadırlar. Fakat buna rağmen antibiyotiklerden farklı olarak AMP'lere direnç gelişmediği gözlemlenmektedir. Bunun nedeni olarak doğal ortamlarında AMP'lerin etkisini devam ettirecek şekilde patojenler ile birlikte evrimleşmesi ve düşük konsantrasyonlarda değil sürekli terapötik seviyelerde patojenler ile bir arada bulunması olduğu düşünülmektedir (Peschel ve Sahl 2006; Hashemi, Holden ve Savage 2018). Ayrıca AMP'ler mikroorganizmalarda belirgin bir enzimi değil hücre zarını hedeflemektedirler. Bakterilerin direnç kazanması için köklü değişiklikler yapması gerekmektedir. Aynı durum cerageninler için de geçerlidir (Mangoni ve ark. 2016; Hashemi, Holden ve Savage 2018). Pollard ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, siprofloksasin, vankomisin ve kolistin ile karşılaştırılarak CSA-13'e karşı *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin direnç geliştirme potansiyelleri incelenmiştir. 30 pasaj sonrası geleneksel antibiyotiklere direnç gelişirken, CSA-13'ün *S. aureus*'e karşı hala etkili olabildiği gösterilmiştir. Gram negatiflerde CSA-13'e karşı direnç gelişmekle birlikte geleneksel antibiyotiklerle karşılaştırıldığında çok daha ılımlı bulunmuştur. Gram negatiflere karşı görülen direnç mekanizmasının, dış zarda bulunan ve cerageninlerin ve AMP'lerin hedefi olan Lipit A'da görülen modifikasyonlar olduğu gösterilmiştir. Fakat Hashemi ve ark. (2017) tarafından yapılan benzer bir çalışmada Lipit A'daki modifikasyonların kolistin direncini çok arttırırken, cerageninlere karşı direnci daha az arttırdığını göstermiştir. Bu sonuç kolistin ile cerageninlerin ve AMP'lerin farklı direnç mekanizmalarına sahip olabileceğini göstermektedir. Antimikrobiyal direnci enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde en önemli zorluk olarak karşımıza çıktığından, AMP'ler ve cerageninlerin terapötik değeri daha çok anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda antimikrobiyallerin A549 hücre hattı üzerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumuna olan etkileri araştırıldığından, ilk olarak araştırmada kullanılacak antimikrobiyal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla MTT ile sitotoksisite testi yapılmıştır. Cerageninlerin ve AMP'lerin çeşitli konsantrasyonlarının sitotoksisite

profilleri Şekil 4-1’de gösterilmiştir. Ayrıca GraphPad Prism 8 programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4-2).

Cerageninlerin IC₅₀ değerleri 11,37±3,88 ila 40,05±2,65 µg/ml aralığında belirlenirken, AMP’lerin 40,76±5,35 ila >200 µg/ml olarak belirlenmiştir. Tablo 4-2’de görülebileceği gibi cerageninler içerisinde en düşük sitotoksiteyi CSA-131’in poloksamer formu göstermektedir (IC₅₀: 40,05 ± 2,65). Pluronik F-127, noniyonik ilaç taşıyıcı poloksamer sistem olarak geliştirilmiştir. Pluronik F-127 kullanılarak ilaçlar miseller içerisinde hapsedilerek özel dokulara ilaçların taşınması sağlanabilmektedir. Ayrıca antimikrobiallerin sitotoksik etkilerini azaltmak amacıyla da kullanılmaktadırlar. CSA-131’in poloksamer miseller içerisinde kapsüle edilmesi hücre membranı seçiciliği sağlayarak sitotoksitesini azaltmaktadır. Fakat Nagant ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışma, CSA-13’ün endotel üzerine sitotoksik etkilerinin sadece hücre membranı bütünlüğünü etkilemesi ile ilgili olmadığı aynı zamanda hücrelerin mitokondrisine de toksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamız sonucuna göre Pluronik F-127’nin CSA-131 ile kombinasyonu durumunda, Pluronik F-127 CSA-131’in hücre geçirgenliğe etkisini rahatlatarak sitotoksitesini azaltmakta, fakat mitokondri hasarını engelleyememektedir.

Çalışma sonuçlarına göre AMP’lerin A549 üzerine sitotoksitesileri cerageninlerden daha düşük düzeyde bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalar insan akciğer kanser hücrelerinden LL-37’nin düşük dozlarda eksprese edildiğini ve tümör büyümesini tetiklediğini göstermiştir. İlginç olarak LL-37’nin, göğüs, yumurtalık ve akciğer kanserlerinde aşırı eksprese edildiği, ancak mide kanserinde zaman zaman tümör oluşumunu baskıladığı belirlenmiştir (Kurado ve ark. 2015). AMP’lerin antikanser ajanlar olarak potansiyeli bulunmaktadır. Bunun için çeşitli modifikasyonlarının yapılması, ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması, kombinasyon tedavileri deneme aşamasındadır. Ayrıca AMP’lerin sitotoksitesilerini azaltmak amacıyla da türevleri sentezlenmiştir. Ciornei ve ark. (2005) yaptıkları çalışma ile LL-37’nin yapısındaki N-terminal hidrofobik amino asitlerin çıkarılması ile sitotoksitesinin azaldığını göstermişlerdir.

AMP’ler ve cerageninler, kanser hücreleri ve IB3-1 (KF akciğer hücreleri) gibi transforme edilmiş hücrelere karşı artmış aktivite göstermektedirler ve bu nedenle antikanser ajanlar olarak kabul edilmektedirler (Wnorowska ve ark. 2020; Oyardi ve

