

T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



**METABOLOMİK YAKLAŞIMLAR VE BİYOİNFORMATİK
ANALİZLER KULLANILARAK AMPİSİLİN VE SEFTAZİDİM
ANTİBİYOTİKLERİNİN PROTEUS MİRABİLİS ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

KÜBRA TEKŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

HAZİRAN - 2024

KASTAMONU

TEZ ONAYI

Kübra TEKŞEN tarafından hazırlanan “**METABOLOMİK YAKLAŞIMLAR VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLER KULLANILARAK AMPİSİLİN VE SEFTAZİDİM ANTİBİYOTİKLERİNİN PROTEUS MİRABİLİS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **24.06.2024** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER Kastamonu Üniversitesi	
Eş Danışman	Dr. Öğr. Üyesi İdil YET Hacettepe Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ilgaz AKATA Ankara Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Nezahat TURFAN Kastamonu Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Doç. Dr. Selçuk MEMİŞ

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Kübra TEKŞEN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METABOLOMİK YAKLAŞIMLAR VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLER KULLANILARAK AMPİSİLİN VE SEFTAZİDİM ANTİBİYOTİKLERİNİN PROTEUS MİRABİLİS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

KÜBRA TEKŞEN

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ İDİL YET

Antibiyotik direnci, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi olarak bilinen genellikle doğal bir süreçtir. Bu direnç, antibiyotiklerin mikroorganizmalara karşı etkisiz hale gelmesine veya etkisinin azaltılmasına neden olarak, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırabilir ve daha ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Antibiyotik direnciyle mücadele etmek için, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerindeki değişikliklerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi antibiyotik direncinin anlaşılmasında önemlidir. *Proteus mirabilis* özellikle kadınlarda idrar yolları enfeksiyonları (İYE) gibi üriner sistem enfeksiyonlarının yaygın bir nedeni olan kritik bir patojendir. *P. mirabilis* enfeksiyonlarının tedavisi için genellikle antibiyotiklere dayalı bir yaklaşım kullanılmaktadır. Ancak dirençli suşlarla karşılaşıldığında, tedavi seçenekleri sınırlı hale gelebilir. *P. mirabilis*'in antibiyotik direnci, enfeksiyonla mücadeleyi zorlaştırarak klinik tedavi sürecini sınırlayabilmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında *P. mirabilis*'in alt-inhibitör konsantrasyonundaki ampisiline bağlı oluşan antibiyotik direnci gelişimi sürecini simüle etmek ve ampisiline karşı direnç kazandırılmış pasajların başka antibiyotiklere çapraz direnç geliştirip geliştirmediğinin metabolik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *P. mirabilis* suşuna disk difüzyon yöntemi ile alt-inhibitör konsantrasyonda ampisiline karşı adım adım direnç kazandırılarak dirençli pasajlar elde edilmiştir. Her bir adımdan elde edilen ampisilin dirençli pasajlara ve duyarlı kontrol suşlarına ampisilin ve seftazidim antibiyotikleri uygulanarak metabolomik profillerinde meydana gelen farklılıkların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasından elde edilen metabolomik veriler, istatistiksel ve biyoinformatik analizlerle desteklenerek metabolik yolların haritalanması, metabolik değişikliklerin anlaşılması ve metabolitler arasındaki etkileşimlerin belirlenmesinde katkı sağlamaktadır. Antibiyotik direnci çalışmalarında metabolomik çalışmalar, dirençli mikroorganizmalarda metabolik değişikliklerin belirlenmesinde, mikroorganizmaların antibiyotik maruziyetine karşı verdiği yanıtın anlaşılmasında, antibiyotiklerin metabolik yolları nasıl etkilediğinin anlaşılmasında ve antibiyotik direnci mekanizmalarının kapsamlı anlaşılması için değerli bilgiler sağlamaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: Antimikrobiyal Direnç, Antibiyotik Direnci, GC-MS, Metabolomik, Biyoinformatik

Haziran 2024, 81 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF AMPICILLIN AND CEFTAZIDIME ANTIBIOTICS ON *PROTEUS MIRABILIS* USING METABOLOMICS APPROACHES AND BIOINFORMATICS ANALYSES

KÜBRA TEKŞEN

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR:PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

CO-SUPERVISOR:ASSIST PROF. DR. İDİL YET

Antibiotic resistance is a generally natural process in which microorganisms develop resistance to antibiotics. This resistance can cause antibiotics to become ineffective or less effective against microorganisms, making infections more difficult to treat and leading to more serious complications. To combat antibiotic resistance, comprehensive analysis of changes in the metabolic activities of microorganisms can be helpful in understanding antibiotic resistance. *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) is a critical pathogen that is a common cause of urinary tract infections, such as urinary tract infections (UTI), especially in women. An antibiotic-based approach is often used to treat *P. mirabilis* infections. However, when resistant strains are encountered, treatment options may become limited. Antibiotic resistance of *P. mirabilis* can make it difficult to fight infection and limit the clinical treatment process. Therefore, in this thesis study, it was aimed to examine the process of antibiotic resistance development of *P. mirabilis* due to ampicillin at sub-inhibitory concentration and whether passages resistant to ampicillin develop cross-resistance to other antibiotics using metabolic methods. For this purpose, resistant passages were obtained by gradually imparting resistance to ampicillin at sub-inhibitory concentration to the *P. mirabilis* strain using the disc diffusion method. It was aimed to compare the expression of the differences in the metabolomic profiles by applying ampicillin and ceftazidime antibiotics to the ampicillin-resistant passages and sensitive control strains obtained from each step. Metabolomic data obtained from the thesis study, supported by statistical and bioinformatic analyses, contribute to mapping metabolic pathways, understanding metabolic changes and determining interactions between metabolites. In antibiotic resistance studies, metabolomics provides valuable information in identifying metabolic changes in resistant microorganisms, understanding the response of microorganisms to antibiotic exposure, understanding how antibiotics affect metabolic pathways, and providing a comprehensive understanding of antibiotic resistance mechanisms.

KEYWORDS:Antimicrobial Resistance, Antibiotic Resistance, GC-MS, Metabolomics, Bioinformatics

June 2024, 81 Page

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu tez çalışmasının her aşamasında beni destekleyen, yol gösteren ve güven veren danışman hocam Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e ve eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İdil YET'e içten teşekkürlerimi sunarım. Jüri üyelerim olan ve aynı zamanda Ankara Üniversitesinde lisans öğrencisi olduğum zamanlardan bugüne beni her zaman destekleyen ve yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Ilgaz AKATA'ya; her zaman yanımda olduğu için ve bana kattıkları için değerli hocam ve oda arkadaşım Doç. Dr. Nezahat TURFAN'a teşekkür ediyorum. Ayrıca, Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesindeki tüm akademisyen hocalarıma, deneysel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan, Prof. Dr. Kerem CANLI'ya ve ekibine, tez çalışmam sırasında değerli katkılarıyla yanımda olan ve bana destek veren arkadaşım Umay Merve ŞENTURAN'a, eğitim hayatımın temellerini attığı için, ilkokul öğretmenim Pakize ÖZBEY'e, son olarak fedakarlıkları ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme ve sevdiklerime sonsuz şükranlarımı sunarım.

Kübra TEKŞEN

Kastamonu, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Omik Teknolojiler.....	1
1.2 Antibiyotik Direncine Karşı “Omik” Yaklaşımlar	3
1.3 Metabolomik	4
1.3.1 Metabolomik Yaklaşımlar	5
1.3.2 Metabolomikte Analitik Teknikler	6
1.3.2.1 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR).....	6
1.3.2.2 Kütle spektrometrisi (MS).....	7
1.3.2.3 Uçuş süresi kütle spektrometrisi (TOF/MS)	8
1.3.3 Bakteriyal Metabolomik	8
2. LİTERATÜR TARAMASI	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 Materyaller.....	17
3.1.1 Petri Kapları.....	17
3.1.2 Cam Şişeler	17
3.1.3 Otomatik Mikropipetler ve Mikropipet Uçları	17
3.1.4 Steril Özeler ve Steril Eküvyon Çubukları	18
3.1.5 Pens	18
3.1.6 Nutrient Broth (NB).....	18
3.1.7 Agar	18
3.1.8 Antibiyotik Diskleri	19
3.1.9 Etil Alkol.....	19
3.1.10 Metil Alkol.....	20
3.1.11 Distile Su.....	20
3.1.12 İspirto Ocağı	20
3.1.13 Alüminyum Folyo Kâğıdı	20
3.1.14 Parafilm.....	20
3.1.15 Deney Tüpleri	21
3.1.16 Falkon Tüpleri.....	21
3.1.17 Steril Eppendorf Tüpleri	21
3.1.18 Buz Kasetleri.....	21
3.1.19 Metoksiamin Hidroklorür	21
3.1.20 N-Metil-N-(Trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve %1 Trimetil klorosilan (TMCS).....	22
3.1.21 Phosphate Buffer Saline (PBS).....	22

3.1.22	Piridin.....	22
3.2	Cihazlar	23
3.2.1	Otoklav.....	23
3.2.2	Hassas Terazı	23
3.2.3	Biyogüvenlik Kabini.....	23
3.2.4	Distile Su Cihazı	24
3.2.5	İnkübatör (Etüv).....	24
3.2.6	Buzdolabı ve Derin Dondurucu	24
3.2.7	Liyofilizatör	25
3.2.8	Santrifüj	25
3.2.9	GC-MS (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi)	25
3.2.10	McFarland Densitometresi.....	25
3.3	Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma	26
3.4	Yöntem.....	26
3.4.1	Besiyeri Hazırlama	26
3.4.2	İnokulum Hazırlanması.....	27
3.4.3	Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Direnç Mekanizmasının Tetiklenmesi.....	27
3.4.4	Metabolomik Analiz	31
3.4.5	Metabolit Analizinde GC-MS Koşulları.....	33
3.4.6	Veri İşleme.....	34
4.	BULGULAR	36
4.1	Kirby-Bauer Disk Difüzyon Duyarlılık Testi Sonuçları.....	36
4.1.1	Başlangıç Durumu (P0)	36
4.1.2	Birinci Pasaj (P1)	37
4.1.3	İkinci Pasaj (P2).....	38
4.1.4	Üçüncü Pasaj (P3).....	38
4.1.5	Dördüncü Pasaj (P4)	39
4.1.6	Beşinci Pasaj (P5)	40
4.2	Antibiyogram Testi Sonuçları.....	41
4.2.1	Başlangıç <i>P. mirabilis</i> Suşun (P0) Antibiyogramı.....	42
4.2.2	Beşinci Pasaj (P5) Antibiyogramı.....	42
4.3	Yolak Analizleri.....	43
4.3.1	Ampisilin (AMP) Uygulanan Gruplar Arası Anlamlı Farklılaşan Metabolitler ve Yolak Analizleri	44
4.3.1.1	P5_AMP-P0_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim	46
4.3.1.2	P3_AMP -P0_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim	48
4.3.1.3	P5_AMP -P1_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim	49
4.3.1.4	P5_AMP -P3_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim	50
4.3.1.5	P5_AMP-P5_K Grupları Arası Metabolik Değişim	52
4.3.2	Seftazidim (CAZ) Uygulanan Gruplar Arası Anlamlı Farklılaşan Metabolitler ve Yolak Analizleri	53
4.3.2.1	P0_K-P0_CAZ Grupları Arası Metabolik Değişim.....	54
4.3.2.2	P5_K-P5_CAZ Grupları Arası Metabolik Değişim.....	55
5.	TARTIŞMA	56
5.1	AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Vitamin B6 Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi	57
5.2	AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Doymamış Yağ Asitlerinin Biosentezine Etkisinin Değerlendirilmesi	61

5.3	AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Tirozin Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi	63
5.4	AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Galaktoz Metabolizması, Amino Şeker ve Nükleotid Şeker Metabolizması, Nişasta ve Sükroz Metabolizması Üzerinde Etkisinin Değerlendirilmesi	63
5.5	AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Pürin Metabolizması Üzerinde Etkisinin Değerlendirilmesi	64
6.	SONUÇ	65
7.	ÖNERİLER	66
	KAYNAKLAR	67
	EKLER	74
	EK A. Yolak Haritaları	75
	ÖZGEÇMİŞ	81



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Metabolik parmak izi çıkarılması (hedefsiz), metabolik profil çıkarılması (hedefli) ve metabolik ayak izi (ekzo-metabolomik)	6
Şekil 3.1 Kullanılan Antibiyotik Diskler	19
Şekil 3.2 Biyogüvenlik kabini	24
Şekil 3.3 Besiyeri Hazırlama İşlemi	27
Şekil 3.4 AMP antibiyotiğine karşı başlangıç durumunda <i>P. mirabilis</i> (P0) suşu ve 5. Pasajın (P5) antibiyogram testi	28
Şekil 3.5 Disk difüzyon yöntemi ile direnç geliştirme işlemi	29
Şekil 3.6 Stoktan çekilmiş <i>P. mirabilis</i> suşu (P0) ve adım adım direnç geliştirilmiş suşların (P1, P2, P3, P4, P5) AMP'ye karşı antibiyogram testleri	30
Şekil 3.7 P0 Orijinal suş ve 5. pasaj suşun CIP, SXT, CAZ, CFM, ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogramı	31
Şekil 3.8 Santrifüjleme işlemi	32
Şekil 3.9 Liyofilizatör ile kurulma işlemi	32
Şekil 3.10 Metabolomik iş akışı	33
Şekil 3.11 GC-MS Analiz İşlemi	34
Şekil 4.1 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: Başlangıç durumu (P0)	36
Şekil 4.2 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 1.Pasaj	37
Şekil 4.3 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 2.Pasaj	38
Şekil 4.4 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 3. Pasaj	39
Şekil 4.5 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 4. Pasaj	40
Şekil 4.6 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 5. Pasaj	41
Şekil 4.7 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogram: P0 suşu	42
Şekil 4.8 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogram: P5 suşu	43
Şekil 4.9 Ampisilin uygulanmış ve kontrol gruplarının temel bileşen analizi (PCA)	45
Şekil 4.10 Gruplar arası anlamlı değişen metabolitlerin ısı grafiği	46
Şekil 4.11 P5 _AMP -P0 _AMP yolak etki analizi	47
Şekil 4.12 P3 _AMP -P0 _AMP yolak etki analizi	48
Şekil 4.13 P5 _AMP -P1 _AMP yolak etki analizi	50
Şekil 4.14 P5 _AMP -P3 _AMP yolak etki analizi	52
Şekil 4.15 P5 _K-P5 _AMP yolak etki analizi	53
Şekil 4.16 P0 _K-P0 _CAZ yolak etki analizi	54
Şekil 4.17 P5 _K-P5 _CAZ yolak etki analizi	55
Şekil 5.1 PLP Biyosentezi	57

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1 Başlangıç durumunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	36
Tablo 4.2 Birinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	37
Tablo 4.3 İkinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	38
Tablo 4.4 Üçüncü pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	39
Tablo 4.5 Dördüncü pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	40
Tablo 4.6 Beşinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları	41
Tablo 4.7 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı başlangıç durumunda (P0) oluşan inhibisyon zonlarının çapları	42
Tablo 4.8 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı beşinci pasajda (P5) oluşan inhibisyon zonlarının çapları	43
Tablo 4.9 P5_AMP ve P0_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	47
Tablo 4.10 P3_AMP ve P0_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	48
Tablo 4.11 P5_AMP ve P1_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	49
Tablo 4.12 P5_AMP ve P3_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	51
Tablo 4.13 P5_K ve P5_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	52
Tablo 4.14 P0_K ve P0_CAZ grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	54
Tablo 4.15 P5_K ve P5_CAZ grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	: Santimetre
Da	: Dalton
g	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
m	: Metre
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
m/z	: kütle/yük
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen Gücü
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde

Kısaltmalar

AMP	: Ampisilin
ATP	: Adenozin Trifosfat
CE-MS	: Kapiler Elektroforez - Kütle Spektroskopisi
CFM	: Sefiksim
CAZ	: Seftazidim
CIP	: Siprofloksasin
CN	: Gentamisin
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
EI	: Elektron İyonizasyon
ETP	: Ertapenem
EtOH	: Etil Alkol, Etanol
GC-MS	: Gaz Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Log₂	: İki tabanında logaritma
Log₁₀	: On tabanında logaritma
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi
MSTFA	: N-Metil-N-(Trimetilsilil) trifloroasetamid
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSSA	: Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MDR	: Çoklu İlaç Direnci
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MHB	: Müller Hinton Broth
MeOH	: Metil Alkol, Metanol

NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NB	: Nutrient Broth
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCA	: Temel Bileşen Analizi
SXT	: Sulfametoksazol
TMCS	: Trimetil klorosilan
TOF-MS	: Uçuş Süresi- Kütle Spektroskopisi
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonu



1. GİRİŞ

1.1 Omik Teknolojiler

Günümüzdeki teknolojik gelişmeler sayesinde genomik, proteomik, metabolomik gibi “Omik” analizler hastalıkların mekanizmasını anlamak, kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin seçimi ve erken teşhis için biyobelirteç belirleme gibi birçok alanda çok büyük bir potansiyel sunmaktadır. Çeşitli biyoinformatik araçlar ve veri tabanlarının kullanımı ile birlikte biyolojik sistemlerin kapsamlı analizinde omik teknolojileri denilen yeni bir çağ başlamıştır (Hasin, 2017).

Genomik, organizmanın tüm genomunu yapısal ve fonksiyonel olarak inceleyen en eski omik dalıdır. Kalıtımın temel birimi olan DNA yapısının keşfi ile genomik alanında yıldan yıla artarak birçok yöntem geliştirilmiştir. 1990’da başlayan ve 2003 yılında sonlanan ve uluslararası bir araştırma projesi olan insan genomu projesi ile insan genomu dizilenerek genetik haritamızın ortaya çıkması bu alanda çok büyük yankı uyandırmıştır. Genomik bilim dalının gelişimi sayesinde organizmaya ait bütün genlerin fonksiyonları, yapıları, birbirleri ve çevre ile etkileşimleri incelenerek anlamlandırılabilir (Weissenbach, 2016).