ark. 2021). Birincil (dönüştürülmemiş) hücelere göre kanser hücrelerinin membran bileşimi değişmektedir. Kanser hücrelerinin yüzeyinin cerageninler ve AMP'lerin pozitif yüklü yapısının ilgisini çekebilecek negatif yüke sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, transforme edilmiş kanser hücreleri ile ilgili yapılan çalışmalar cerageninler ve AMP'lerin sitotoksitesini belirlemek için yeterli değildir. Birincil hücreleri içeren daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda kullanılan A549 hücre hattı insan akciğer kanser hücre hattıdır ve yüksek sitotoksikite görülmesini açıklamaktadır. Çalışmamızda belirlenen sitotoksik değerler, cerageninler ve AMP'ler antikanser ajanlar olarak değerlendirildiğinde önemlidir ve bu perspektiften ele alınması gerekmektedir. Ko-kültüre karşı antimikrobiyallerin etkilerinin belirlenebilmesi için A549 hücre hattına sitotoksik olmayan konsantrasyonların kullanılması deneyin doğruluğu açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmaya cerageninlerin ve AMP'lerin 20 µg/ ml, 10 µg/ ml, 5 µg/ ml ve 1 µg/ ml konsantrasyonları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Cerageninler ve AMP'ler ile ilişkili ex-vivo veya in-vivo biyofilm çalışmaları oldukça az sayıdadır. LL-37 türevi bir AMP'nin tavşanlarda *P. aeruginosa* PO1 suşu ile oluşturulan sinüzitte etkinliği incelenmiştir. Yapılan çalışma biyofilm eradikasyonu için yüksek konsantrasyonlarda LL-37'nin (2,5 mg/ml) gerektiğini göstermiştir. Fakat yüksek konsantrasyonlardaki LL-37 türevi peptid, biyofilmi eradike edip bakteri sayısını düşürmesine rağmen, sinüs mukozası üzerinde proinflamatuvar ve silyotoksik etkiler göstermiştir (Chennupati ve ark. 2009). Sinüslerle benzer şekilde soluk borusunda ve akciğerlerde de silyalar bulunmaktadır ve etkili bir antimikrobiyalin hem güçlü antimikrobiyal özellikler göstermesi hem de dokularda kritik görevleri olan silyalara zarar vermemesi istenmektedir. LL-37'ye benzer şekilde CSA-131'in yerleşik biyofilmleri eradike eden konsantrasyonlarda (100 µg/ml) silyalar üzerine toksik etkileri olduğu ve silyaların işlev kaybına neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte, CSA-131'in Pluronik F-127 kullanılarak poloksamer miseller içerisinde formüle edilmesi antimikrobiyal etkinliği değiştirmeden silya hasarını ortadan kaldırmıştır (Hashemi, Holden ve Savage 2018). Ayrıca, çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda da görülebildiği üzere CSA-131P, A549 hücre hattında daha düşük sitotoksikite sahiptir. CSA-131P'nin 20 µg/ml konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı sitotoksikiteye neden olmazken, CSA-131'in 20 µg/ml konsantrasyonu sitotoksik olarak belirlenmiştir ($P < 0,0001$). Hashemi, Holden ve Savage (2018) yaptıkları bir çalışmada poloksamer misellerde yüksek konsantrasyonlarda CSA-131

(100 µg/ml) kullanarak, silya işlevini kaybetmeden ve silya hareketlerini etkilemeden birincil hücrelerde biyofilm oluşumunu ortadan kaldırmayı başarmışlardır. Çalışmamızda kullanılan antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonları, silyaların hasarına neden olanlardan daha düşük konsantrasyonlardır. Bu nedenle, cerageninlerin ve AMP'lerin akciğerlerdeki silyalar üzerindeki konsantrasyona bağlı etkilerini incelemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Hücre içi bakterilerin varlığı tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmakta ve KF akciğeri gibi enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda kronik solunum yolu enfeksiyonları sırasında *P. aeruginosa*'nın hücre içi bölgelerde kalması ve bu nedenle konağın savunma mekanizmalarından korunma olasılığı bulunmaktadır. Böylelikle bakteriyel sağ kalım artmakta ve kronik enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Beta laktamlar, doksisilin gibi geleneksel antibiyotikler, cerageninlere kıyasla daha büyük moleküller olduklarından, hücre içi bakterilere karşı etkisiz kalabilmektedirler (Chi ve ark. 1991; Noore ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada akut enfeksiyonu takiben eklenen gentamisin hücre dışı bakterileri öldürmesine rağmen, *P. aeruginosa*'nın hücre içinde en az 3 gün kalmasını engelleyememiştir. *P. aeruginosa*'nın hava yolu epitel hücrelerini kalıcı bir sığınak olarak kullandığı ve kronik enfeksiyona neden olan biyofilm fizyolojisinde önemli geri dönüşümlü antibiyotik direnci geliştirebileceği vurgulanmıştır (Garcia-Medina ve ark. 2005). Bu nedenle sadece hücre dışı değil aynı zamanda hücre içi bakterilere olan etkilerin de araştırılması önemlidir.

Bu çalışmada cerageninlerin ve AMP'lerin 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml ve 1 µg/ml konsantrasyonlarının hücre içi bakterilere olan etkinlikleri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4-3 ve Şekil 4-4'te gösterilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda en yüksek aktiviteyi CSA-13'ün gösterdiği belirlenmiştir. CSA-13'ün 5 µg/ml konsantrasyonu başlangıç bakteri sayısından 1 log'luk bir azalmaya neden olurken, 10 µg/ml konsantrasyonu 3 log, 20 µg/ml konsantrasyonu ise yaklaşık 4 log'luk bir azalmaya neden olmuştur. Diğer etkili olan ceragenin ise CSA-131 olarak saptanmıştır. Özellikle 20 µg/ml konsantrasyonu, başlangıç hücre içi bakteri sayısını 3 log azaltmıştır. Diğer cerageninlerden CSA-90 ve CSA-192'nin 20 µg/ml konsantrasyonları 1 log'luk azalma sağlarken, AMP'lerden sadece LL-37 20 µg/ml konsantrasyonda 1 log'luk azalmaya neden olmuştur. Noore ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışma LL-37'nin sadece

hücre dışı *S. aureus*'a karşı değil hücre içi *S. aureus*'a karşı da etkili olduğunu göstermiştir. Osteoblast hücre kültürü kullanılan bir başka çalışmada ise, LL-37'nin hücre içi bakterilere olan inhibitör etkisi cefazolin ve doksisisilinden çok daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca benzer bir çalışmada insan mesane epitel hücre hattı olan T24 (ATCC® HTB4™) kullanmış ve LL-37 ve cerageninlerin kombinasyonunun sadece hücre dışı değil hücre içi bakteri konsantrasyonunu azaltmada da tek başlarına kullanımlarından daha etkili olduğu belirlenmiştir (Wnorowska ve ark. 2019).

CSA-131 ve CSA-131P'nin hücre içi bakterilere olan etkileri karşılaştırıldığında, CSA-131'in daha fazla etkili olduğu görülmektedir. CSA-131'in poloksamer miseller içerisinde kapsüllenmesinin, bu kapsüllerin hücre içerisine girişini engellemiş olabileceği ve etkinliğinin kaybolmasına neden olabileceği düşünülmektedir. CSA-131'in test edilen konsantrasyonları A549 hücre hattı üzerinde biyofilm oluşumunu engelleyememişken, CSA-131P'nin 20 µg/ml konsantrasyonu 2 saat sonunda biyofilmdeki bakteri sayısını yaklaşık 2 log azaltmıştır. CSA-131P'nin bakteri membran seçiciliğinin daha yüksek olması ve daha az sitotoksik olması önemlidir.

KF akciğerlerinde mukus üretimi fazlalığı *P. aeruginosa* gibi fırsatçı patojenlerin akciğer epiteline invazyonu, adezyonu ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Biyofilmler erken agresif antibiyotik profilaksisi veya tedavisi ile önlenabilir ve kronik baskılayıcı tedavi ile tedavi edilebilmektedir. Fakat çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* varlığı ve biyofilmlerin yapısı dolayısıyla antibiyotiklere ve savunma sistemlerine dirençli olmaları yeni antimikrobiyallerin keşfini gerektirmektedir (Malhotra ve ark. 2019; Moreau-Marquis, Stanton ve ark. 2008). Fakat *P. aeruginosa* ile konakçı hücrenin etkileşimini incelemek ve antimikrobiyallerin etkinliğini saptamak için biyotik yüzeylerin kullanıldığı yeni *in vitro* modellere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda A549 hava yolu hücre hattı ve *P. aeruginosa* ile birlikte ko-kültür oluşturularak yeni bir *in vitro* model denenmiştir ve sonuçlar Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da gösterilmiştir. 2., 4. ve 6. saatlerden alınan örnekler incelendiğinde beklenildiği gibi kontrol grubunda zamana bağlı olarak bakteri adezyonunun ve biyofilm kütlesinin arttığı görülmektedir. Hücrelerin çevresine bakterinin adezyonu ve zamana bağlı biyofilm oluşumunun artışı floresan görüntüleri ile de doğrulanmıştır (Şekil 4-7). Cerageninlerin ve AMP'lerin, *P. aeruginosa*'nın A549 hücre hattı üzerine adezyonu ve biyofilm oluşumuna olan etkileri incelendiğinde, en etkili antimikrobiyal CSA-13

olarak belirlenmiştir. 20 µg/ml konsantrasyonunda CSA-13, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu 2., 4. ve 6. saatlerde tamamen engellemiştir. Şekil 4-7'deki floresan görüntülerde CSA-13'ün bakteriyel biyofilm oluşumunu inhibe etme yeteneği gösterilmiştir. CSA-13'ün konsantrasyonu arttıkça etkinliği beklenildiği gibi artarken, 2. saatten itibaren hızlı etkinin ortaya çıktığı görülmektedir. CSA-13 10 µg/ml konsantrasyonunda da oldukça etkili inhibitör etki göstermiştir ($P < 0,0001$). Tüm saatlerde kontrol grubuna göre 3 log'luk azalmaya neden olmuştur. CSA-13, umut vadeden antimikrobiyal etkilere sahip olması nedeniyle en çok çalışılan prototip bir ceragenindir. Ayrıca Gram pozitif ve Gram negatiflerin CSA-13'e karşı direnç geliştirmesinin geleneksel antibiyotiklere göre daha zor olduğu gösterilmiştir (Pollar ve ark. 2012). CSA-13'ün sitotoksik olmayan sub-MİK konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Nagant ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, 1 µg/ml CSA-13, 4 mukoid ve 4 mukoid olmayan toplam 8 adet *P. aeruginosa* suşundan 3 tanesinde biyofilm oluşumunu anlamlı olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Yapılan çalışma, 24 ve 48 saat boyunca CSA-13'ün etkinliğini değerlendirmiştir. Çalışmamız sonuçlarında ise 2. 4. ve 6. saat sonunda 1 µg/ml CSA-13 anlamlı inhibisyona neden olmazken 5 µg/ml konsantrasyondan itibaren etki ortaya çıkmıştır. *P. aeruginosa*'nın A549 hücre hattı ile enfeksiyonu sonucunda bakterilerin toksinleri ve virülans faktörleri ile sitotoksik etki göstermesi nedeniyle 6. saatten itibaren hücrelerin birbirlerinden ayrıldıkları gözlemlenmiştir. Hücre besiyerine arjinin eklenmesi hücrelerin tek tabakalı formunu 6. saate kadar korumasına yardımcı olmakla birlikte, 6. saatten uzun sürelerde bakterilerin etkilerini engelleyememiştir (Moreau-Marquis ve ark. 2010). O nedenle çalışmamızda cerageninlerin ve AMP'lerin 24 saat veya daha uzun sürelerde biyofilm oluşumu üzerine etkileri incelenememiştir.

Bucki ve ark. (2015), yaptıkları hücre kültürü *P. aeruginosa* enfeksiyonu modelinde, CSA-13'ün LL-37'den daha fazla bakteri ölümüne ve azalmış bakteriyel lüminesans ölçümüne neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, deneye endojen LL-37 üretimine neden olduğu bilinen butirik asit eklenmesi, CSA-13'ün etkinliğinin artmasına neden olmuştur. Bucki ve ark. (2015) yaptıkları bu çalışmada 10 µM ve 30 µM CSA-13'ü bakterinin hücre kültürüne eklenmesinden 18 saat sonra tedavi için kullanmışlardır. Çalışmamızda bakteriler ve antimikrobiyal maddeler birlikte konularak bakteriyel adezyon ve biyofilm oluşumun profilaktik olarak tedavisi dikkate alınmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyum

içindedir. CSA-13, LL-37'den daha fazla etkili olduğu bulunmuş ve bakterilerin epitel yüzeyine invazyonunu ve biyofilm oluşumunu 20 µg/ml konsantrasyonunda tamamen engellemiştir.

CSA-13'ten sonra en fazla biyofilm oluşumunu engelleyici özellikte olan ceragenin CSA-138 olarak saptanmıştır. 20 µg/ml konsantrasyonu 3 log'luk bir azalmaya neden olurken, 10 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonları da oldukça etkili bulunmuştur (2 log azaltma). Bozkurt-Guzel, Hacıoglu ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada, *C. albicans* suşlarına ve biyofilmine karşı test edilen cerageninlerden *C. albicans* biyofilmine karşı en etkili olan ceragenini CSA-138 olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar CSA-138'in anti-biyofilm etkinliği olduğunu göstermektedir.