Transkriptomik, bir hücre veya organizmanın belirli bir zamandaki gen ifade düzeylerini inceleyen bir omik dalıdır. Transkriptomik çalışmalarında, gen ifadesi düzeylerini belirlemek için yüksek verimlilikle mRNA moleküllerinin analizi yapılır. Bu gen ifadesi düzeyleri, hücrelerin belirli bir durumda nasıl çalıştığını, hangi genlerin etkin olduğunu ve farklı koşullara nasıl yanıt verdiklerini anlamamıza yardımcı olur (Dong ve Chen, 2013).

Epigenomik, bir organizmanın gen ifadesinin düzenlenmesindeki epigenetik modifikasyonları inceleyen bir araştırma alanıdır. Epigenetik modifikasyonlar, DNA üzerinde kimyasal etiketlerin eklenmesi veya kaldırılması yoluyla gen ifadesini etkileyen kimyasal değişikliklerdir. Bu modifikasyonlar, gen ifadesinin kontrolü, genlerin etkinleştirilmesi veya susturulması, DNA’nın paketlenmesi gibi süreçlere katkıda bulunur (Wang ve Chang, 2018).

Lipidomik, bir organizmanın hücrelerindeki lipid kompozisyonunun kapsamlı analizini ve karakterizasyonunu ifade eden bir araştırma alanıdır. Lipitler, hücre zarı yapısı, enerji depolaması ve sinyal iletimi gibi birçok kritik rolü olan bileşiklerdir. Lipidomik çalışmaları, lipitlerin biyolojik rollerini ve hastalıklarla ilişkilerini anlaşılmasında önemli bir rol oynar (Han, 2016).

Proteom terimi, belli bir zaman ve mekânda bir hücre, doku veya organizmada bulunan proteinlerin toplamını belirtir. Proteomik, bu proteinlerin yapılarını, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını, işlevlerini ve diğer protein ve moleküller ile etkileşimlerini inceleyen bilim dalıdır. Bu alan, proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini araştırmak ve genomik bilginin protein düzeyinde ifadesini anlamak için proteinlerin tanımlanması, miktarının belirlenmesi, protein-protein etkileşimlerinin analizi ve post-transkripsiyonel modifikasyonların araştırılması gibi çeşitli alanları içerir (Cho, 2007).

Metabolom belirli bir zaman diliminde izole edilmiş hücrelerde dokularda veya fizyolojik sıvılarda bulunan tüm metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak kapsamlı analizi olarak tanımlanmaktadır. Metabolomik analiz, canlılarda çeşitli hücresel tepkimeler sırasında ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin saptanması, nitelendirilmesini ve tanımlanmasını sağlamaktadır. Proteomikde olduğu gibi metabolomik de hastalık ile ilgili biyobelirteçlerin tanımlanmasında, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde, biyolojik sistemlerin anlaşılmasına yönelik araştırmalarda kullanılan önemli bir araçtır. Metabolomik diğer omik dallarıyla karşılaştırıldığında nispeten daha dinamiktir, çünkü metabolit konsantrasyonları fizyolojik durumlar ve çevresel faktörler tarafından etkilenerek hızla değişebilir. Metabolomik çalışmalar, çevresel faktörlerin ve fizyolojik değişikliklerin hücre veya organizmanın anlık metabolik durumu üzerindeki etkisini yansıtan dinamik bir perspektif sağlar. Bu sayede metabolitlerin konsantrasyonlarının zaman içinde nasıl değiştiğini, metabolik yolların aktivasyonunu veya inhibisyonunu, metabolizmanın nasıl etkilendiğinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, metabolomik diğer omik dallarıyla da entegre edilebilir ve birlikte kullanıldığında daha kapsamlı bir sistem biyolojisi anlayışı sağlayabilir. Metabolomik yolak analiz verilerinin diğer “omik” disiplinleri ile entegrasyonu organizmanın tanımlayıcı bir görüntüsünü sunar. Bu entegrasyonlar,

metabolik yolların düzenlemesindeki genetik, transkriptomik, proteomik ve lipidomik faktörleri anlamayı sağlayarak kompleks biyolojik sistemlerin daha kapsamlı anlaşılmasına katkıda bulunur (Weckwerth, 2007).

Özellikle post-genomik çağda metabolomik teknolojiler giderek daha da fazla kullanılmaktadır. Metabolik teknolojiler, hücrelerin ve organizmaların metabolit profillerinin kapsamlı analizini yaparak bir hastalık, tedavi veya başka bir çevresel faktöre karşı metabolik yollarında meydana gelen değişikliklerin belirlenmesine ve biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Post -genomik çağda metabolomik teknolojilerin gelişimi, genomik veya transkriptomik verilerin yanı sıra daha kapsamlı ve detaylı bir perspektif sunarak biyokimyasal yollar ve metabolik ağlar arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasında önemli bir rol oynar (Hollywood vd., 2006).

1.2 Antibiyotik Direncine Karşı “Omik” Yaklaşımlar

Antibiyotik direnci, bakteri veya diğer mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı direnç kazanması şeklinde ifade edilen genellikle doğal bir süreçtir. Ancak bu ajanların gereksiz yere, uygun olmayan dozda ve yanlış kullanımı bu direncin hızla yayılmasına neden olmaktadır. Antibiyotik direnci, enfeksiyonların tedavisinde seçeneklerin azalması, hastalarda tedavi sürelerinin uzaması ve tedavi maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır (Abejew vd., 2024). Bu direnç, daha da ciddi halk sağlığı sorunlarına yol açabilecek ve yüksek mortalite oranlarına sebep olabilecek küresel bir sorun haline gelmektedir. Mikroorganizmaların kazandığı bu direnç sistemi, antibiyotiklerin mikroorganizmaları öldürme veya çoğalmalarını inhibe etme yeteneklerini azaltmakta veya tamamen ortadan kaldırmaktadır. Küresel bir sorun olarak kabul edilen antibiyotik direncinin üstesinden gelebilmek için dünya çapında artan bir çaba gösterilmektedir. Antibiyotik keşif yaklaşımlarında klasik yöntemlerin kullanılması antibiyotik direnciyle mücadelede yetersiz kalmaktadır (Spellberg ve Gilbert, 2014). Son yıllarda, yenilikçi yaklaşımlarla bakteri-antibiyotik ilişkisi gibi mikroorganizmaların adaptasyon ve direnç mekanizmalarına odaklanan omik yaklaşımları kullanılmaktadır. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik teknikler; mikroorganizmaların genetik, transkripsiyonel, protein ve metabolit profillerini analiz ederek direnç mekanizmalarını ve adaptasyon süreçlerini

daha iyi anlamamızı sağlamaktadır. Bu omik yaklaşımlar, antibiyotik direncinin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlayarak yeni antibiyotik hedefleri ve tedavi stratejileri geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Kok vd., 2022).

1.3 Metabolomik

Metabolitler, metabolik süreçler sırasında canlılar tarafından sentezlenen, dönüştürülen veya salgılanan ve yapı taşı, sinyal veya yakıt olarak kullanılan küçük kimyasal bileşiklerdir. Biyokimyasal reaksiyonlarda ara ürünler olarak görev alan veya çeşitli tepkimeler sonucunda sentezlenen metabolitler, molekül ağırlıkları 50-1500 Da arasında olan peptitler, amino asitler, şekerler, nükleozitler, lipitler, stereoitler, ketonlar, aminler, alkaloidler, aldehitler, organik asitler gibi küçük moleküllerdir (Goodacre, 2005; Feng Xiao vd., 2012; Patti vd., 2012; Mohd Kamal vd., 2022).

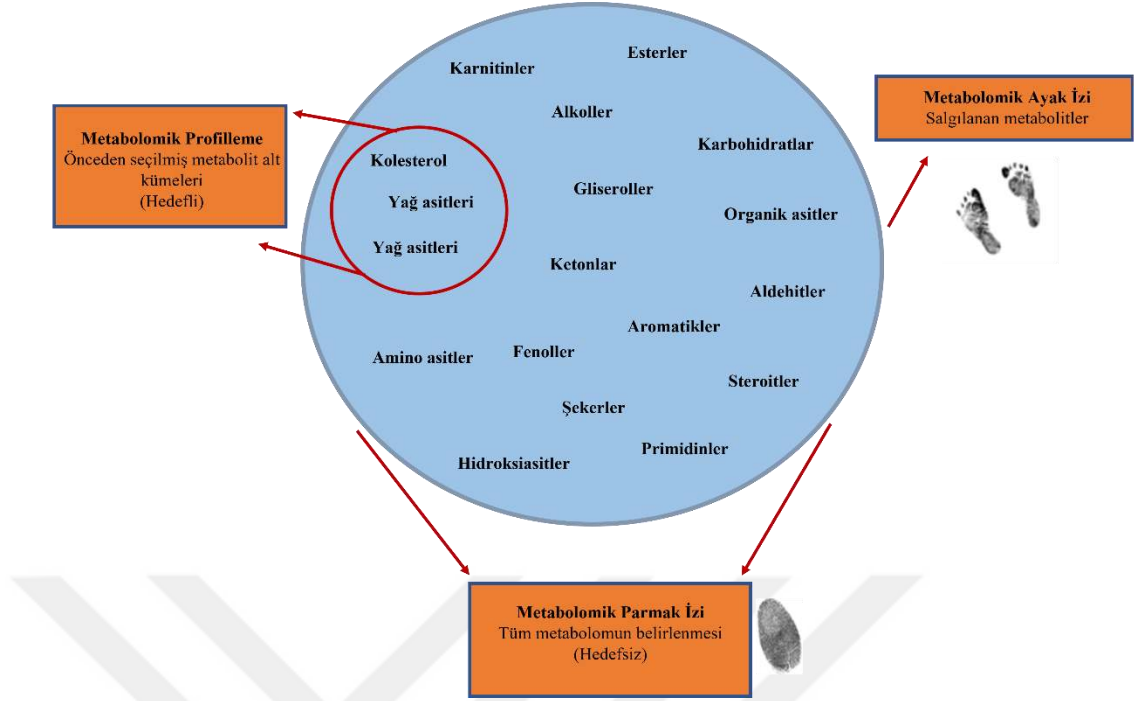
Metabolom, bir hücrede, organda veya organizmada tüm olası koşullar altında bulunan tüm metabolitlerin toplamı olarak ifade edilmektedir (Oliver, 1998). Metabolomdaki değişiklikler organizmanın çevresel etkilere, genetik değişikliklere, hastalık ve tedavilere karşı verdiği en son yanıttır. Metabolomik, belirli bir zaman diliminde hücrelerde, dokularda, fizyolojik sıvılarda bulunan tüm bu metabolitlerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesini ve her bir metabolitin tanımlanmasını ve ölçülmesini amaçlayan analitik bir yaklaşımdır (Fiehn, 2002).

Metabolomik analiz, spektroskopi, kromatografi gibi yüksek verimli teknolojiler kullanılarak belirli bir zaman diliminde metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanması olarak ifade edilebilir (Lenz ve Wilson, 2007). Diğer omik çalışmalar gibi metabolomik de biyolojik sistemlerdeki karmaşık biyokimyasal etkileşimlerin anlaşılmasına katkıda bulunur. Metabolik değişimlerin belirlenmesi yeni terapötik hedeflerin tasarlanması, hastalıkların evrimsel gelişiminin anlaşılması, uygulanan tedavilerin moleküler mekanizmalarının anlaşılması gibi birçok alana olanak sağlamaktadır (Weckwerth ve Morgenthal, 2005).

Metabolomik alışmalar, içinde bulunulan duruma göre tüm metabolitlerdeki artma ve azalmaları belirlemeye çalışır. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü hastalık teşhisi, tedavi sürecinin denetlenmesi, biyobelirteçlerin keşfi ve toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerinin araştırılması gibi alanlarda en ideal uygulama yolu olmuştur (Fiehn, 2002; Ramirez vd., 2013). Kapsamlı olarak çok sayıdaki metabolitin analizi ile hastalıkların metabolomik profilleri çıkarılabilmektedir.

1.3.1 Metabolomik Yaklaşımlar

Metabolomikteki yaklaşımlar, araştırma sorularına ve çalışmanın amaçlarına bağlı olarak: metabolik parmak izi çıkarılması (hedefsiz), metabolik profil çıkarılması (hedefli) ve metabolik ayak izi (ekzo-metabolomik) olmak üzere çeşitlenir (şekil 1.1). Metabolik parmak izi çıkarılması (hedefsiz) analizinde amaç bir numunedeki bilinmeyenler de dahil, mümkün olduğunca çok sayıda metaboliti tespit etmek ve analiz etmektir. Metabolik profilleme (hedefli) ise benzer biyokimyasal yolağa ya da bir bileşik sınıfına bağlı önceden belirlenmiş metabolitlerin tanımlanması ve analiz edilmesine odaklanır. nc kavramsal yaklaşım, metabolik ayak izidir (dış ve/veya salgılanan metabolitler için ayak izi). Burada, hücre içi metabolitlerden ziyade sekrete edilen metabolitler ile ilgilenilmektedir (Patel vd., 2015).



Şekil 1.1 Metabolik parmak izi çıkarılması (hedefsiz), metabolik profil çıkarılması (hedefli) ve metabolik ayak izi (ekzo-metabolomik)

1.3.2 Metabolomikte Analitik Teknikler

1.3.2.1 Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

NMR spektroskopisi, çekirdek manyetik rezonansının temel prensiplerine dayanan atom çekirdeğinin manyetik özelliklerini kullanarak moleküler yapıları ve kimyasal bileşimleri analiz etmek için kullanılan analitik tekniktir. Moleküllerin yapısal bilgilerini ve kimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan proton NMR spektroskopisi (^1H NMR), karbon-13 NMR spektroskopisi (^{13}C NMR), fosfor-31 NMR spektroskopisi (^{31}P NMR) ve azot-15 NMR spektroskopisi (^{15}N NMR) gibi farklı çekirdeklerin manyetik rezonansın incelendiği bir dizi NMR spektroskopisi teknikleri bulunmaktadır (Bertini vd., 2014). NMR, yüksek güvenilirlikle karmaşık karışımlardaki metabolitleri saptayabilir, ancak en büyük dezavantajı kütle spektroskopisine göre daha az metabolit tanımlaması ve düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır (Weckwerth, 2007; Emwas, 2015; Mohd Kamal vd., 2022).

1.3.2.2 Kütle spektrometrisi (MS)

Kütle Spektrometrisi (MS), bir bileşiğin moleköl ağırlığı, yapısal özellikleri ve kimyasal bileşiminin belirlenmesi için kullanılan bir analitik tekniktir. MS, bir bileşiği iyonize ederek, iyonları kütleli olarak ayırır ve bu iyonların yoğunluklarını tespit eder. Bu ayrışma, iyonların kütle/yük (m/z) oranına dayanır. MS dedektörü, iyonların yoğunluğunu ve kütlelerini ölçer. MS tabanlı tekniklerde yaygın olarak kullanılan, gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC) ve kapiler elektroforez (CE) olmak üzere üç kromatografi tekniğı mevcuttur. Metabolomik analizler için en önemli ve en çok kullanılan teknikler metabolitlerin seperasyonunu sağlayan teknikler (GC, LC, CE) ile metabolitlerin saptanmasını sağlayan MS tekniklerin kombinasyonu ile oluşan tekniklerdir. Bu kromatografi teknikleri, analiz edilecek bileşiklerin ayrılmasını ve daha sonra kütle spektrometresine yönlendirilmesini sağlar (Lei vd., 2011).

Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS), uçucu veya buharlaşabilir bileşiklerin analizlerinde kullanılan yaygın bir analitik yöntemidir. Analitler bir gaz fazında taşınır ve bir kolon içinden geçerek farklı hızlarda ayrışır. Gaz kromatografisi ile bileşikler ayrıştırılır ve ardından kütle spektrometresine yönlendirilir (Sánchez-Guijo vd., 2013).

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS), çözünür veya sıvı fazdaki bileşiklerin analizinde kullanılan bir analitik tekniğıdir. Analitler bir sıvı fazı içinde taşınarak kolon içinden geçerken ayrışır. Sıvı kromatografisi ile bileşikler ayrıştırılır ve ardından kütle spektrometresine yönlendirilir (Pitt, 2009).

Kapiler Elektroforez-Kütle Spektrometrisi (CE-MS), yüklü bileşiklerin analizinde kullanılan bir analitik tekniğıdir. Analitler bir kapiler içinde elektrik alan etkisiyle taşınır ve ayrışır. Ayrışma, analitlerin yükleri ve elektroforetik hareketlilikleri tarafından belirlenir. CE ile ayrılan bileşikler daha sonra bir kapiler elektroforez cihazından geçerek kütle spektrometresine yönlendirilir (Ramautar vd., 2019).

1.3.2.3 Uçuş süresi kütle spektrometrisi (TOF/MS)

TOF/MS, bir kütle spektrometresi tekniğidir. TOF, Time-of-Flight (Uçuş Süresi) anlamına gelir ve kütle spektrometresinde iyonların uçuş sürelerini kullanarak kütle analizi yapar. Kütleleri daha büyük olan iyonlar, daha yavaş uçar ve daha uzun uçuş süresine sahip olurlar. Kütleleri daha küçük olan iyonlar ise daha hızlı uçar ve daha kısa uçuş süresine sahip olurlar. Dedektörden elde edilen uçuş süresi verileri MS tarafından analiz edilir ve bir kütle spektrumu oluşturulur. Kütle spektrumu, iyonların kütlelerini ve yoğunluklarını gösterir (Feith vd., 2019; Schwaiger-Haber vd., 2021).

1.3.3 Bakteriyal Metabolomik

Bakterilerin hücre metabolizmasının sürdürülebilmesinde çok sayıda metabolit ve enzim; enerji sentezi, büyüme, çoğalma gibi birincil derece anabolik ve katabolik yollarda ve savunma mekanizmaları, çevresel streslere adapte olma ile ilişkili ikincil metabolik yollar gibi birçok önemli işlevin yerine getirilmesinde rol oynar (Mohd Kamal vd., 2022).

Metabolitlerin fizikokimyasal özelliklerindeki farklılıkların yanı sıra, bakterilerin hücre membranı gibi yapısal özelliklerindeki farklılıklar numune hazırlama yöntemlerinin özelleştirilmesini gerektirebilir. Bu yüzden belirli bir numune hazırlama protokolü mevcut değildir. Örneğin gram-negatif bakterilere kıyasla daha rijit ve kalın peptidoglikan tabakası bulunduran gram-pozitif bakteriler hücre içi metabolit ekstraksiyonu için daha fazla kuvvete ihtiyaç duyarlar (Mielko, 2021; Gomes, 2020).

Hücre metabolizmasındaki farklı metabolik yolların ve reaksiyonların aktivitelerine bağlı olarak metabolitler arasındaki devir (dönüşüm) oranları, devir hızının hızlı veya yavaş olduğunun belirlenmesinde kullanılır (Pinu vd., 2017). Genel olarak birincil metabolizmaya dahil olan ATP, NADPH, piruvat gibi sürekli sentezlenip tüketilen metabolitler hızlı devir oranına sahip olup, genellikle düşük konsantrasyonda bulunurlarken; öte yandan genellikle belirli çevresel koşullara yanıt olarak üretilen ikincil metabolizmaya dahil metabolitler sınırlı sayıda reaksiyonun öncüsü olduğundan, daha yavaş devir oranına sahiptir (Pinu vd., 2017). Dolayısıyla bu tarz metabolitlerin hücre içi seviyeleri daha yüksektir. Bu sebeple, metabolom

analizlerinde, numune hazırlama aşamasında hücre içi metabolitlerin farklı devir hızları dikkate alınarak hızlı dondurma, hızlı soğutma gibi metabolik tutuklama (quenching) yöntemleri kullanılarak metabolik aktivite hızla durdurulmalıdır (Pinu vd., 2017; Mohd Kamal vd., 2022).

Genel olarak mikrobiyal hücrelerin tüm metabolom analizi için takip edilen adımlar şu şekildedir (Weckwerth, 2007; Mohd Kamal vd., 2022):

1. Mikroorganizmanın uygun bir kültür ortamında büyütülmesi

Hücrelerin gelişmesi ve metabolik aktivite göstermesi için uygun besiyeri ortamında kültüre etmek gerekmektedir.

2. Mikrobiyal hücrelerin kültür ortamından ekstraksiyonu ve metabolik tutuklama (quenching)

Hücreler, santrifüjleme, filtreleme gibi yöntemlerle süspansiyon ortamından ayrılarak, hücre içi metabolit profili kontamine olmadan analiz edilmesi sağlanır. Ekstraksiyon işlemi doğru metabolik profil elde edilmesinde oldukça önemlidir.

3. Hücre içi metabolit ekstraksiyonu

Hücre içi metabolitlerin metanol, asetonitril veya kloroform gibi organik çözücüler kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilir.

4. Uygun analitik yaklaşım ile metabolitlerin analizi

Elde edilen metabolitler, kütle spektrometrisi (MS) veya nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi teknikler kullanılarak; metabolit tanımlanma, nitelendirilme gibi işlemlere tabi tutulurlar (Segers vd., 2019; Weckwerth, 2007).

5. Metabolomik veri analizi

Elde edilen analiz verileri, biyoistatistiksel ve biyoinformatik yöntemlerle değerlendirilir. Metabolomik analizler karmaşık bir süreç olabilir bu sebeple veri setine ve araştırma hedeflerine bağlı olarak farklı yöntemler ve stratejiler kullanılabilir. Metabolik verilerin analizi için kullanılan tek bir metabolitin gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için univariate analizler ile gruplar arasında istatistiksel anlamlılık çeşitli istatistiksel testlerle (t-test, anova, tukey hd) değerlendirilir. Volkan grafikleri, metabolitlerin ifadesindeki farklılıkların istatistiksel anlamlılığını ve büyüklüğünü görselleştirmek için kullanılır. Volkan grafikleri ile metabolit ifadesindeki $\log_2$ kat değişimi (fold change) ve p-değerini kullanılarak yüksek kat değişimi ve düşük p-değerine sahip metabolitlerde anlamlı bir değişiklik olduğunu gösterilir. Birçok metabolit arasındaki ilişkileri değerlendirmek ve gruplar arasındaki ayrımı belirlemek için Temel Bileşen Analizi (ing., PCA (Principal Component Analysis)), Parsiyel En Küçük Kare Ayırıcı Analizi (ing., PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)), Gizli Yapılara Ortogonal İzdüşümler-Ayrırma Analizi (ing., OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis)) gibi verilerin boyutunu azaltan çoklu değişken analiz yöntemleri kullanılır. Isı haritaları (ing., heatmap) metabolit ifadesini renk skalasına göre kodlayarak farklı koşullar arasındaki değişimini göstermek için kullanılır. Metabolik verilerin biyolojik yorumlamasını yapmak için verilerin biyolojik veritabanları ve yolak analizleri ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Metabolomik araştırmalar için veri tipine ve analiz ihtiyaçlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilen ve yaygın olarak kullanılan veritabanları ve yazılımlar mevcuttur. KEGG, genetik, genomik, biyokimyasal ve sistem biyolojisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir veri tabanıdır. KEGG Bileşiği, biyokimyasal bileşiklerin (organik moleküller, ilaçlar, metabolitler, enzim substratları ve ürünleri vb.) ve reaksiyonların kapsamlı bir koleksiyonunu içerir. Bileşiklerin biyolojik işlevlerini, metabolik yollar içindeki rollerini ve ilaç etkileşimlerini tanımlayan bağlantılar sunar (Kanehisa & Subramaniam, 2002). MetaboAnalyst, metabolomik verilerin analizini, görselleştirmesini, veri madenciliğini ve biyolojik yorumlamayı kolaylaştıran bir dizi araç ve modül sağlayan bir analiz yazılımıdır (Xia ve Wishart, 2011). Bu adımda metabolitlerin tanımlanması,

metabolit profillerinin karşılaştırılması, istatistiksel analizler ve yolak analizleri gibi işlemler gerçekleştirilir (Mielko vd., 2021).

Bu tez çalışmasında metabolik yöntemler kullanılarak, antibiyotik direnci ile ilişkili metabolik değişiklikleri incelemek ve bu direncin mekanizmalarını anlamak üzerine odaklanılmıştır.

Yapılan çalışmada, *P. mirabilis* suşuna, disk difüzyon yöntemi kullanılarak alt-inhibitör konsantrasyon yardımıyla adım adım ampisilin antibiyotiğine karşı direnç kazandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dirençli suşlar ve duyarlı kontrol suşlarının ampisilin, seftazidim, ertapenem ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı gösterdiği tepkiye bağlı olarak ortaya çıkan metabolik profillerdeki farklılıklar ve metabolik yollarındaki değişiklikler tespit edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışma ile direnç kazandırma sürecinde antibiyotiklere yanıt olarak metabolik yolların nasıl değiştiği ve direnç mekanizmalarının nasıl geliştiğinin anlaşılması hedeflenmiştir. Metabolitlerin ayrıştırılması ve tanımlanması için Gaz-Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) kullanılmıştır.

GC-MS'den elde edilen veriler çeşitli biyoinformatik analizler ve veri-tabanları kullanılarak gruplar arasındaki diferansiyel olarak ifade edilen metabolitlerin belirlenmesinde ve etkilenen metabolik yolların tespit edilmesinde kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

Proteus mirabilis, *Enterobacteriaceae* ailesine ait fırsatçı bir patojendir. Ayrıca agar plakaları üzerinde sürünme (swarming) olarak bilinen yüksek hareket yeteneğiyle karakterizedirler (Armbruster ve Mobley, 2012). Başta idrar yolu enfeksiyonu olmak üzere (Armbruster ve Mobley, 2012; Chen vd., 2012) kan dolaşımı enfeksiyonu (Chen vd., 2012; Tumbarello vd., 2012), basit sistit (alt idrar yolu enfeksiyonu), piyelonefrit (böbrek enfeksiyonu), prostatit (prostat bezi enfeksiyonu) (Luis Capelo vd., 2016), epiyema (göğüs boşluğunda enfeksiyon) (Isenstein ve Honig, 1990), diyare hastalığı (Muller, 1986) gibi birçok hastane (nozokomiyal) enfeksiyonu ile ilişkilidir (Chen vd., 2012).

P. mirabilis 'in idrar yolu enfeksiyonlarındaki patojenite mekanizmaları arasında üreaz enziminin üretimi yer alır. Üreaz enziminin idrardaki üreyi parçalaması sonucu amonyak ve karbondioksit açığa çıkar. Oluşan amonyak, idrarın pH seviyesini yükseltir ve idrarda oluşan alkali ortam, idrarın zararlı mikroorganizmaların üremesini önleyen etkisini azaltır. Ayrıca *P. mirabilis*, yüzeyinde bulunan fimbriyalar sayesinde hücrelere yapışarak idrar yolunda biyofilm oluşumuna sebep olabilir. Biyofilm, bakterilerin bir araya gelerek bir polisakkarit matrisinde birleştiği ve daha dirençli bir hale geldiği yapıdır. Özetlemek gerekirse, *P. mirabilis*, hareket yeteneği, üreaz enziminin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi patojenite mekanizmaları ile ilişkilidir (Mobley ve Belas, 1995).

P. mirabilis, birçok antibiyotiğe direnç geliştirebileceği gibi, β -laktamaz enzimleri üretebilme yeteneği sayesinde özellikle ampisillin gibi β -laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilir. *P. mirabilis*'in β -laktamaz enzimleri üretebilme yeteneği, β -laktam halkasına sahip antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına sebep olacağından tedaviyi zorlaştırabilir. Bu nedenle, *P. mirabilis* enfeksiyonlarının tedavisinde β -laktam antibiyotiklere direnç durumu dikkate alınmalıdır (Chanal vd., 2000; Shaaban vd., 2022; Pagani vd., 2002).

Girlich vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, *Proteus spp.*'nin çoklu ilaç direnci fenotipiyle ilişkili tüm genetik mekanizmaları belirlemeyi amaçlamışlardır.

Araştırmacılar, aminoglikozidlere, kinolonlara ve β -laktamlara karşı direnç sağlayan antibiyotik direnç genlerini taşıyan çeşitli plazmitleri listelemişlerdir. Antibiyotik direnci belirleyicileri olarak, *P. mirabilis* için, kendi kendine çoğalabilen ve virülans genleriyle birlikte antibiyotik direncini diğer suşlara ve türlere transfer edebilen SXT/R391 ailesindeki bütünleştirici ve konjugatif elementleri (ICEPm) ve diğer ICE'leri taşıdığı belirlenmiştir.

Gram negatif bakterilerde plazmid veya kromozomal olarak kodlanan β -laktamaz enzimlerinin üretimi en yaygın direnç mekanizmasıdır (Bush et al., 1995). Karim (2012) tarafından yapılan çalışmada, idrar yolu enfeksiyonu hastalarından izole edilen *P. mirabilis* izolatları incelenerek izolatların ampisilin, sefalotin, amoksisiline karşı tamamen (%100), tetrasiklin (%81) ve gentamisine (%75) karşı yüksek dirençli ve sefotaksim ve seftriakson antibiyotiklerine karşı da direnç gösterdiği gözlenmiştir. Çoklu ilaç dirençli (ing., MDR) fenotipe sahip 5 izolattan üçünün β -laktamaz enzimleri ürettiği ve 3000 baz çiftinden büyük bir plazmid taşıdığı tespit edilmiştir, dolayısıyla MDR fenomenine plazmid veya kromozomal olarak kodlanan β -laktamaz enzimlerinin olası bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Plazmid veya kromozomal DNA üzerindeki antibiyotik belirteçlerinin yerini tespit etmek amacıyla plazmid taşıyan üç izolat için kütleme deneyi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda izolatların plazmidini kaybettikleri ve bununla birlikte ampisilin, amoksisilin, sefalotin, sefotaksim ve seftriakson gibi β -laktam antibiyotiklerin yanı sıra tetrasiklin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı dirençlerini de kaybettiklerini gözlemlemişlerdir.

Luzarro vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 2004-2006 yılları arasında toplamda 2070 adet klinik *P. mirabilis* izolatu incelenmiş ve bunların ampisilin, piperasilin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim ve seftriakson gibi β -laktam antibiyotiklerinin çoğuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Ehsan vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada *P. mirabilis* kaynaklı enfeksiyonlara yönelik potansiyel antibiyotik hedeflerinin araştırılması amacıyla *P. mirabilis* proteomunun belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Metabolik yolak analizleri sonucu, 28 proteinin patojene ait yollarla eşleştiği tespit edilerek bunlardan dördü hedeflenebilir olarak nitelendirilmiştir. Daha fazla filtreleme sonucu, nitrojen düzenleme tepki

düzenleyicisi (glnG) proteininin gelecekteki ilaç keşfi için en uygun hedef olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Kart vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, *P. mirabilis* ve *Candida albicans* patojenlerinin ikili mikrobiyal ortam üzerindeki etkisi ve türler arası etkileşim araştırılmıştır. Tek tür ve iki türün birlikteliğinden oluşturulmuş biyofilmlerin metabolomik analizleri gerçekleştirilmiştir. *C. albicans*'ın büyümesi *P. mirabilis* tarafından inhibe edilirken, *P. mirabilis*'in büyümesi ve sürünme aktivitesi *C. albicans* tarafından artırılmıştır. İki türün birlikteliğinin kandidal virülans genlerinin ekspresyon seviyeleri ile *P. mirabilis*'in üreaz ve sürünme aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Candida* hücre büyümesinin inhibisyonunun biyofilm spesifik olduğu bulunmuştur. Üreaz aktivitesinde değişiklik tespit edilmemiştir. EFG1, HWP1 ve SAP2 genlerinin ifadeleri *P. mirabilis* tarafından önemli ölçüde aşağı regüle edilirken, LIP1 yukarı regüle edilmiştir. *P. mirabilis* varlığında, *C. albicans*'ta karbonhidrat, amino asitler, poliamin ve lipid metabolizmaları değişmiştir. İlginç bir şekilde, putresin seviyesi çift türlü biyofilimde tek türlü *C. albicans* biyofilmine kıyasla 230 kata kadar artmıştır.

Tian vd. (2024) çalışmasında, protokatekik asidin *P. mirabilis* suşu ve biyofilmi üzerindeki inhibitör etkileri, hareketlilik ve yapışma, bakteriyel metabolik aktivite ve hücre dışı polimer üretimi üzerindeki etkisini transkriptomik ve metabolomik yöntemlerle araştırmışlardır. Bu çalışma sonunda protokatekik asidin biyofilm oluşumunun %61,2'sini engellediğini göstermiş ve metabolomik veriler, protokatekik asidin esas olarak pantotenik asit ve koenzim A biyosentezi, nükleotid metabolizması, alanin, aspartat ve glutamat metabolik yolları üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Transkriptom verileri PstS, rbsA, RcsB, LpxA, EptB, MurF ve MrdA gibi genlerin ifadesinin azaldığını ortaya koymuştur.

Greenwood ve O'Grady (1969) tarafından yapılan çalışmada organizma konsantrasyonu ile ampisilinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) arasındaki kantitatif ilişkiyi inceleyerek *P. mirabilis* ve *E. coli*'nin davranışlarının önemli ölçüde farklılık gösterdiği ve *P. mirabilis* suşları arasında sistematik farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Geleneksel duyarlılık testi yöntemleri kullanıldığında *in vitro* olarak

ampisiline karşı benzer duyarlılığa sahip görülen *E. coli* ve *P. mirabilis* suşları, yoğun kültürler ampisiline maruz bırakıldığında ve opaklık okumaları yapıldığında farklı davranmıştır.

Zheng vd. (2024), idrar yolu enfeksiyonuna (İYE) sahip hastaların idrar mikrobiyotasındaki değişikliklerin incelenmesi ve bakteriyel metabolik aktiviteye dayalı teşhisi ve metabolik tanı yaklaşımına odaklanmışlardır. Birçok çalışmaya göre, *E. coli* ile ilişkili İYE'ler için idrar asetik asidi, kötü kokulu amin ve trimetilaminin biyobelirteç olarak belirlenmiştir (Zhang vd., 2012; Puebla-Barragan vd., 2020). Bazı bakteriler spesifik metabolitler üretir. Örneğin, İYE'ye neden olan diğer bakteriler idrardaki metiyonini metabolize etmezken, *P. mirabilis* metiyonini 4-metiltiyo-2-oksobütirik aside (MOBA) metabolize ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle metabolitlerin incelenmesinin İYE tanısı ve tedavisi açısından önemli olduğu söylenebilir.

Lin vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak iki duyarlı ve iki çoklu ilaca dirençli klinik *Escherichia coli* suşu elde edilmiştir. GC-MS tabanlı metabolomik yöntem kullanılarak iki ilaca duyarlı suş (CK1 ve CK2) ile çoklu ilaca dirençli suşlar (MDR1 ve MDR1) arasındaki metabolitlerin farklı ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Toplamda 273 metabolit karakterize edilerek, MDR suşları ile antibiyotige duyarlı suşlar arasında anlamlı değişen 77 metabolit farklılık belirlenmiştir. Biyoinformatik analiz sonuçları, MDR suşlarında antibiyotige duyarlı suşlara göre amino asit biyosentezi, fenilpropanoid biyosentezi ve pürin metabolizması ile ilgili metabolitlerin daha fazla bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, MDR1 suşunda çeşitli ortamlardaki mikrobiyal metabolizma, karbon metabolizması ve pirimidin metabolizması yollarının daha zenginleştiği, MDR2 suşunda ise ABC taşıyıcıları ve sistein/metionin metabolizma yollarının daha zenginleştiği görülmüştür (Lin vd., 2019).