Cerageninler, yapılarındaki karbon zincirlerinin uzunluğu veya diğer grupların varlığına göre farklılaşmaktadırlar. Bu farklılıklar cerageninlerin aktivitelerini etkilemektedir. CSA-44 yapısında eter bağları yerine ester yapısı taşımaktadır. CSA-13, CSA-131 ve CSA-138'in lipit zincir uzunlukları sırası ile 8, 12 ve 13 karbondur. CSA-13, prototip bir moleküldür ve diğer cerageninler genellikle CSA-13'e göre bazı avantajlara sahip olması amacıyla sentezlenmiştir. Örneğin, CSA-142, kolik asit, beta-alanin ve hekzanol vermek üzere zamanla bozunacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, CSA-142'nin bozunma yolu iyi anlaşılmıştır ve çevrede birikmemektedir. CSA-192 nispeten kararlıdır ve CSA-13 ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, CSA-192, CSA-13'ten daha kolay hazırlanabilir (bir sentetik adım daha az). Bu çalışmada, CSA-192 canlı hücrelerde *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumunu engelleme açısından etkili bulunmuştur. 20 µg/ml konsantrasyonda kullanılan CSA-192, 4. ve 6. saatlerde biyofilm oluşumunu kontrol grubuna göre 2 log azaltmıştır ($P < 0,0001$).

Cecropin, A549 hücre hattı üzerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine etkisiz bulunmuştur. Magainin ve LL-37'nin 20 µg/ml konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkileri ise cerageninlere göre çok daha düşüktür. Test edilen AMP'ler içerisinde en etkili AMP ise LL-37 olarak belirlenmiştir. Byfield ve ark. (2011) yaptıkları çalışma sonucunda LL-37'nin insan vücudunda sadece antimikrobiyal etkileri nedeniyle bulunmadığını aynı zamanda akciğer epitel sertliğini arttırdığını, epiteller arası geçirgenliği azalttığını ve böylelikle *P. aeruginosa* gibi mikroorganizmaların epitelyal invazyonunu engellediğini belirlemişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular AMP'lerin test edilen konsantrasyonlarda bakteriyel adezyonu çok etkili

şekilde engellemediğini göstermektedir. Bunun nedenleri arasında düşük konsantrasyonlarda kullanılması ve proteazların etkileri olabileceği düşünülmektedir. Proteazlardan etkilenmeyen AMP modifikasyonlarının ileri çalışmalarda kullanılması düşünülmektedir. Benzer bulgular Wnorowska ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışma ile de örtüşmektedir. Çalışma sonucuna göre katyonik lipidlerin, *P. aeruginosa* LESB58 biyofilm oluşumunu LL-37'den daha etkili bir şekilde önleyebildiği gösterilmiştir. Seyreltilmiş KF balgam örneklerinde gerçekleştirilen karşılaştırmada da cerageninlerin pürülan balgam örneklerinde LL-37'nin yaptığından daha güçlü bakterisidal aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, A549 hücre hattının üzerindeki *P. aeruginosa* biyofilmi oluşumuna cerageninlerin ve AMP'lerin etkileri incelendikten sonra, hücrelerden açığa çıkan LDH düzeyleri saptanmıştır. Toplanan süpernatantlardaki LDH seviyeleri LDH sitotoksisite kiti ile ölçülmüştür. Sonuçlar antimikrobiyal konsantrasyonuna karşı yüzde sitotoksisite olarak Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, zamanla birlikte bakteri ve antimikrobiyaller hücreyi etkiledikçe salgılanan LDH'nin arttığını göstermektedir. Sadece magainin ve cecropinin uygulanan hiçbir konsantrasyonunda sitotoksisite gösterilmemiştir. Uygulanan konsantrasyonlardaki magainin ve cecropinin sitotoksik olmadığı daha önce yapılan MTT testi ile de doğrulanmıştır. En yüksek LDH salınımı ve yüzde sitotoksisiteye CSA-192 ve LL-37 ile muamele edilen hücrelerde rastlanılmıştır. CSA-131P, magainin ve cecropinden sonra en az LDH salınımı saptanan antimikrobiyaller olmuştur. Bu sonuç Pluronik F-127 ile CSA-131 kombinasyonunun sitotoksisiteyi azalttığını doğrulamıştır.

Nagant ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada CSA-13'ün HUVEC hücrelerine muamelesini takiben hücrelerden LDH salınımını belirlemişlerdir. 37° C'de 15 dakika süreyle 50 ve 100 µg/mL CSA-13'e maruz kaldıktan sonra hücreler, LDH içeriklerinin sırasıyla % 22.6±1.6 ve % 48.5±4.2'sini serbest bırakmışlardır. Bu iki konsantrasyonda LDH salımı, kontrolden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Daha düşük konsantrasyonlarda, CSA-13'ün LDH salınımı üzerinde önemli bir etkisi bulunamamıştır. Fakat aynı çalışmada 20 µg/mL CSA-13'ün HUVEC hücrelerine etidyum bromür alımını arttırdığını göstermiştir. Çalışmamız sonuçlarına göre, 20 µg/mL CSA-13'ün sitotoksisiteye etkisinin yaklaşık %10'a kadar arttırdığı görülmüştür.