Schelli vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada farklı sınıflara ait (β -laktamlar, aminoglikozidler ve kinolonlar) ampisilin, kanamisin ve norfloksasin antibiyotikleri ile öldürücü dozun altında (sub-lethaldose) tedavi edilen bir çift izojenik metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA) RN450 ve 450M suşlarının

metabolomunu karakterize etmek için kütle spektrometresi bazlı hedefli metabolik profil oluşturma tekniği kullanılmıştır. Çalışma sonucunda MSSA ve MRSA metabolizmasında aynı antibiyotiklere farklı metabolik yanıt tespit edilmesi MSSA ve MRSA metabolizması arasında farklı stres yanıt mekanizmasına işaret etmiştir. Ampisilin tedavisi uygulanan grupta kontrol grubuna karşı metabolik profillerinde keskin bir farklılaşma gözlenmiştir. Kanamisin ve norfloksasin için MSSA ve MRSA'da antibiyotik kaynaklı metabolik değişikliklerin farklı olduğu ve norfloksasin ile tedavi edilen grubun metabolik profilinin MRSA'da kontrol grubuyla kısmen örtüştüğü ancak MSSA'da kontrol grubundan açıkça ayrıldığı tespit edilmiştir. MSSA RN450 deneylerinde ampisilin ve kanamisin tedavisinde pürin metabolizmasından, pirimidin metabolizmasından, askorbat ve aldarat metabolizmasından elde edilen metabolitlerin önemli ölçüde bozulduğu ve bununla birlikte, norfloksasin tedavisinde sadece orta ila düşük düzeyde anlamlılık gözlenmiştir. MRSA 450M deneylerinde ise, kanamisin ve norfloksasin ile tedavi edilen grupta, pirimidin ve glisin, serin ve treonin metabolizmalarından kaynaklanan metabolitler tedavi edilmeyen gruba göre anlamlı farklılık sergilediği gözlenmiştir. Ampisilin tedavisinde ise, askorbat ve aldarat metabolizması ve D-alanin metabolitleri anlamlı farklılık göstermiştir. Araştırma sonucunda bakterisidal antibiyotiklerin *S. aureus*'ta antibiyotik duyarlılığına bağlı bir şekilde metabolik değişikliklere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Schelli vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

Tez çalışmasının deneysel kısmında kullanılmış olan materyaller, kimyasallar ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1 Petri Kapları

Petri kapları, laboratuvar ortamında mikroorganizmaların kültüre edilmesi, korunması ve mikrobiyolojik deneylerin yapılması için kullanılan genellikle 90-100 mm çapında ve 20 mm yüksekliğinde cam veya polistirenden oluşan düz tabanlı şeffaf kaplardır. Bu çalışmadan plastik steril petri kapları (Fıratmed, Türkiye) mikroorganizma kültürü geliştirmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2 Cam Şişeler

Cam şişeler genellikle laboratuvar ortamlarında, mikrobiyolojik çalışmalarda yüksek sıcaklık ve basınca maruz kaldıklarında dahi bütünlüklerini koruyabilen ekipmanlardır. Bu cam şişeler, otoklavda sterilizasyon sırasında bile dayanıklılıklarını koruyabilirler. Bu tez çalışması sırasında otoklavda steril edilebilen 200 mL, 500 mL ve 700 mL'lik kapaklı boroksilat cam şişeler (Labware, ABD) besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3 Otomatik Mikropipetler ve Mikropipet Uçları

Otomatik mikropipetler, laboratuvarlarda hassas ve tekrarlanabilir sıvı transferi için yaygın olarak kullanılan cihazlardır. Bu çalışmada 10 µL-100 µL (Microlit, Hindistan) ve 100 µL-1000 µL (Microlit, Hindistan) arasında hacimlere ayarlanabilen mikropipetler sıvı besiyeri, sıvı kimyasal gibi sıvıların aktarımında uygun hacimlerde steril mikropipet uçları kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1.4 Steril Özeler ve Steril Eküvyon Çubukları

Mikrobiyolojik örneklerin transferi veya inokülasyonu gibi işlemlerde kullanılan steril öze ve eküvyon çubukları mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan steril araçlardır. Bu tez çalışmasında mikroorganizma transferinde, ekiminde, kültür hazırlama ve pasajlamada tek kullanımlık steril özeler (Microloop, Birleşik Krallık) ve steril eküvyon çubukları (swap) (LB Italiana) kullanılmıştır.

3.1.5 Pens

Mikrobiyoloji laboratuvarında pensler genellikle metalden yapılmış, sterilize edilebilen ve tekrar kullanılabilen araçlardır. Sterilize edilmiş pensler antibiyotik disklerin aktarımında kullanılmıştır.

3.1.6 Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth (NB), mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olan temel besin maddelerini içeren standart olarak mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş bir mikroorganizma yelpazesinin inkübasyonu için kullanılan bir sıvı besiyeridir. NB'un formülasyonu genellikle pepton, sığır ekstraktı, sodyum klorür gibi bileşenlerin bir kombinasyonundan oluşur. Bu tez çalışmasında kullanılan NB (Merck, Almanya) besiyeri, *P. mirabilis* suşunun kültüre edilmesinde kullanılmıştır.

3.1.7 Agar

Agar (Condalab, İspanya), jelatinizasyon özelliği nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve besin endüstrisinde yaygın olarak tercih edilen bir katılaştırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılır. Bu çalışmada, agar broth besiyerlerine eklenerek *P. mirabilis* kültürünün geliştirilmesi ve izolasyonu için sterilizasyon ve soğutma sürecinden sonra besiyerlerinin katılaştırılmasında kullanılmıştır.

3.1.8 Antibiyotik Diskleri

Bu çalışmada ampisilin (AMP) (OXOID, Birleşik Krallık) antibiyotik kasetleri disk difüzyon yöntemi ile direnç kazandırma işleminde, Seftazidim (CAZ) (OXOID, Birleşik Krallık), Siprofloksasin (CIP) (OXOID, Birleşik Krallık), Ertapenem (ETP) (OXOID, Birleşik Krallık) antibiyotikleri de antibiyogram işlemlerinde kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotik diskler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Kullanılan Antibiyotik Diskler

3.1.9 Etil Alkol

Etil alkol veya etanol (EtOH) moleküler formülü C_2H_5OH olan ve birçok endüstriyel, tıbbi ve ev kullanımında bulunan renksiz yanıcı bir sıvı organik bileşiktir. Bu tez çalışmasında, etanol (Merck, Almanya) laboratuvar ortamında deneyler sırasında yüzey dezenfeksiyonu için sıklıkla kullanılmıştır.

3.1.10 Metil Alkol

Metil alkol veya metanol (MeOH) moleküler formülü CH_3OH olan renksiz, uçucu ve yanıcı bir organik bileşiktir. Metanolün birçok endüstriyel ve ticari alanda kullanıldığını vardır. Bu çalışmada örneklerdeki bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmak için MeOH:su çözeltisi hazırlanmasında metanol (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.11 Distile Su

Distile su, saf ve arıtılmış su eldesinde distilasyon adı verilen suyun kaynatılması, buharlaşması ve ardından buharın yoğunlaştırılması yoluyla suyu diğer maddelerden ayırma işlemiyle üretilen su türüdür. Bu çalışmada, distile su cihazından (Human Corporation, Kore) elde edilen distile su; besiyeri hazırlama ve tekrar kullanılabilen malzemelerin temizlenmesi gibi işlemlerde kullanılmıştır.

3.1.12 İspirto Ocağı

İspirto ocağı, özellikle mikrobiyolojik laboratuvar çalışmalarında kullanılan özenin doğrudan alev ile sterilizasyonunda ve mikroorganizmaların transferi sırasında hava kaynaklı kontaminasyonun engellenmesi için kullanılan bir araçtır. Bu çalışmada ispirto ocağı aseptik teknik uygulamalarında kullanılmıştır.

3.1.13 Alüminyum Folyo Kâğıdı

Alüminyum folyo kâğıdı, mikrobiyoloji laboratuvarlarında özellikle sterilizasyon, koruma ve örnek saklama gibi işlemlerde kullanılan pratik bir malzemedir. Bu çalışmada, alüminyum folyo kâğıdı sterilize edilecek malzemelerin ambalajlanarak kontaminasyon riskinin azaltılmasında kullanılmıştır.

3.1.14 Parafilm

Parafilm, esnekliği ve yapışkan olmayan yapısıyla özellikle petri kaplarının etrafına sarılarak kültür ortamının dış etkenlerden ve kontaminasyondan korunmasında kullanılan pratik ve ekonomik bir malzemedir. Bu çalışma sırasında hem stok

kültürlerde, hem de çalışma yapılan petrilere parafilm (İsolab, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.15 Deney Tüpleri

Deney tüpleri, silindirik veya konik şekilli cam ve plastik kaplardır. Laboratuvarlarda çeşitli deneylerde kimyasal çözelti hazırlanması, karıştırılması ve çeşitli kimyasal reaksiyonların gerçekleştirilmesi gibi birçok işlemde kullanılır. Bu çalışmada çeşitli uygulamalar sırasında deney tüpleri kullanılmıştır.

3.1.16 Falkon Tüpleri

Falkon tüpleri genelde santrifüjleme işlemi için kullanılan, plastik malzemeden yapılmış özel tasarımı tüplerdir. Bu çalışmada steril falkon tüpleri (Corning, ABD) inokulum hazırlanmasında ve stok kültürlerin saklanmasında kullanılmıştır.

3.1.17 Steril Eppendorf Tüpleri

Eppendorf tüpleri genellikle 0,2 mL, 0,5 mL veya 2 mL hacimlere sahip laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılan laboratuvar malzemeleridir. Bu çalışmada santrifüj işlemleri sırasında eppendorf tüpleri (İsolab, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.18 Buz Kasetleri

Buz kaseti veya buz kalıbı olarak da bilinen genellikle plastik malzemeden yapılmış içerisindeki suyu düşük sıcaklıklarda dondurarak kullanılan malzemelerdir. Bu çalışmada numunelerin soğutulması ve düşük sıcaklıklarda transferini sağlamak için kullanılmıştır.

3.1.19 Metoksiamin Hidroklorür

Metoksiamin hidroklorür, metabolitlerin yapısında bulunan karboksil (COOH) ve aldehit (CHO) gruplarını koruyarak metabolitlerin analitik olarak daha kolay ölçülebilir hale getirmesini sağlayan bir türevlendirme ajanıdır. Bu çalışmada

metoksilamin hidroklorür (Sigma Aldrich, Çin) GC-MS analizi öncesi derivatizasyon (türevlendirme) işlemlerinde kullanılmıştır.

3.1.20 N-Metil-N-(Trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve %1 Trimetil klorosilan (TMCS)

MSTFA ve %1 TMCS kombinasyonu, metabolitlerin türevlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir türevlendirme ajanlarıdır. MSTFA, örnekteki metabolitlerle reaksiyona girerek bileşiklerin bazik gruplarını türevlendirerek metabolitlerin daha uçucu ve GC-MS gibi analitik tekniklerle daha kolay analiz edilebilmesini sağlar. %1 TMCS, MSTFA ile kullanılarak türevlendirme reaksiyonunun verimliliğini artırır. Bu tez çalışmasında, MSTFA ve %1 TMCS kombinasyonu (Sigma-Aldrich, İsviçre) türevlendirme işleminde kullanılmıştır.

3.1.21 Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) biyokimyasal deneylerde kullanılan bir tampon çözeltisidir. Biyolojik sistemlerde optimal pH aralığını ve iyon dengesini koruyarak, enzimlerin ve biyokimyasal reaksiyonların doğru şekilde çalışmasını destekler. Bu tez çalışmasında pH değişimini kısmen sabit tutmak amacıyla PBS (pH = 7.4) tamponu (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.22 Piridin

Piridin, metabolom analizi gibi uygulamalarda bazik metabolitlerin nötralize edilmesi ve metabolitlerin çözünmesinde kullanılır. Piridin kullanımı sürecince keskin kokusu ve zehirli etkisi sebebiyle uygun havalandırma ve güvenli çalışma koşulları sağlanarak kullanımına dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada piridin (Merck, Almanya) metabolom analizinde kullanılmıştır.

3.2 Cihazlar

3.2.1 Otoklav

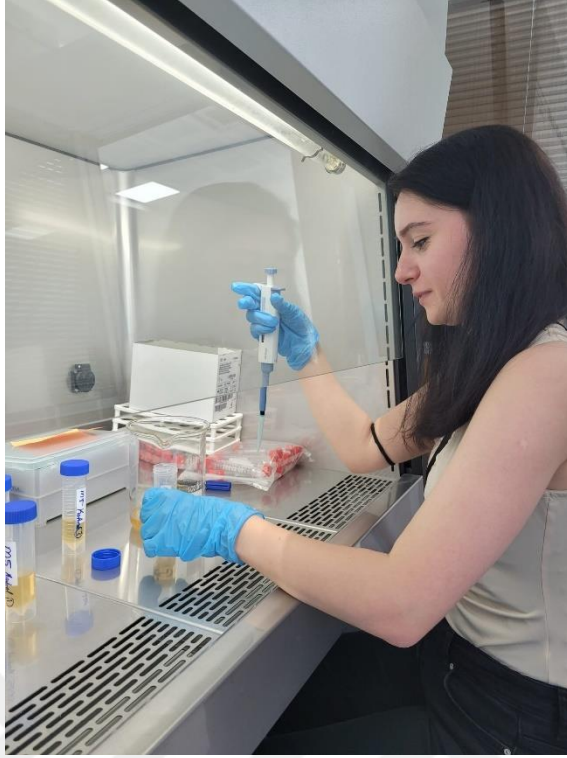
Bu tez çalışmasında kullanılan tüm besiyerleri, çözeltiler, cam şişeler, pipet uçları gibi materyallerin yüksek sıcaklık ve basınçla sterilizasyonu için otoklav cihazı (Daihan, Kore) kullanılmıştır.

3.2.2 Hassas Terazi

Çalışma aşamalarında kullanılan besiyerleri ve kimyasallar gibi malzemelerin doğru tartımı için Precisa (İsviçre) markasına ait hassas terazi kullanılmıştır.

3.2.3 Biyogüvenlik Kabini

Biyogüvenlik kabinleri laboratuvar ortamında çalışan araştırmacının, numunelerin ve çevrenin güvenliğini sağlamak için tasarlanmış cihazlardır. Bu deney çalışmasında Sınıf II bir biyogüvenlik kabini (Heal Force, Çin) kullanılarak çalışılan örneklerin ve çevrenin güvenliği sağlanmıştır. Deneyler sırasında çekilen bir biyogüvenlik kabini görüntüsü Fotoğraf 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Biyogüvenlik kabini

3.2.4 Distile Su Cihazı

Distile su cihazı, suyu damıtma yöntemiyle saf su elde etmek için kullanılan bir laboratuvar ekipmanıdır. Bu çalışmada Human Corporation (Kore) tarafından üretilen distile su cihazı kullanılarak distile su üretilmiştir.

3.2.5 İnkübatör (Etüv)

İnkübatör, mikrobiyolojik kültürlerin veya diğer biyolojik örneklerin ideal sıcaklık ve nem koşullarında yetiştirilmesi için tasarlanmış sıcaklık kontrollü ortamlar sağlayan ekipmandır. Bu çalışmada, *P. mirabilis* kültürlerinin inkübe edilmesi için Selecta (İspanya) marka inkübatör kullanılmıştır.

3.2.6 Buzdolabı ve Derin Dondurucu

Buzdolabı ve derin dondurucular düşük sıcaklıkları koruyarak mikroorganizmaların büyümesini yavaşlatır ve örneklerin uzun süreli saklanması sağlar. Bu tez

çalışmasında, örneklerin saklanması ve muhafaza edilmesi için buzdolabı (Vestel, Türkiye) ve derin dondurucu (Vestel, Türkiye) kullanılmıştır.

3.2.7 Liyofilizatör

Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma olarak bilinen bu işlemde kullanılan liyofilizatör, biyolojik örneklerin uzun süre saklanması veya hassas bileşenlerin stabilizasyonu için kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada kullanılan biyolojik örneklerin dondurulup, ardından vakum altında içinde bulunan suyun uzaklaştırarak kuru hale getirilmesi işleminde Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde bulunan liyofilizatör (HyperCool, Kore) kullanılmıştır.

3.2.8 Santrifüj

Santrifüj cihazı, sıvı örneklerin döndürülerek merkezkaç kuvveti ile ayrıştırılmasını sağlayan bir laboratuvar cihazıdır. Santrifüj cihazında, dönme hızı (devir/dakika), sıcaklık ve süre gibi parametreler ayarlanabilen parametrelerdir. Santrifüj işlemi sırasında örneklerin içinde bulunan bileşenler merkezkaç kuvveti ile ayrılır. Yoğunluğu daha yüksek olan bileşenler tüplerin altına çökerken, daha düşük yoğunluklu bileşenler üst kısımlarda kalır. Bu tez çalışmasında üzerinde çalışma yapılacak bakteri peletlerinin elde edilmesi için santrifüj (Hettich, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.9 GC-MS (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi)

GC-MS, gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisinin bir araya gelmesiyle oluşan bir analitik kimya tekniğidir. Bu cihaz bileşiklerin analiz edilmesi, tanımlanması ve niceliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Bu çalışmada örneklerin analizinde HP5-MS kılcal kolon (30 m x 0,25 mm; kaplama kalınlığı 0,25 µm) ile donatılmış Agilent GC 8890-Agilent GC-MSD 5977B (Agilent Technologies, ABD) cihazı kullanılmıştır.