Leszczyńska ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada da CSA-13'ün insan mide adenokarsinom hücrelerinden LDH salınımına etkisi belirlenmiştir. Çalışma sonucuna göre 10 µg/mL CSA-13'ün LDH salınımı üzerine bir etkisi bulunamamakla birlikte konsantrasyon arttıkça LDH salınımının da arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları bu bulgular ile uyumludur. 10 µg/mL CSA-13'ün ve *P. aeruginosa* ko-kültürünün A549 hücrelerinden LDH salınımına anlamlı etki etmediği fakat konsantrasyon arttıkça LDH salınımının arttığı dolayısıyla sitotoksitenin arttığı görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular cerageninlerin ve AMP'lerin KF gibi hastalıklarda ortaya çıkan *P. aeruginosa* biyofilm enfeksiyonlarının tedavisindeki önemini göstermiştir. Çalışma sonucuna göre, cerageninlerin AMP'lere olan yapısal ve üretimsel üstünlüklerinin yanı sıra antimikrobiyal etki açısından üstünlükleri de bulunmaktadır. Ayrıca cerageninlerin kanser hücre hattına AMP'lerden daha yüksek sitotoksite gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle en çok umut vadeden cerageninlerden biri olan CSA-13'ün düşük dozlarda bile antimikrobiyal ve biyofilm oluşumunu inhibe edici özelliklerine sahip olması ve hücre içi bakteri sayısını azaltmaya olan anlamlı etkisi çalışmanın bir diğer önemli bir sonucudur. CSA-131'in poloksamer formunun CSA-131'e göre antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğinin değişmediği ama sitotoksitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, CSA-13'ün poloksamer formunun test edilmesine ve güvenilirlik, etkinlik, toksisite ve farmakolojik çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, CSA-13'ün çeşitli geleneksel antibiyotikler ve AMP'lerle kombinasyonları yapılarak başka hücre hatlarında ko-kültür üzerine etkilerinin test edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C. ve Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, **22**(5), 1304-1309.
- Al-Wrafiy, F., Brzozowska, E., Górska, S. ve Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, **71**, 78-91.
- Anderson, G.G., Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A. ve O'Toole, G.A. (2008). In vitro analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, **76**(4), 1423-1433.
- Anderson, M.J., Parks, P.J. ve Peterson, M.L. (2013). A mucosal model to study microbial biofilm development and anti-biofilm therapeutics. *Journal of Microbiological Methods*, **92**(2), 201-208.
- Aslantürk, Ö.S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. İçinde M.L. Larramendy (Ed.), *Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World*. InTechOpen; 1-17.
- Azam, M.W. ve Khan, A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, **24**(1), 350-359.
- Babikir, I.H., Abugroun, E.A., Bilal, N.E., Alghasham, A.A., Abdalla, E.E. ve Adam, I. (2018). The impact of cathelicidin, the human antimicrobial peptide LL-37 in urinary tract infections. *BMC Infectious Diseases*, **18**(1), 1-8.
- Bair, K.L., Shafirstein, G. ve Campagnari, A.A. (2020). In vitro photodynamic therapy of polymicrobial biofilms commonly associated with otitis media. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 2127.
- Beaudoin, T., Stone, T.A., Glibowicka, M., Adams, C., Yau, Y., Ahmadi, S. ve ark. (2018). Activity of a novel antimicrobial peptide against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific reports*, **8**(1), 1-12.
- Beaudoin, T., Yau, Y.C.W., Stapleton, P.J., Gong, Y., Wang, P.W., Guttman, D. S. ve ark. (2017). *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa*

- biofilm enhances tobramycin resistance. *NPJ biofilms and microbiomes*, **3(1)**, 1-9.
- Blanchard, A.C. ve Waters, V.J. (2019). Microbiology of cystic fibrosis airway disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **40(6)**, 727-736.
- Botelho, J., Grosso, F. ve Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, **44**, 100640.
- Bozkurt-Guzel, C., Hacıoglu, M. ve Savage, P.B. (2018). Investigation of the in vitro antifungal and antibiofilm activities of ceragenins CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, and CSA-138 against *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **91(4)**, 324-330.
- Bozkurt-Guzel, C., Oyardi, O. ve Savage, P. (2018). Comparative in vitro antimicrobial activities of CSA-142 and CSA-192, second-generation ceragenins, with CSA-13 against various microorganisms. *Journal of Chemotherapy*, **30(6-8)**, 332-337.
- Bozkurt-Guzel, C., Savage, P.B. ve Gerceker, A.A. (2011). *In vitro* activities of the novel ceragenin CSA-13, alone or in combination with colistin, tobramycin, and ciprofloxacin, against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Chemotherapy*, **57(6)**, 505-510.
- Bucki, R., Niemirowicz, K., Wnorowska, U., Byfield, F. J., Piktel, E., Wątek, M. ve ark. (2015). Bactericidal activity of ceragenin CSA-13 in cell culture and in an animal model of peritoneal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59(10)**, 6274-6282.
- Byfield, F.J., Kowalski, M., Cruz, K., Leszczyńska, K., Namiot, A., Savage, P.B. ve ark. (2011). Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Immunology*, **187(12)**, 6402-6409.
- Cardoso, M.H., Candido, E.S., Chan, L.Y., Der Torossian Torres, M., Oshiro, K.G., Rezende, S.B. ve ark. (2018). A computationally designed peptide derived from *Escherichia coli* as a potential drug template for antibacterial and antibiofilm therapies. *ACS Infectious Diseases*, **4(12)**, 1727-1736.
- Castañeda-Montes, F.J., Avitia, M., Sepúlveda-Robles, O., Cruz-Sánchez, V., Kameyama, L., Guarneros, G. ve ark. (2018). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* through a MLST approach and antibiotic resistance

- profiling of a Mexican clinical collection. *Infection, Genetics and Evolution*, **65**, 43-54.
- Chennupati, S.K., Chiu, A.G., Tamashiro, E., Banks, C.A., Cohen, M.B., Bleier, B.S. ve ark. (2009). Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas sinusitis*. *American Journal of Rhinology & Allergy*, **23(1)**, 46-51.
- Chi, E., Mehl, T., Nunn, D. ve Lory, S. (1991). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and Immunity*, **59(3)**, 822-828.
- Ciofu, O. ve Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 913.
- Ciornei, C.D., Sigurdardóttir, T., Schmidtchen, A. ve Bodelsson, M. (2005). Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49(7)**, 2845-2850.
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (28th ed.) CLSI supplement M100*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2006). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Seventh Edition: M07*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. ve Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, **238**, 86–95.
- Crabbé, A., Liu, Y., Matthijs, N., Rigole, P., De La Fuente-Núñez, C., Davis, R. ve ark. (2017). Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. *Scientific Reports*, **7(1)**, 1-13.
- Dalton, T., Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., Watters, C., Griswold, J.A. ve ark. (2011). An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PloS One*, **6(11)**, e27317.
- Dean, S.N., Bishop, B.M. ve Van Hoek, M.L. (2011). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 128.