3.2.10 McFarland Densitometresi

McFarland densitometresi, mikrobiyolojide belirli bir bakteriyel süspansiyonun optik yoğunluğu ölçülerek, McFarland birimlerine karşılık gelen hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılan bir alet veya standart birimdir. Optik yoğunluk, bakteri hücrelerinin ışığı ne kadar absorbe ettiğini ve yansıttığını gösterir. Spektrofotometre veya fotometre gibi optik bir cihaz kullanılarak belirli bir dalga boyunda (genellikle 600 nm ve 625 nm) bakteriyel süspansiyonun optik yoğunluğu ölçülür. McFarland densitometresi, bir dizi standart yoğunluk birimi olan McFarland birimlerini (genellikle 0,5 McFarland veya 1.0 McFarland) kullanır. Bu, bakteriyel kültürlerin belirli hücre yoğunluğuna sahip olmasını ve deneylerde standartlaştırılmış bir başlangıç noktası sağlar. Çalışmada hazırlanan inokulumun standardizasyonunda Biosan Den 1-B (Litvanya) marka densitometre kullanılmıştır.

3.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada, Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonuna bulunan *Proteus mirabilis* suşu kullanılmıştır.

3.4 Yöntem

3.4.1 Besiyeri Hazırlama

Bu tez çalışmasında kullanılan sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında, nutrient broth besiyeri kutusu üzerinde belirtildiği üzere 1 L distile suya 8 gr nutrient broth eklenip, tamamen çözdürmek suretiyle hazırlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Kullanılan katı besiyerleri ise 1 L distile suya 8 gr nutrient broth ve %1,5’luk agar eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril plastik petri kaplarına dökülerek katılaşması için soğumaya bırakılmıştır.



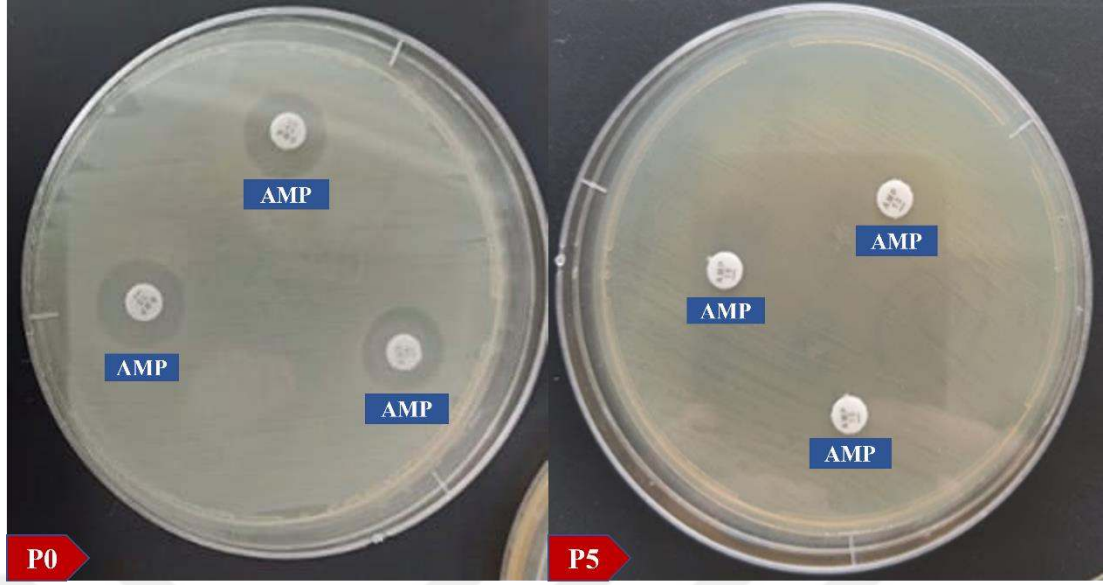
Şekil 3.3 Besiyeri Hazırlama İşlemi

3.4.2 İnokulum Hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan *P. mirabilis* suşu, stok kültürden alınıp nutrient broth besiyerine inoküle edilerek, üstel büyüme fazına kadar kültüre edilmiştir. Taze kültürden alınan *P. mirabilis* örnekleri, nutrient agar besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir. Bu çalışmada inokulumlar hazırlanırken McFarland densitometresi kullanılarak inokulumun bulanıklığı 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır.

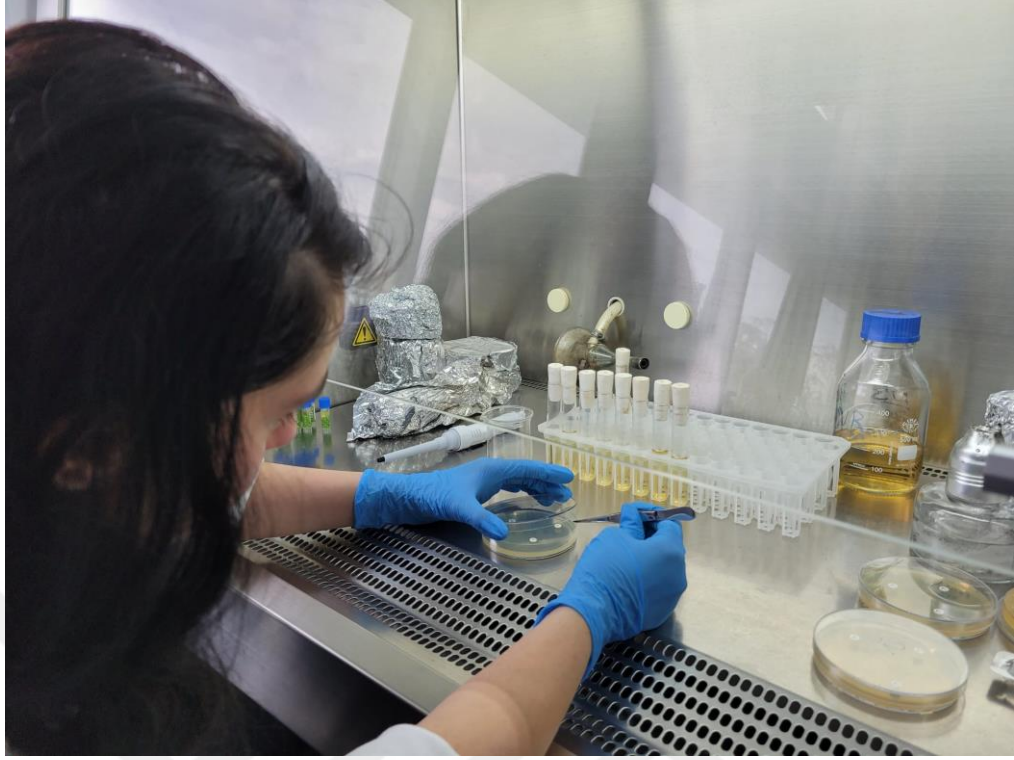
3.4.3 Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Direnç Mekanizmasının Tetiklenmesi

Kirby-Bauer testi, bir bakteri kültürünün katı besiyeri ortamına yayılarak daha sonra besiyeri üzerine farklı antibiyotik diskler yerleştirilmesiyle bakterilerin direnç profillerini belirlemek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, önce antibiyogram test yapılmış ve çalışmada kullanılan *P. mirabilis* suşunun ampisilin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



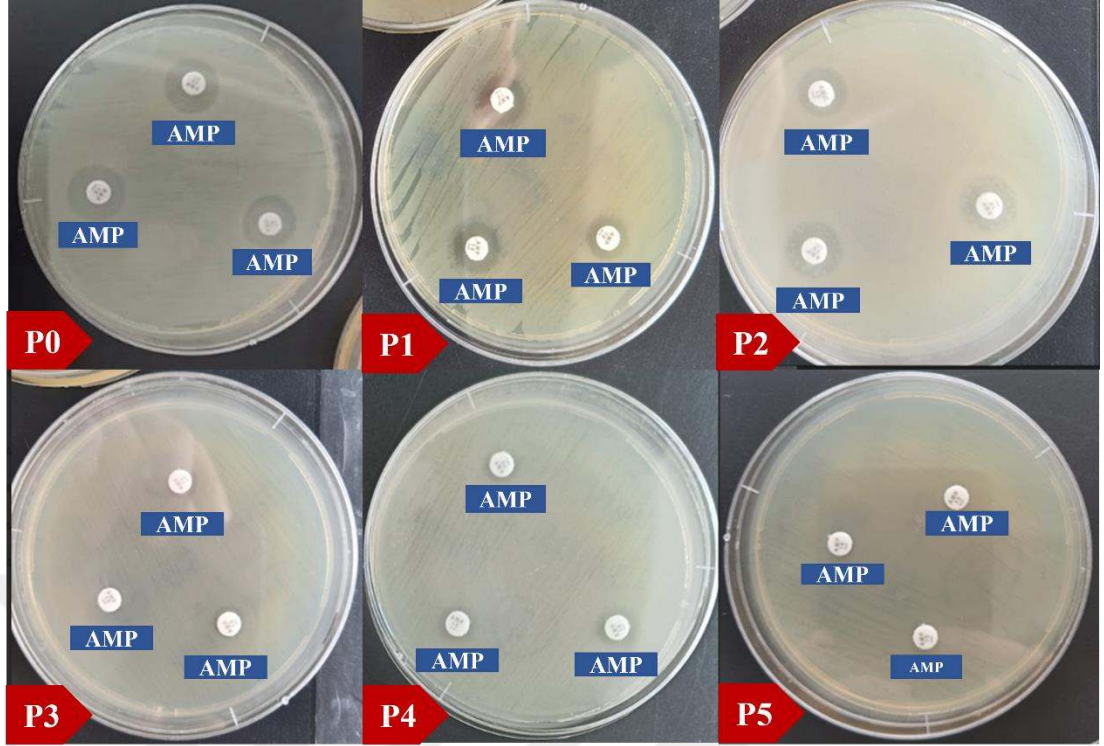
Şekil 3.4 AMP antibiyotiğine karşı başlangıç durumunda *P. mirabilis* (P0) suşu ve 5. Pasajın (P5) antibiyogram testi

Bu sebeple direnç kazandırma işleminde ampisilin antibiyotiği kullanılmıştır. Nutrient agar besiyerine ekilen *P. mirabilis* inokulumu üzerine ampisilin diskleri yerleştirilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra (Şekil 3.5), alt inhibitör konsantrasyon bölgesi olarak kabul edilebilecek, inhibisyon bölgesi sınırından toplanan bakteriler sıvı besiyerine pasajlanarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen yeni suşlar tekrar katı besiyerine pasajlanarak yeniden antibiyotik uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.5 Disk difüzyon yöntemi ile direnç geliştirme işlemi

Her pasaj sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon bölgesinin çap ölçümleri yapılarak tekrar alt inhibitör konsantrasyon bölgesinden kültür alınarak, yeni bir nutrient agar besiyerine pasajlanmıştır. Bu işlemlere *P. mirabilis* suşu ampisilin antibiyotiğine tamamen direnç kazanana kadar devam edilmiştir. Bakterinin 5. pasajlama sonucunda ampisilin antibiyotiğine direnç kazandığı görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Stoktan çekilmiş *P. mirabilis* suşu (P0) ve adım adım direnç geliştirilmiş suşların (P1, P2, P3, P4, P5) AMP'ye karşı antibiyogram testleri

Stok kültürden başlayarak 5. pasaja kadar her seferinde *P. mirabilis* suşları için 3'er tekrarlı olarak CIP, SXT, CAZ, CFM, ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogram testleri yapılmıştır. Antibiyogram testlerindeki değişim Şekil 3.7'de verilmiştir. Yapılan antibiyogram testleri sonucunda *P. mirabilis* suşunun ampisilin'e karşı direnç kazanırken, seftazidim antibiyotiğine karşı da çapraz direnç geliştirdiği gözlenmiş ve bu sebeple çalışmada seftazidim antibiyotiği de kullanılmıştır.



Şekil 3.7 P0 Orijinal suş ve 5. pasaj suşun CIP, SXT, CAZ, CFM, ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogramı

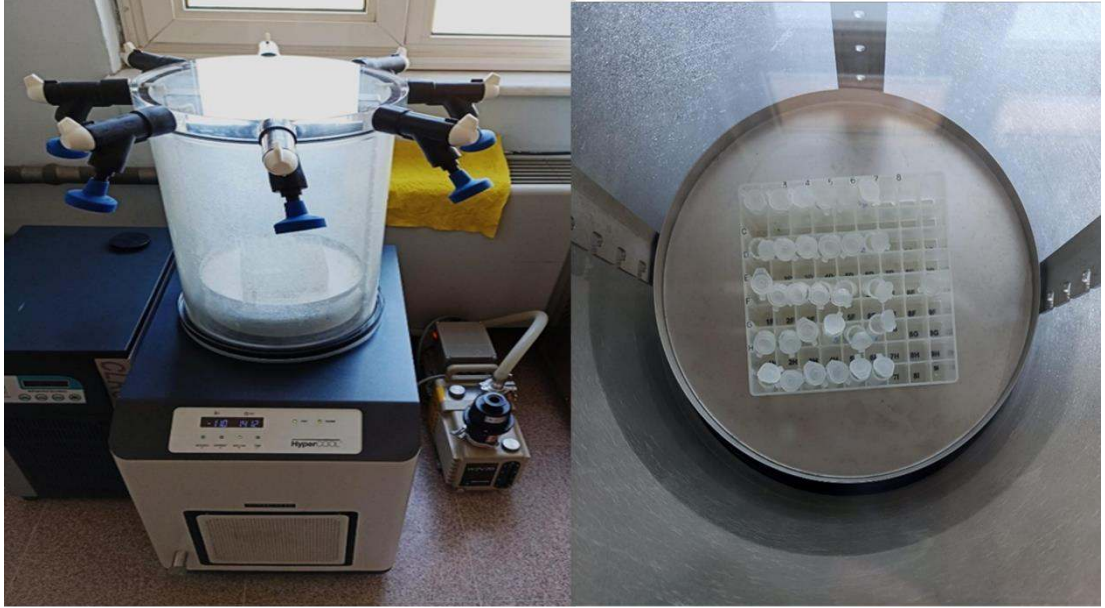
3.4.4 Metabolomik Analiz

OD₆₀₀'de normalize edilen kültürler 3000 x g'de 10-15 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre peletleri PBS'le iki kez yıkanarak süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet alınmıştır. Hücre peletlerine iki-üç kez freeze-thaw döngüsü uygulanmıştır. Freeze-thaw sonrası peletler vorteksleme yöntemiyle PBS içinde tekrar suspanse edilmiştir. Her bir gram pelet için, 1 mL tampon olacak şekilde PBS kullanılmıştır. Eppendorflara alınan 150 µL pelet süspansiyonlarının üzerine 850 µL MeOH:su (9:1 v/v) çözeltisi eklenerek 1 dakika vorteksle karıştırılmıştır. Metabolitlerin proteinlerden ayrılması için örnekler +4 °C'de 15000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Santrifüjleme işlemi

Santrifüj sonrası tüm süpernatantlar alınarak, -80 °C, 0,001 mbar vakumda liyofilizatörde kurutulmuştur (Şekil 3.9).

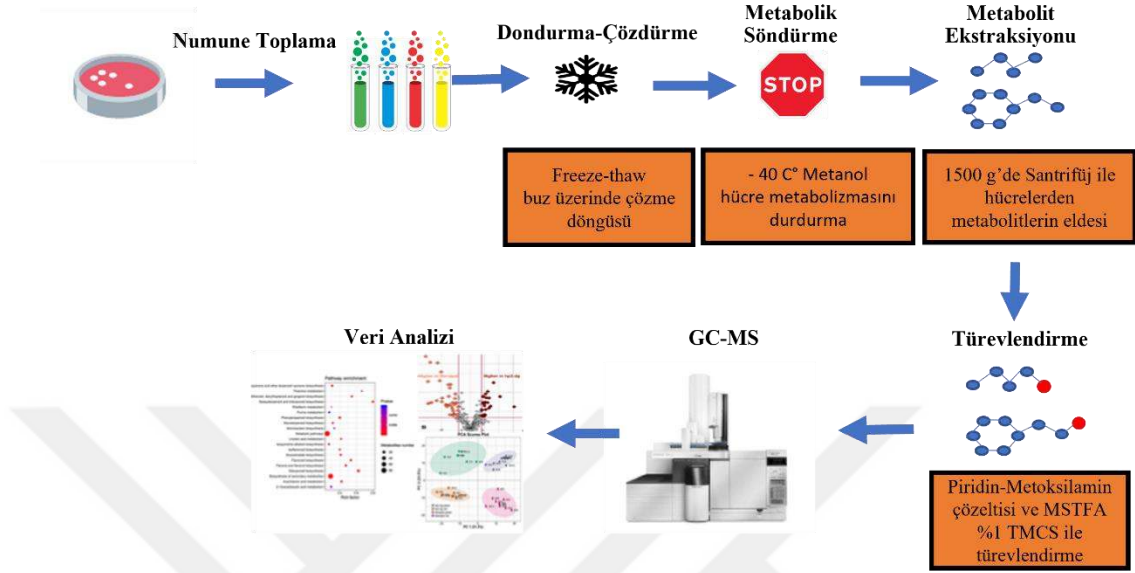


Şekil 3.9 Liyofilizatör ile kurulma işlemi

Liyofilizatörden alınan kurumuş örneklere, 20 µL piridin-metoksilamin hidroklorür (20 mg/mL) çözeltisi eklenerek 30 °C’de 90 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında, türevlendirme işlemi için 80 µL MSTFA-%1 TMCS çözeltisinden eklenmiştir. Örnekler 37 °C’de 30 dakika tekrar inkübe edildikten sonra