- Diggle, S.P. ve Whiteley, M. (2020). Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, **166(1)**, 30.
- Ding, B., Guan, Q., Walsh, J.P., Boswell, J.S., Winter, T.W., Winter, E.S. ve ark. (2002). Correlation of the antibacterial activities of cationic peptide antibiotics and cationic steroid antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45(3)**, 663-669.
- Ding, B., Taotofa, U., Orsak, T., Chadwell, M. ve Savage, P.B. (2004). Synthesis and characterization of peptide– cationic steroid antibiotic conjugates. *Organic Letters*, **6(20)**, 3433-3436.
- Dosler, S. ve Karaaslan, E. (2014). Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, **62**, 32-37.
- Durnaś, B., Wnorowska, U., Pogoda, K., Deptuła, P., Wątek, M., Piktel, E. ve ark. (2016). Candidacidal activity of selected ceragenins and human cathelicidin LL-37 in experimental settings mimicking infection sites. *PloS One*, **11(6)**, e0157242.
- ECDC (2020). *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)–annual epidemiological report 2019*. European Centre for Disease Prevention and Control. Erişim 10.10.2021, <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
- ECSF (2018). *ECFS Patient Registry annual data report 2018*. European Cystic Fibrosis Society. Erişim 23.10.2021, https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2018_v1.4.pdf
- Erkekoğlu, P. ve Baydar, T. (2021). Güncel *in vitro* sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **41(1)**, 45-63.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **160(2)**, 171-177.
- Fuxman, J.I., Russo, D.M., Gabelloni, M.L., Geffner, J.R., Giordano, M., Catalano, M. ve ark. (2010). Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Immunology*, **184**, 6386-6395.

- Garcia-Medina, R., Dunne, W.M., Singh, P.K. ve Brody, S.L. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, **73**(12), 8298-8305.
- Geitani, R., Moubareck, C.A., Touqui, L. ve Sarkis, D.K. (2019). Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, **19**(1), 1-12.
- Gellatly, S.L. ve Hancock, R.E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, **67**(3), 159-173.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. ve ark. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **51**(5), 1417-1423.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. ve Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, **198**(1), 1-15.
- Hacioglu, M., Oyardi, O., Bozkurt-Guzel, C. ve Savage, P. B. (2020). Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *The Journal of Antibiotics*, **73**, 455-462.
- Harrison, R.G., Greenman, M., Mall, F.P. ve Jackson, C. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, **1**, 116–128.
- Hashemi, M.M., Holden, B.S. ve Savage, P.B. (2018). Ceragenins as non-peptide mimics of endogenous antimicrobial peptides. İçinde A. Budimir (Ed.), *Fighting Antimicrobial Resistance*. IAPC Publishing; 139-169.
- Hashemi, M.M., Holden, B.S., Taylor, M.F., Wilson, J., Coburn, J., Hilton, B. ve ark. (2018). Antibacterial and antifungal activities of poloxamer micelles containing ceragenin CSA-131 on ciliated tissues. *Molecules*, **23**(3), 596.
- Hashemi, M.M., Rovig, J., Weber, S., Hilton, B., Forouzan, M.M. ve Savage, P.B. (2017). Susceptibility of colistin-resistant, Gram-negative bacteria to antimicrobial peptides and ceragenins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **61**(8), e00292-17.
- Høiby, N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine*, **9**(1), 1-7.

- Howell, M.D., Streib, J.E., Kim, B.E., Lesley, L.J., Dunlap, A. P., Geng, D. ve ark. (2009). Ceragenins: a class of antiviral compounds to treat orthopox infections. *Journal of Investigative Dermatology*, **129(11)**, 2668-2675.
- Howlin, R.P., Cathie, K., Hall-Stoodley, L., Cornelius, V., Duignan, C., Allan, R.N. ve ark. (2017). Low-dose nitric oxide as targeted anti-biofilm adjunctive therapy to treat chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Molecular Therapy*, **25(9)**, 2104-2116.
- Hwang, W. ve Yoon, S.S. (2019). Virulence characteristics and an action mode of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, **9(1)**, 1-15.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A. ve ark. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, **81(1)**, 7-11.
- Jung, H.S., Ehlers, M.M., Lombaard, H., Redelinghuys, M.J. ve Kock, M.M. (2017). Etiology of bacterial vaginosis and polymicrobial biofilm formation. *Critical Reviews in Microbiology*, **43(6)**, 651-667.
- Kalsy, M., Tonk, M., Hardt, M., Dobrindt, U., Zdybicka-Barabas, A., Cytrynska, M. ve ark. (2020). The insect antimicrobial peptide cecropin A disrupts uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, **6(1)**, 1-8.
- Khatoun, Z., McTiernan, C.D., Suuronen, E., Mah, T.F. ve Alarcon, E.I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, **4(12)**, e01067.
- Kim, J., Hegde, M. ve Jayaraman, A. (2010). Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host–pathogen interactions. *Lab on A Chip*, **10(1)**, 43-50.
- Klockgether, J. ve Tümmeler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research*, **6**, 1261.
- Kolpen, M., Mousavi, N., Sams, T., Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Moser, C. ve ark. (2016). Reinforcement of the bactericidal effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by hyperbaric oxygen treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **47(2)**, 163-167.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N. ve Straus, S.K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, **8(1)**, 4.

- Kuroda, K., Fukuda, T., Okumura, K., Yoneyama, H., Isogai, H., Savage, P. B. ve ark. (2013). Ceragenin CSA-13 induces cell cycle arrest and antiproliferative effects in wild-type and p53 null mutant HCT116 colon cancer cells. *Anti-cancer Drugs*, **24(8)**, 826-834.
- Kuroda, K., Okumura, K., Isogai, H. ve Isogai, E. (2015). The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. *Frontiers in Oncology*, **5**, 144.
- Latorre, M.C., Pérez-Granda, M.J., Savage, P.B., Alonso, B., Martín-Rabadán, P., Samaniego, R. ve ark. (2021). Endotracheal tubes coated with a broad-spectrum antibacterial ceragenin reduce bacterial biofilm in an in vitro bench top model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **76(5)**, 1168-1173.
- Law, N., Logan, C., Yung, G., Furr, C.L.L., Lehman, S.M., Morales, S. ve ark. (2019). Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*, **47(4)**, 665-668.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. ve Beloin, C. (2013). From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, **2(2)**, 288-356.
- Lee, K. ve Yoon, S.S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27(6)**, 1053-1064.
- Leszczyńska, K., Namiot, A., Fein, D.E., Wen, Q., Namiot, Z., Savage, P.B. ve ark. (2009). Bactericidal activities of the cationic steroid CSA-13 and the cathelicidin peptide LL-37 against *Helicobacter pylori* in simulated gastric juice. *BMC Microbiology*, **9(1)**, 187.
- Li, C., Peters, A.S., Meredith, E.L., Allman, G.W. ve Savage, P.B. (1998). Design and synthesis of potent sensitizers of Gram-negative bacteria based on a cholic acid scaffolding. *Journal of the American Chemical Society*, **120(12)**, 2961-2962.
- Liu, X., Rodeheaver, D.P., White, J.C., Wright, A.M., Walker, L.M., Zhang, F. ve ark. (2018). A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **97**, 24-32.
- Macia, M.D., Rojo-Molinero, E. ve Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, **20(10)**, 981-990.

- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A.L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A. ve ark. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **20(9)**, 216-230.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G. ve ark. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**, 268–281.
- Malhotra, S., Hayes, D. ve Wozniak, D.J. (2019). Cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the host-microbe interface. *Clinical Microbiology Reviews*, **32(3)**, e00138-18.
- Mangoni, M.L., McDermott, A.M. ve Zasloff, M. (2016). Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology*, **25(3)**, 167-173.
- Maurice, N.M., Bedi, B. ve Sadikot, R.T. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **58(4)**, 428-439.
- McBain, A.J. (2009). *In vitro* biofilm models: an overview. *Advances in Applied Microbiology*, **69**, 99-132.
- Mercer, D.K., Torres, M.D., Duay, S.S., Lovie, E., Simpson, L., von K ckritz-Blickwede, M. ve ark. (2020). Antimicrobial susceptibility testing of antimicrobial peptides to better predict efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 326.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E. ve O'Toole, G.A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, **1**, 1B-1.
- Mirtajani, S.B., Farnia, P., Hassanzad, M., Ghanavi, J., Farnia, P. ve Velayati, A.A. (2017). Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analyzis. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, **1(2)**, 105.
- Mishra, B. ve Wang, G. (2017). Titanium surfaces immobilized with the major antimicrobial fragment FK-16 of human cathelicidin LL-37 are potent against multiple antibiotic-resistant bacteria. *Biofouling*, **33(7)**, 544-555.
- Miyoshi-Akiyama, T., Tada, T., Ohmagari, N., Viet Hung, N., Tharavichitkul, P., Pokhrel, B.M. ve ark. (2017). Emergence and spread of epidemic multidrug-

- resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome biology and evolution*, **9(12)**, 3238-3245.
- Montefusco-Pereira, C.V., Horstmann, J.C., Ebensen, T., Beisswenger, C., Bals, R., Guzmán, C.A. ve ark. (2020). *P. aeruginosa* Infected 3D Co-culture of bronchial epithelial cells and macrophages at air-liquid interface for preclinical evaluation of anti-infectives. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **160**, e61069.
- Moradali, M.F., Ghods, S. ve Rehm, B.H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 39.
- Moreau-Marquis, S., Bomberger, J.M., Anderson, G.G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S., O'Toole, G.A. ve ark. (2008). The $\Delta F508$ -CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **295(1)**, L25-L37.
- Moreau-Marquis, S., Redelman, C.V., Stanton, B.A. ve Anderson, G.G. (2010). Co-culture models of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on live human airway cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **(44)**, e2186.
- Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A. ve O'Toole, G.A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **21(4)**, 595-599.
- Moscoso, M., Esteban-Torres, M., Menéndez, M. ve García, E. (2014). In vitro bactericidal and bacteriolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *PLoS One*, **9(7)**, e101037.
- Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S. ve Pardesi, K.R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 539.
- Nagant, C., Feng, Y., Lucas, B., Braeckmans, K., Savage, P. ve Dehaye, J.P. (2011). Effect of a low concentration of a cationic steroid antibiotic (CSA-13) on the formation of a biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, **111(3)**, 763-772.

- Nagant, C., Savage, P.B. ve Dehaye, J.P. (2012). Effect of pluronic acid F-127 on the toxicity towards eukaryotic cells of CSA-13, a cationic steroid analogue of antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, **112**(6), 1173-1183.
- Nagant, C., Tré-Hardy, M., El-Ouaaliti, M., Savage, P., Devleeschouwer, M. ve Dehaye, J.P. (2010). Interaction between tobramycin and CSA-13 on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a model of young and mature biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **88**(1), 251-263.
- Newman, J.W., Floyd, R.V. ve Fothergill, J.L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(15), fnx124.
- Nichols, D.P., Happoldt, C.L., Bratcher, P.E., Caceres, S.M., Chmiel, J.F., Malcolm, K.C. ve ark. (2017). Impact of azithromycin on the clinical and antimicrobial effectiveness of tobramycin in the treatment of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, **16**(3), 358-366.
- Niemirowicz, K., Durnaś, B., Tokajuk, G., Piktel, E., Michalak, G., Gu, X. ve ark. (2017). Formulation and candidacidal activity of magnetic nanoparticles coated with cathelicidin LL-37 and ceragenin CSA-13. *Scientific Reports*, **7**(1), 1-12.
- Niemirowicz, K., Piktel, E., Wilczewska, A.Z., Markiewicz, K.H., Durnaś, B., Wątek, M. ve ark. (2016). Core-shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 5443.
- Noore, J., Noore, A. ve Li, B. (2013). Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra-and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(3), 1283-1290.
- O'Loughlin, C.T., Miller, L.C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M.F. ve Bassler, B.L. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(44), 17981-17986.
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., Jehl, F. (2020). Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 2894.

- Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E.C., Rehm, B.H. ve Hancock, R.E. (2008). Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity*, **76(9)**, 4176-4182.
- Oyardi, O., Savage, P.B., Erturan, Z. ve Bozkurt-Guzel, C. (2021). *In vitro* assessment of CSA-131 and CSA-131 poloxamer form for the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **76(2)**, 443-450.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.J. ve Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, **37(1)**, 177-192.
- Parkins, M.D., Somayaji, R. ve Waters, V.J. (2018). Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **31(4)**, e00019-18.
- Peschel, A. ve Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, **4(7)**, 529-536.
- Piktel, E., Markiewicz, K.H., Wilczewska, A.Z., Daniluk, T., Chmielewska, S., Niemirowicz-Laskowska, K. ve ark. (2020). Quantification of synergistic effects of ceragenin CSA-131 combined with iron oxide magnetic nanoparticles against cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, **15**, 4573.
- Piktel, E., Pogoda, K., Roman, M., Niemirowicz, K., Tokajuk, G., Wróblewska, M. ve ark. (2017). Sporicidal activity of ceragenin CSA-13 against *Bacillus subtilis*. *Scientific reports*, **7(1)**, 1-12.
- Pollard, J.E., Snarr, J., Chaudhary, V., Jennings, J.D., Shaw, H., Christiansen, B. ve ark. (2012). *In vitro* evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67(11)**, 2665-2672.
- Prabu, S.J., Umamaheswari, A. ve Grace Felciya, S.J. (2020). Investigation on the biofilm eradication potential of selected medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology Reports*, **28**, e00523.
- Price, K.E., Naimie, A.A., Griffin, E.F., Bay, C. ve O'Toole, G.A. (2016). Tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* PA14 enhances *Streptococcus constellatus* 7155 biofilm formation in a cystic fibrosis model system. *Journal of Bacteriology*, **198(2)**, 237-247.