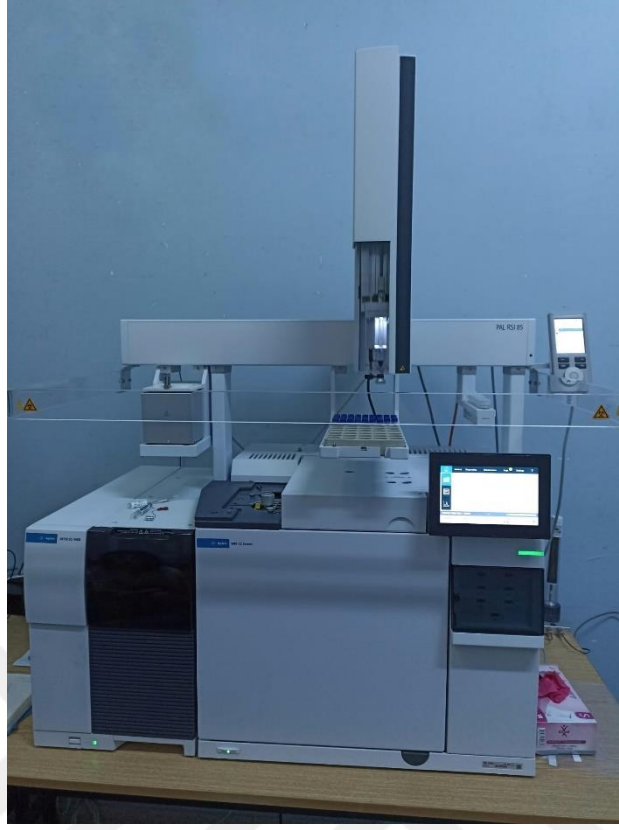
GC-MS viallerine aktarılmıştır. Metabolomik analizde kullanılan iş akış şeması Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.10 Metabolomik iş akışı

3.4.5 Metabolit Analizinde GC-MS Koşulları

Kimyasal bileşenlerin tanımlanması için her numune HP5-MS kılcal kolon (30 m x 0,25 mm; kaplama kalınlığı 0,25 μ m) ile donatılmış Agilent GC 8890-Agilent GC-MSD 5977B (Agilent Technologies, CA, ABD) ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 2 μ L'ye ayarlanmıştır. Metabolit ayrımı için gradyan sistem kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250 °C'de tutulmuştur. Fırın sıcaklığı bir dakika süreyle 70 °C'de sabitlendikten sonra 10 °C/dk'lık gradyanla 325 °C'ye kadar arttırılmış ve 325 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Toplam ayrılma süresi 37,5 dakika sürmüştür. MS detektörü elektron iyonizasyon (EI) modunda gerçekleştirilmiştir. Veri toplama işlemi 50-650 m/z kütle aralığında tam tarama modunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 GC-MS Analiz İşlemi

3.4.6 Veri İşleme

Ham GC-MS verileri, bir ABF dönüştürücü (<http://www.reifycs.com/AbfConverter/index.html>) kullanılarak “*.abf” formatına dönüştürülmüştür. Daha sonra MS-DIAL (Lai vd., 2018) (versiyon 4.9.221218, <http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) ile pik hizalama, ters evrişim analizi, tepe tanımlama, nicelik belirleme ve normalizasyon işlemleri yapılmıştır. Minimum tepe yüksekliği 1000 genlik (amplitude) ve kütle aralığı (mass range) ise 0-1000 da olarak ayarlanmıştır. Tutma süresi toleransı (retention time tolerance) 1 dakika, tanımlama skoru (identification skor) %75 olarak belirlenmiştir. Tanımlama sürecinde 27.977 kayıt içeren MONA, FIEHN ve KOVATS birleştirilmiş ve geniş bir veri tabanı kullanılmıştır. Metabolitler toplam iyon yoğunluğuna göre normalleştirilmiştir. AMP ve CAZ antibiyotiklerinin *P. mirabilis* metabolom yapısı üzerinde direnç kazanma süreçleri boyunca etkisini anlamak amacıyla temel bileşen analizi (TBA ing. PCA) yapılmıştır.

Antibiyotik stresi altında diferansiyel olarak eksprese edilen metabolitleri istatistiksel olarak tespit etmek için R programlama dili (versiyon 4.3.1) kullanılarak two sample t-test uygulanmıştır ($p < 0,05$). Gruplar arasında metabolitlerin kat değişiminin (ing., fold change) iki tabanında logaritması hesaplanarak -0,58'in altında kalan metabolitler aşağı regüle, +0,58'in üstünde kalan değerler yukarı regüle olarak kabul edilmiş ve p değeri 0,05'den küçük çıkan metabolitlere odaklanılmıştır.

Değişen metabolitler (differentially expressed metabolites) yolak analizleri ile değerlendirilmiştir (Metaboanalyst 6.0'daki (<https://www.metaboanalyst.ca>) yolak analiz modülü (<https://www.metaboanalyst.ca/faces/upload/PathUploadView.xhtml>) ve KEGG haritalayıcı sistemi (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>))

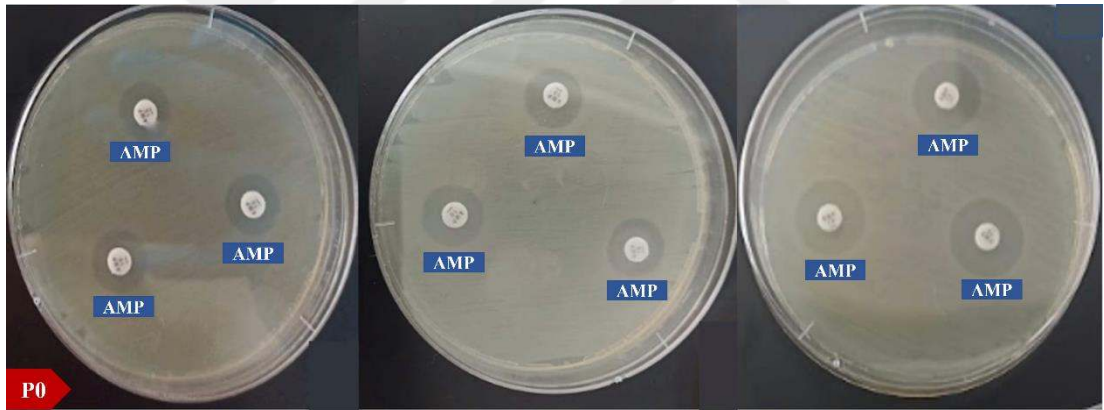
4. BULGULAR

4.1 Kirby-Bauer Disk Difüzyon Duyarlılık Testi Sonuçları

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak adım adım ampisilin antibiyotiğine direnç kazandırma işlemi uygulanmıştır. Her uygulama sonunda antibiyotik diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülmüştür ve çapı en dar olan zondan bakteri toplanarak bir sonraki ekim için kullanılmıştır.

4.1.1 Başlangıç Durumu (P0)

P. mirabilis suşun başlangıç durumundaki ampisilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.1’de, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: Başlangıç durumu (P0)

Şekil 4.1’de 3 adet ampisilin diski bulunan petriye ait, üç adet paralel çalışma verilmiştir.

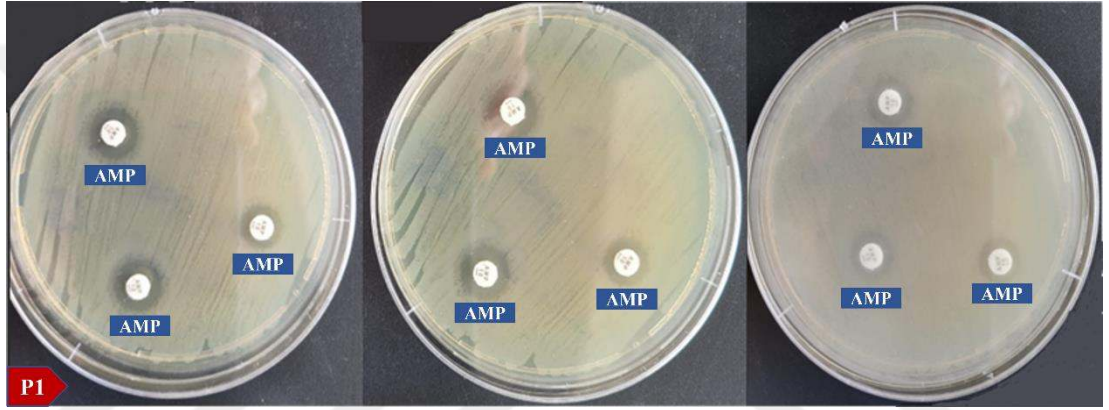
Tablo 4.1 Başlangıç durumunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar		Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	1,3	1,4	1,5		1,40
2.Petri	1,5	1,4	1,5		1,46
3.Petri	1,8	1,8	1,8		1,80
Genel ortalama					1,55

Tablo 4.1’deki sonuçlara göre, ampisilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşuna başlangıç durumunda ortalama 1,55 cm’lik bir inhibisyon zonuna sebep olduğu görülmektedir.

4.1.2 Birinci Pasaj (P1)

Başlangıç durumundaki ampisilin antibiyogramındaki inhibisyon bölgesi zonundan toplanan bakterilerden elde edilen birinci pasajın (P1) ampisilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.2’de, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 1.Pasaj

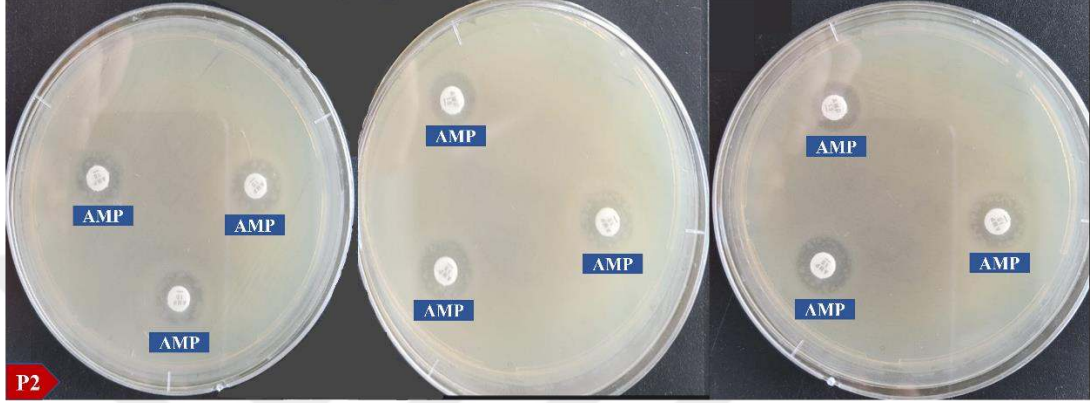
Tablo 4.2 Birinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	1,2	1,0	1,3	1,16
2.Petri	1,0	0,9	0,9	0,93
3.Petri	1,2	1,1	1,2	1,16
Genel ortalama				1,08

Tablo 4.2’deki sonuçlara göre, ampisilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşunun P1 pasajında sebep olduğu ortalama inhibisyon zonunun 1,08 cm’ye düştüğü görülmektedir.

4.1.3 İkinci Pasaj (P2)

P1 durumundaki ampicilin antibiyogramındaki inhibisyon bölgesi zonundan toplanan bakterilerden elde edilen ikinci pasajın (P2) ampicilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.3'te, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 2.Pasaj

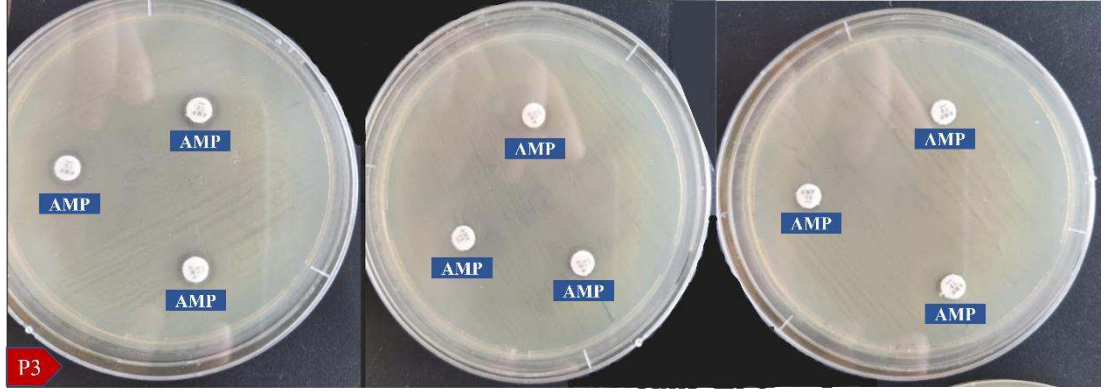
Tablo 4.3 İkinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	1,3	1,3	1,3	1,3
2.Petri	1,2	1,4	1,3	1,3
3.Petri	1,3	1,3	1,3	1,3
Genel ortalama				1,3

Tablo 4.3'teki sonuçlara göre, ampicilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşunun P2 pasajında sebep olduğu ortalama inhibisyon zonunun başlangıç durumundan daha düşük olmasına rağmen, P1'e göre artarak 1,3 cm olduğu görülmektedir.

4.1.4 Üçüncü Pasaj (P3)

P2 durumundaki ampicilin antibiyogramındaki inhibisyon bölgesi zonundan toplanan bakterilerden elde edilen üçüncü pasajın (P3) ampicilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.4'te, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 3. Pasaj

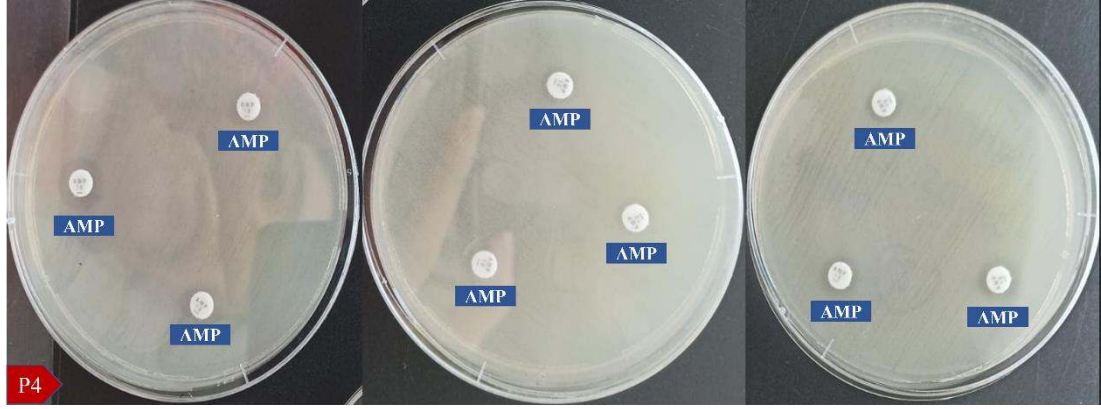
Tablo 4.4 Üçüncü pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	-	-	-	-
2.Petri	0,7	0,7	0,7	0,70
3.Petri	0,8	0,9	0,9	0,86
Genel ortalama				0,52

Tablo 4.4'teki sonuçlara göre, ampisilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşunun P3 pasajında sebep olduğu ortalama inhibisyon zonunun P1 pasajının da altına düşerek 0,52 cm olduğu görülmektedir.

4.1.5 Dördüncü Pasaj (P4)

P3 durumundaki ampisilin antibiyogramındaki inhibisyon bölgesi zonundan toplanan bakterilerden elde edilen dördüncü pasajın (P4) ampisilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.5'te, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 4. Pasaj

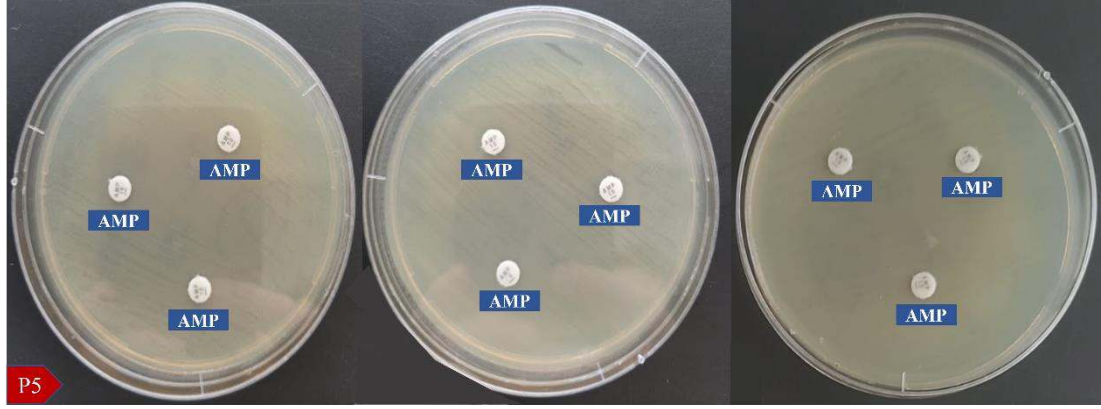
Tablo 4.5 Dördüncü pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	0,9	0,8	0,8	0,83
2.Petri	1,0	0,9	0,9	0,93
3.Petri	0,9	1,0	1,3	1,06
Genel ortalama				0,94

Tablo 4.5'teki sonuçlara göre, ampisilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşunun P4 pasajında sebep olduğu ortalama inhibisyon zonunun, aynı P2 pasajında olduğu gibi, bir yükselme ile P3 pasajının üzerine çıkarak 0,94 cm olduğu görülmektedir.

4.1.6 Beşinci Pasaj (P5)

P4 durumundaki ampisilin antibiyogramındaki inhibisyon bölgesi zonundan toplanan bakterilerden elde edilen beşinci pasajın (P5) ampisilin direnç durumunu gösteren fotoğraflar Şekil 4.6'da, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 Ampisiline karşı direnç geliştirme işlemi: 5. Pasaj

Tablo 4.6 Beşinci pasajda oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)			Ortalama Zon Çapı (cm)
1.Petri	-	-	-	-
2.Petri	-	-	-	-
3.Petri	-	-	-	-
Genel ortalama				-

Tablo 4.6'daki sonuçlara göre, ampisilin antibiyotiğinin *P. mirabilis* suşunun P5 pasajında sebep olduğu inhibisyon zonunun tüm diskler için gözlenmediği görülmektedir.

Bu durum, *P. mirabilis* suşunun P5 pasajında ampisilin antibiyotiğine tamamen direnç kazanmış olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Ampisilin uygulamasının bakteriyel metabolizma üzerine etkisini incelemek üzere başlangıç durumu (P0), P1, P3 ve P5 pasajları kullanılmıştır.

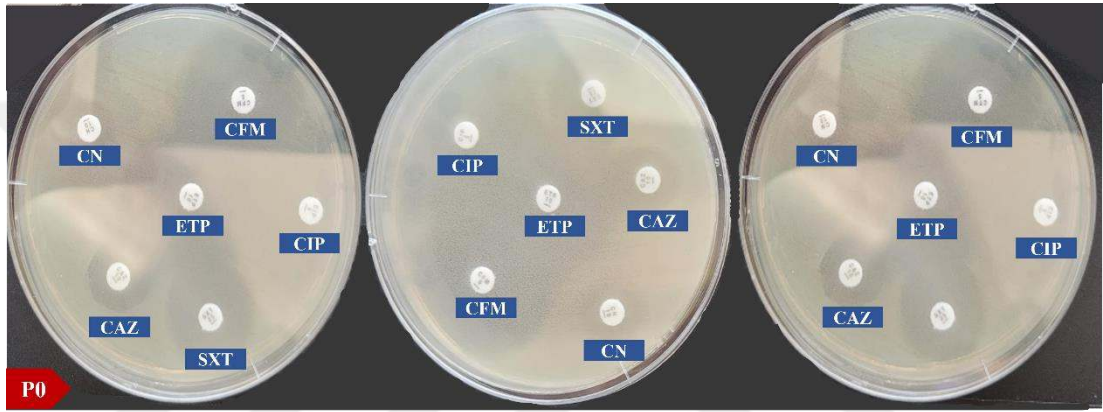
4.2 Antibiyogram Testi Sonuçları

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak Başlangıç durumundaki suş (P0) ve ampisiline dirençli 5. pasaj'dan elde edilen (P5) suşa siprofloksasin (CIP), sulfametoksazol (SXT), seftazidim (CAZ), gentamisin (CN), sefiksim (CFM) ve ertapenem (ETP) antibiyotikleri uygulanarak ampisiline direnç geliştirme sırasında bu antibiyotiklere

çapraz direnç geliştirip geliştirmedeği test edilmiştir. Uygulamalar sonunda antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülmüştür.

4.2.1 Başlangıç *P. mirabilis* Suşun (P0) Antibiyogramı

Başlangıç durumundaki suşun (P0), CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı direnç durumunu gösteren antibiyogram fotoğrafları Şekil 4.7’de, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogram: P0 suşu

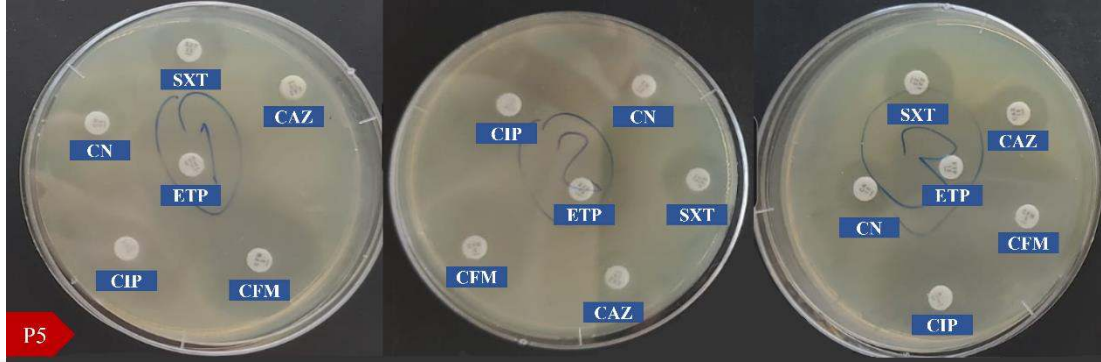
Tablo 4.7 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı başlangıç durumunda (P0) oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)					
	CIP	SXT	CAZ	CN	CFM	ETP
1.Petri	3,9	2,0	1,9	1,4	2,6	3,5
2.Petri	4,0	2,2	1,7	1,4	3,3	3,2
3.Petri	3,5	2,1	1,8	1,4	3,6	3,2
Ortalama Zon Çapı (cm)	3,8	2,1	1,8	1,4	3,2	3,3

Tablo 4.7’deki sonuçlara göre, CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerinin başlangıç durumundaki *P. mirabilis* suşunda sırasıyla ortalama 3,8 cm, 2,1 cm, 1,8 cm, 1,4 cm, 3,2 cm ve 3,3 cm’lik bir inhibisyon zonuna sebep olduğu görülmektedir.

4.2.2 Beşinci Pasaj (P5) Antibiyogramı

Beşinci pasajdan elde edilen ampiciline karşı dirençli suşun (P5), CAZ, ETP, CFM, CIP, SXT ve CN antibiyotiklerine karşı direnç durumunu gösteren antibiyogram fotoğrafları Şekil 4.8’de, ölçülmüş olan zon çapları ise Tablo 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı antibiyogram: P5 suşu

Tablo 4.8 CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerine karşı beşinci pasajda (P5) oluşan inhibisyon zonlarının çapları

Replikalar	Zon Çapları (cm)					
	CIP	SXT	CAZ	CN	CFM	ETP
1.Petri	3,0	1,8	1,4	1,4	3,0	2,8
2.Petri	2,8	1,8	1,3	1,2	3,0	2,2
3.Petri	3,0	1,8	1,6	1,3	2,8	3,0
Ortalama Zon Çapı (cm)	2,9	1,8	1,4	1,3	2,9	2,7

Tablo 4.8’deki sonuçlara göre, CIP, SXT, CAZ, CN, CFM ve ETP antibiyotiklerinin beşinci pasaj *P. mirabilis* suşunda sebep olduğu inhibisyon zonunun tüm diskler için sırasıyla ortalama 2,9 cm; 1,8 cm; 1,4 cm; 1,3 cm; 2,9 cm ve 2,7 cm’lik bir inhibisyon zonuna sebep olduğu görülmektedir.

Bu durum, *P. mirabilis* suşunun P5 pasajında özellikle CAZ, CIP ve ETP antibiyotiklerine karşı çapraz direnç kazanmış olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

4.3 Yolak Analizleri

GC-MS tabanlı metabolomik analizlerle P0, P1, P3 ve P5 suşlarının antibiyotik uygulanmış grupları ve kontrol grupları analiz edilmiştir. Elde edilen ham GC-MS verileri MS-DIAL yazılımında işlenmiştir. Tanımlanan metabolitler, gruplar arasında

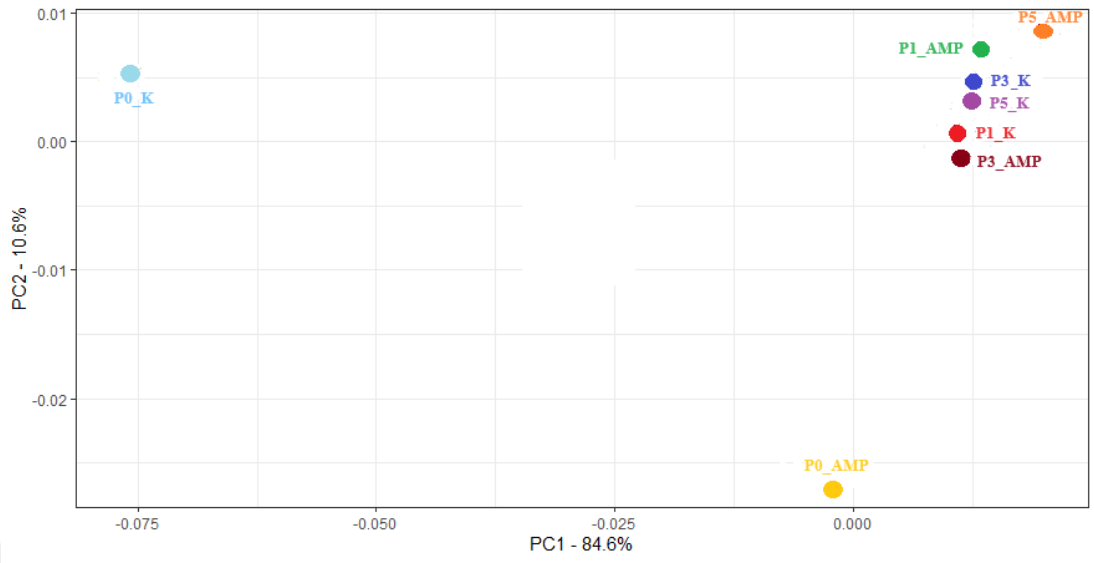
değişen metabolitleri belirlemek için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde iki örnekli t-testi kullanılarak $p < 0,05$ olan metabolitlere odaklanılmıştır. İki tabanında logaritmik kat değişimi (fold change) $-0,58$ 'den küçük olan metabolitler aşağı regüle ve $+0,58$ 'den büyük olan metabolitler yukarı regüle olarak belirlenmiştir.

Gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren metabolit profillerini kullanarak etkilenen yolakları belirlemek için Metaboanalyst yazılımı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır. Bazı gruplar arasındaki metabolit farklılıkları yolak analizi gerçekleştirmek için yetersiz olmuştur bu yüzden sadece yeterli sayıda metabolit farklılık gösteren gruplar incelenmiştir.

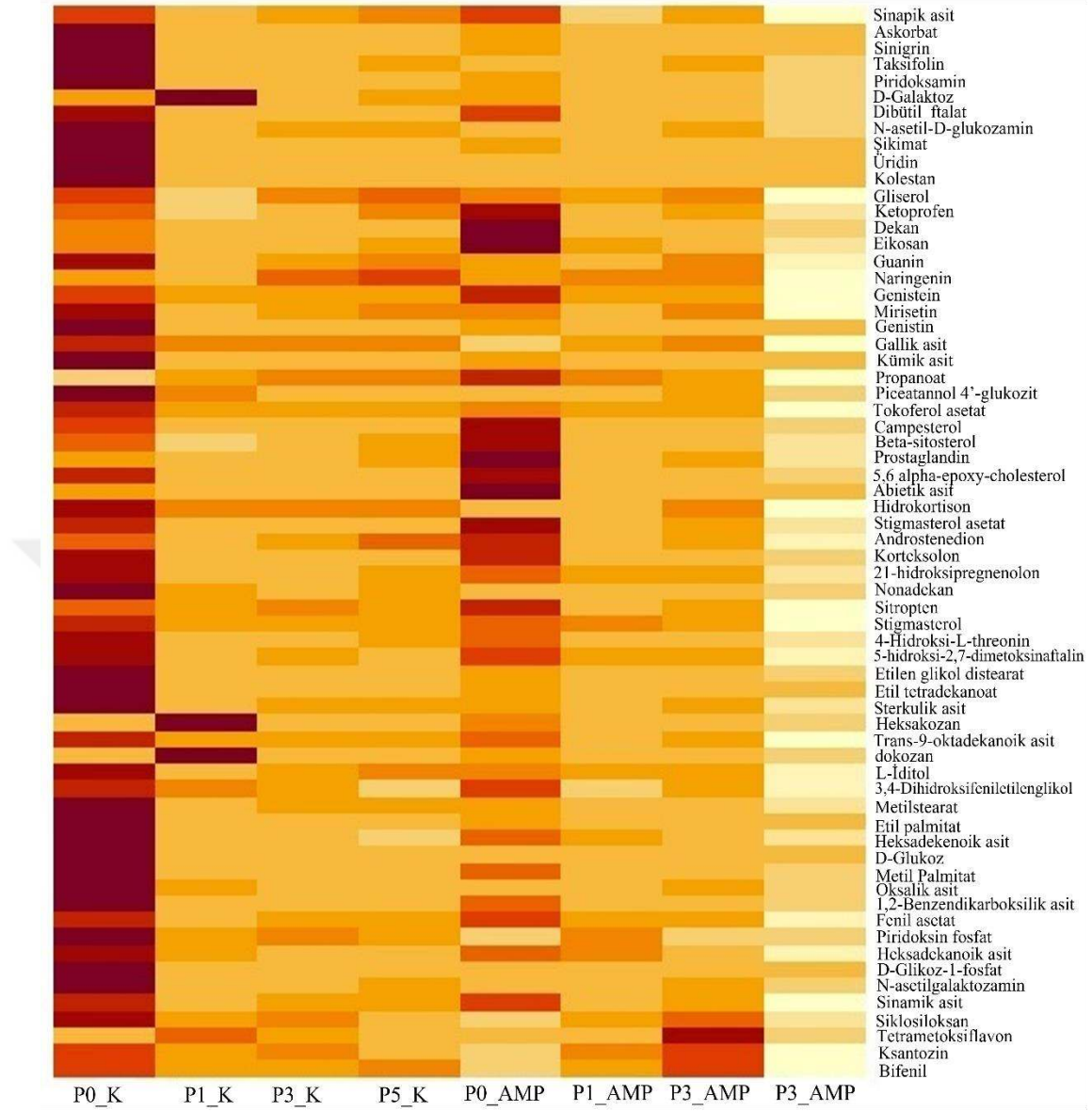
Yolak etki analizlerindeki $\log_{10}(p)$, p değerinin logaritmik dönüşümüdür. $\log_{10}(0,05) \approx -1.301$ 'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Yolak etkisi ise sağlanan metabolik verilere dayanarak en önemli ölçüde etkilenen veya değiştirilen yolakların belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

4.3.1 Ampisilin (AMP) Uygulanan Gruplar Arası Anlamlı Farklılaşan Metabolitler ve Yolak Analizleri

Gruplar arasında AMP antibiyotiğinin *P. mirabilis*'in metabolom yapısı üzerindeki etkisini gözlemlemek için temel bileşen analizi (PCA) Şekil 4.9'da verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı değişen metabolitlerin tümü Şekil 4.10'daki ısı grafiğinde verilmiştir.



Şekil 4.9 Ampisilin uygulanmış ve kontrol gruplarının temel bileşen analizi (PCA)



Şekil 4.10 Gruplar arası anlamlı değişen metabolitlerin ısı grafiği

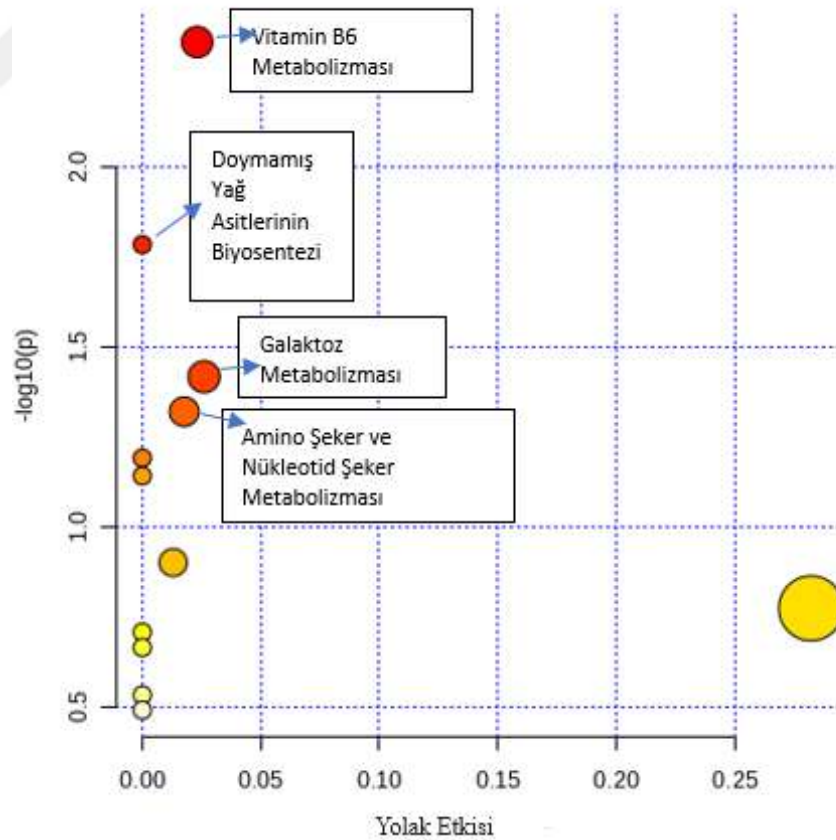
4.3.1.1 P5_AMP-P0_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim

P5_AMP ve P0_AMP grupları arasındaki diferansiyel metabolitlerin ve metabolitlerin eşleştiği yollar Tablo 4.9’da, yolak etki analizi ise Şekil 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.9 P5 AMP ve P0 AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Vitamin B6 Metabolizması	2/13	0,0045045	Piridoksamin 4-Hidroksi-L-threonin	0,07 0,04	-3,605 -4,904	0,007 0,01
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	1/2	0,016438	Hekzadekanoik asit	0,03	-5,409	0,04
Galaktoz Metabolizması	2/39	0,038258	N-Asetil-D-galaktozamin D-Glikoz	0,21 0,06	-2,299 -3,455	0,03 0,02
Amino Şeker ve Nükleotid Şeker Metabolizması	2/44	0,0478	N-Asetil-D-galaktozamin D-Glikoz	0,21 0,06	-2,299 -3,455	0,03 0,02

Tablo 4.9'a göre, P5-AMP ve P0-AMP grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu vitamin B6 metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi, galaktoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması yollarının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.11 P5 AMP -P0 AMP yolak etki analizi