- Ramage, G., Lappin, D.F., Millhouse, E., Malcolm, J., Jose, A., Yang, J. ve ark. (2017). The epithelial cell response to health and disease associated oral biofilm models. *Journal of Periodontal Research*, **52(3)**, 325-333.
- Riethmüller, J., Herrmann, G., Graepler-Mainka, U., Hellwig, D., Heuer, H.E., Heyder, S. ve ark. (2016). Sequential inhalational tobramycin-colistin-combination in CF-patients with chronic *P. aeruginosa* colonization-an observational study. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **39(3)**, 1141-1151.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M. ve Glasebrook, A.L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, **142(2)**, 257-265.
- Romoli, O., Mukherjee, S., Mohid, S.A., Dutta, A., Montali, A., Franzolin, E. ve ark. (2019). Enhanced silkworm cecropin B antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* from single amino acid variation. *ACS Infectious Diseases*, **5(7)**, 1200-1213.
- Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J.A., Marvig, R.L., Haagensen, J.A., Sommer, L.M. ve ark. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 331-342.
- Savage, P.B. (2020). Effects of ceragenins on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in burn wounds in a porcine model. *Journal of Burn Care & Research*, **41**, S262-S263.
- Schmidtchen, A., Frick, I.M., Andersson, E., Tapper, H. ve Björck, L. (2002). Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular Microbiology*, **46(1)**, 157-168.
- Shriky, B., Kelly, A., Isreb, M., Babenko, M., Mahmoudi, N., Rogers, S. ve ark. (2020). Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development. *Journal of Colloid and Interface Science*, **565**, 119-130.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B. ve ark. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48(12)**, 4673-4679.
- Smith, R.S. ve Iglewski, B.H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, **6(1)**, 56-60.

- Smith, W.D., Bardin, E., Cameron, L., Edmondson, C.L., Farrant, K.V., Martin, I. ve ark. (2017). Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(14), fnx121.
- Smith, S., Rowbotham, N.J. ve Regan, K.H. (2018). Inhaled anti-pseudomonal antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **3**, CD0010.
- Taccetti, G., Francalanci, M., Pizzamiglio, G., Messori, B., Carnovale, V., Cimino, G. ve ark. (2021). Cystic fibrosis: Recent insights into inhaled antibiotic treatment and future perspectives. *Antibiotics*, **10**(3), 338.
- Thi, M.T.T., Wibowo, D. ve Rehm, B.H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(22), 8671.
- THSK (2016). *Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi, 2016 Yıllık Raporu*. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Erişim 10.10.2021, [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlari ve Biyolojik Urunler DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf)
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm development. *Microbial Biofilms*, **3**(2), MB-0001-2014.
- UKKS (2019). *Ulusal Kistik Fibrozis Kayıt Sistemi 2019 Yılı veriler*. Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları ve Kistik Fibrozis Derneği. Erişim 23.10.2021, <https://www.kistikfibrozisturkiye.org/wp-content/uploads/2021/05/KF-Rapor-05.03.2021-1.pdf>
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A. ve Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(12), 6911-6916.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, **1**(3), 00014.
- Verma, A., Verma, M. ve Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. İçinde A. Verma ve Singh A. (Ed.), *Animal Biotechnology*. Academic Press; 269-293
- Vila-Farrés, X., Callarisa, A.E., Gu, X., Savage, P.B., Giralt, E. ve Vila, J. (2015). CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and

- Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **46(5)**, 568-571.
- Wang, M., Lin, J., Sun, Q., Zheng, K., Ma, Y. ve Wang, J. (2019). Design, expression, and characterization of a novel cecropin A-derived peptide with high antibacterial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103(4)**, 1765-1775.
- Wang, H., Williams, G.R., Wu, J., Wu, J., Niu, S., Xie, X. ve ark. (2019). Pluronic F127-based micelles for tumor-targeted bufalin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **559**, 289-298.
- WHO (2018). *Central asian and eastern european surveillance of antimicrobial resistance: Annual report 2018*. World Health Organization. Erişim 10.10.2021, <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2018/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-annual-report-2018-2018>
- WHO (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. World Health Organization. Erişim 10.10.2021, <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short-Summary-25Feb-ET-NM-WHO.pdf>
- Williams, D.L. ve Bloebaum, R.D. (2010). Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microscopy and Microanalysis*, **16(2)**, 143-152.
- Wimley, W.C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, **5(10)**, 905-917.
- Wnorowska, U., Fiedoruk, K., Piktel, E., Prasad, S.V., Sulik, M., Janion, M. ve ark. (2020). Nanoantibiotics containing membrane-active human cathelicidin LL-37 or synthetic ceragenins attached to the surface of magnetic nanoparticles as novel and innovative therapeutic tools: current status and potential future applications. *Journal of Nanobiotechnology*, **18(1)**, 1-18.
- Wnorowska, U., Niemirowicz, K., Myint, M., Diamond, S.L., Wróblewska, M., Savage, P.B. ve ark. (2015). Bactericidal activities of cathelicidin LL-37 and select cationic lipids against the hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* strain

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

cerageninler ve antimikrobiyal peptidlerin insan havayolu epitel hücresi üzerinde oluşturulan pseudomonas aeruginosa biyofilmi üzerine etkileri

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 6	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	Mayram Hacıoglu, Ozlem Oyardi, Cagla Bozkurt-Guzel, Paul B. Savage. "Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms", The Journal of Antibiotics, 2020 Yayın	<% 1
3	www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ivekkongre.com