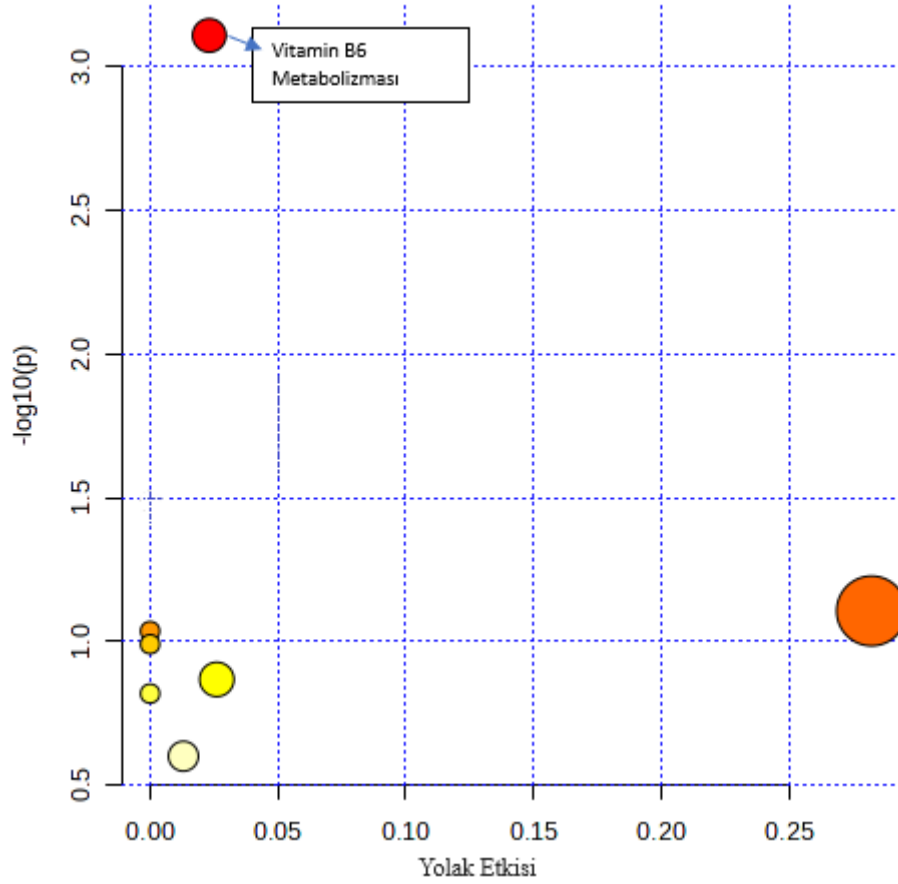
4.3.1.2 P3_AMP -P0_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim

P3_AMP ve P0_AMP grupları arasındaki diferansiyel metabolitlerin ve metabolitlerin eşleştiği yollar Tablo 4.10’da, yolak etki analizi ise Şekil 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.10 P3_AMP ve P0_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Vitamin B6 Metabolizması	2/13	7,7653E-4	Piridoksamin	0,0765	-0,0385	0,004
			4-Hidroksi-L-Treonin	0,0539	-0,892	0,05

Tablo 4.10’a göre, P3-AMP ve P0-AMP grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu vitamin B6 metabolizması yolağının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.12 P3_AMP -P0_AMP yolak etki analizi

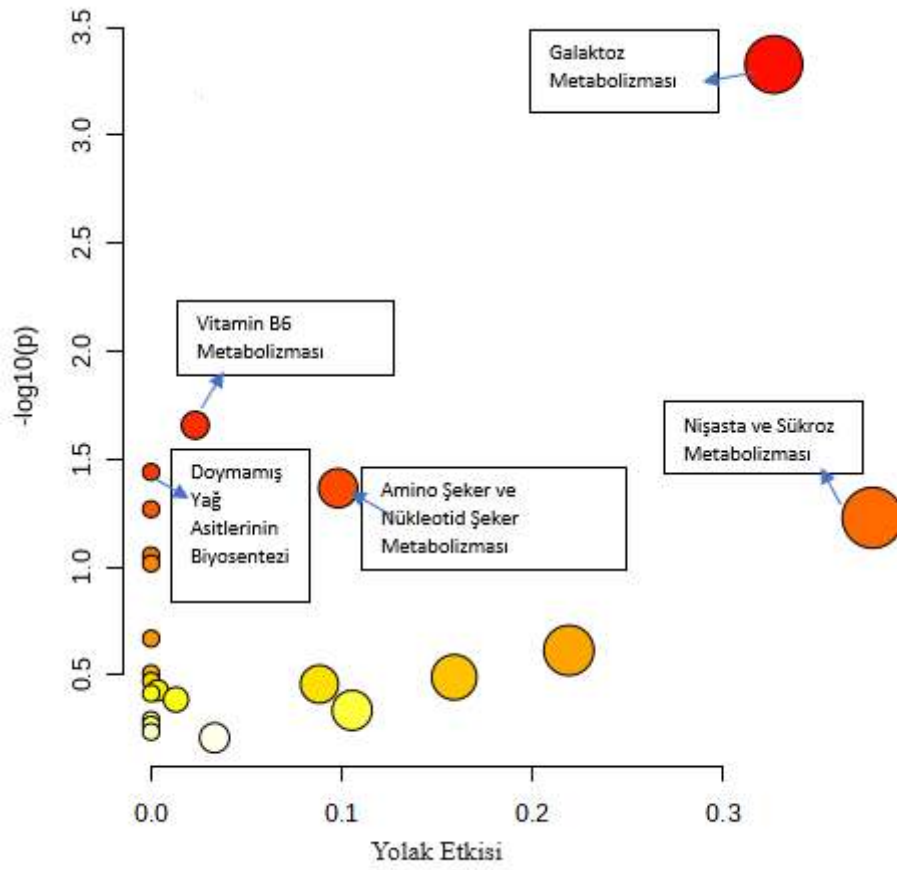
4.3.1.3 P5_AMP -P1_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim

P5_AMP ve P1_AMP grupları arasındaki diferansiyel metabolitler ve metabolitlerin eşleştiği yollar Tablo 4.11’de, yola etki analizi ise Şekil 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.11 P5_AMP ve P1_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yol Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Galaktoz Metabolizması	5/39	4,7046E-4	D-Glikoz 1-fosfat	0,13	-2,935	0,008
			N-Asetil-D-galaktozamin	0,16	-2,566	0,04
			D-Galaktoz	0,10	-3,264	0,02
			D-Glikoz	0,09	-3,386	0,001
			Gliserol	0,11	-3,161	0,004
Vitamin B6 Metabolizması	2/13	0,022074	Piridoksamin	0,08	-3,590	0,04
			4-Hidroksi-L-Treonin	0,07	-3,725	0,01
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	1/2	0,036344	Hekzadekanoik asit	0,06	-4,050	0,007
Amino Şeker ve Nükleotid Şeker Metabolizması	3/44	0,043188	N- Asetil-D-glikozamin	0,134	-2,899	0,01
			D-Glikoz 1-fosfat	0,13	-2,935	0,008
			D-Glikoz	0,09	-3,386	0,001

Tablo 4.11’e göre, P5-AMP ve P1-AMP grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yola analizi sonucu galaktoz metabolizması, vitamin B6 metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi ve amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması yollarının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.13 P5_AMP -P1_AMP yolak etki analizi

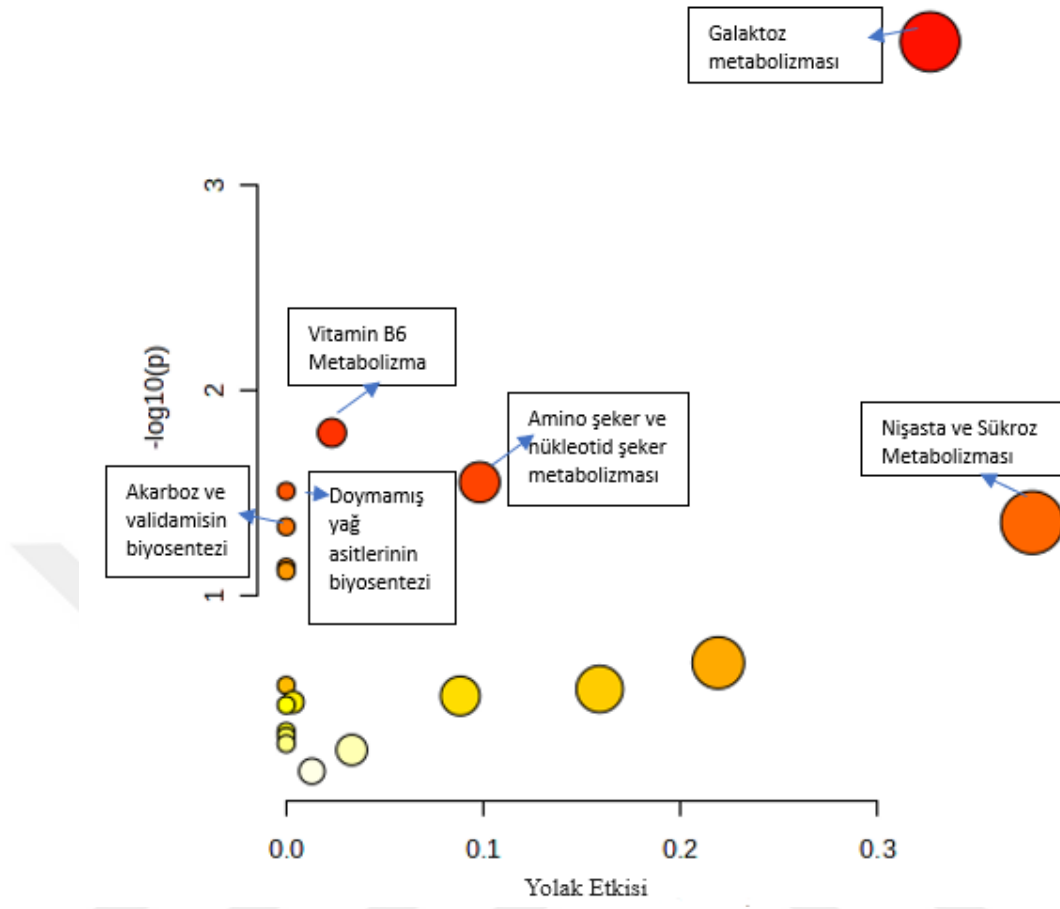
4.3.1.4 P5_AMP -P3_AMP Grupları Arası Metabolik Değişim

P5_AMP ve P3_AMP grupları arasındaki diferansiyel metabolitler ve metabolitlerin eşleştiği yolaklar Tablo 4.12’de, yolak etki analizi ise Şekil 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4.12 P5 AMP ve P3 AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Galaktoz Metabolizması	5/39	2,741E-4	D-Glikoz 1-fosfat	0,10	-3,197	0,001
			N-Asetil-D-galaktozamin	0,11	-3,145	0,04
			D-Galaktoz	0,09	-3,430	0,002
			D-Glikoz	0,10	-3,309	0,03
			Gliserol	0,09	-3,35	0,004
Vitamin B6 Metabolizması	2/13	0,010543	Piridoksamin	0,10	-3,274	0,009
			4-Hidroksi-L-Treonin	0,07	-3,735	0,01
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	1/2	0,029129	Hekzadekanoik asit	0,07	-3,767	0,002
Amino Şeker ve Nükleotid Şeker Metabolizması	3/44	0,02374	N-Asetil-D-glukozamine	0,11	-3,14	0,004
			D-Glikoz 1-fosfat	0,10	-3,197	0,001
			D-Glikoz	0,10	-3,309	0,03
Nişasta ve Sükroz Metabolizması	2/22	0,039274	D-Glikoz 1-fosfat	0,10	-3,197	0,001
			D-Glikoz	0,10	-3,309	0,03
Akarboz ve validamisin biyosentezi	1/3	0,043393	D-Glikoz 1-fosfat	0,10	-3,197	0,001

Tablo 4.12'ye göre, P5-AMP ve P3-AMP grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu galaktoz metabolizması, vitamin B6 metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması ve akarboz ve validamisin biyosentezi yollarının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.14 P5_AMP -P3_AMP yolak etki analizi

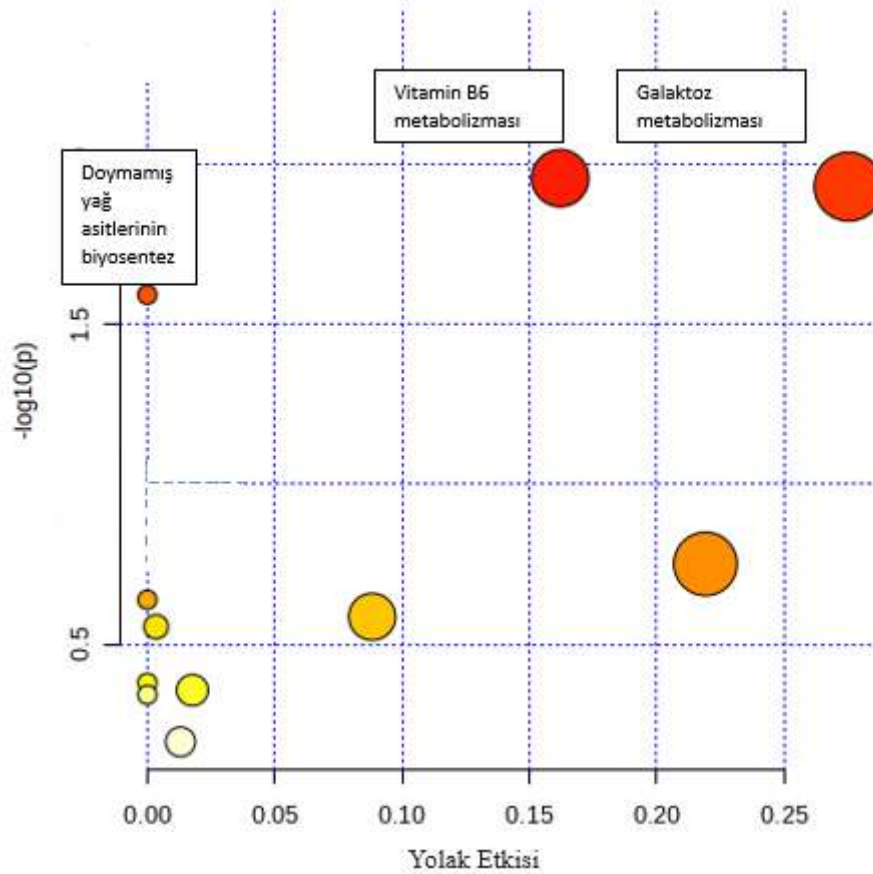
4.3.1.5 P5_AMP-P5_K Grupları Arası Metabolik Değişim

P5_AMP ve P5_K grupları arasındaki diferansiyel metabolitler ve metabolitlerin eşleştiği yolaklar Tablo 4.13’de, yolak etki analizi ise Şekil 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4.13 P5_K ve P5_AMP grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolakların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Vitamin B6 Metabolizması	2/13	0,011009	Piridoksin fosfat	0,13	-2,84	0,02
			4-Hidroksi-L-Treonin	0,06	-3,89	0,002
Galaktoz Metabolizması	3/39	0,011707	N-Asetil-D-galaktozamin	0,07	-3,671	0,04
			D-Galaktoz	0,07	-3,706	0,001
			Gliserol	0,08	-3,57	0,005
Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi	1/2	0,025511	Hekzadekanoik asit	0,11	-3,15	0,004

Tablo 4.13'e göre, P5-K ve P5-AMP grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu vitamin B6 metabolizması, galaktoz metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi yolaklarının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.15 P5_K-P5_AMP yolak etki analizi

4.3.2 Seftazidim (CAZ) Uygulanan Gruplar Arası Anlamlı Farklılaşan Metabolitler ve Yolak Analizleri

P. mirabilis suşunun Ampisilin direnci geliştirirken aynı zamanda seftazidime karşı da direnç geliştirdiği görülmüştür. Bu nedenle P0, P1, P3, P5 gruplarına seftazidim uygulamaları yapılmıştır.

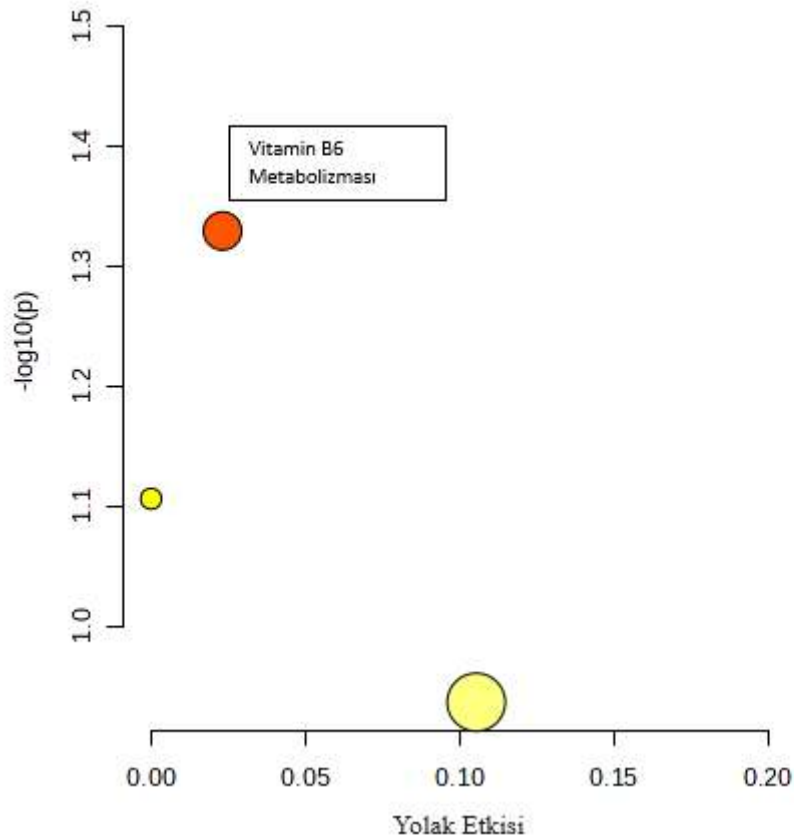
4.3.2.1 P0_K-P0_CAZ Grupları Arası Metabolik Değişim

P0_K ve P0_CAZ grupları arasındaki diferansiyel metabolitler ve metabolitlerin eşleştiği yollar Tablo 4.14’de, yolak etki analizi ise Şekil 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.14 P0_K ve P0_CAZ grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log ₂ (FC)	P Değeri
Vitamin B6 Metabolizması	1/13	0,04	Piridoksamin	5,95	2,57	0,02

Tablo 4.14’e göre, P0-K ve P0-CAZ grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu vitamin B6 metabolizması yolağının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.16 P0_K-P0_CAZ yolak etki analizi

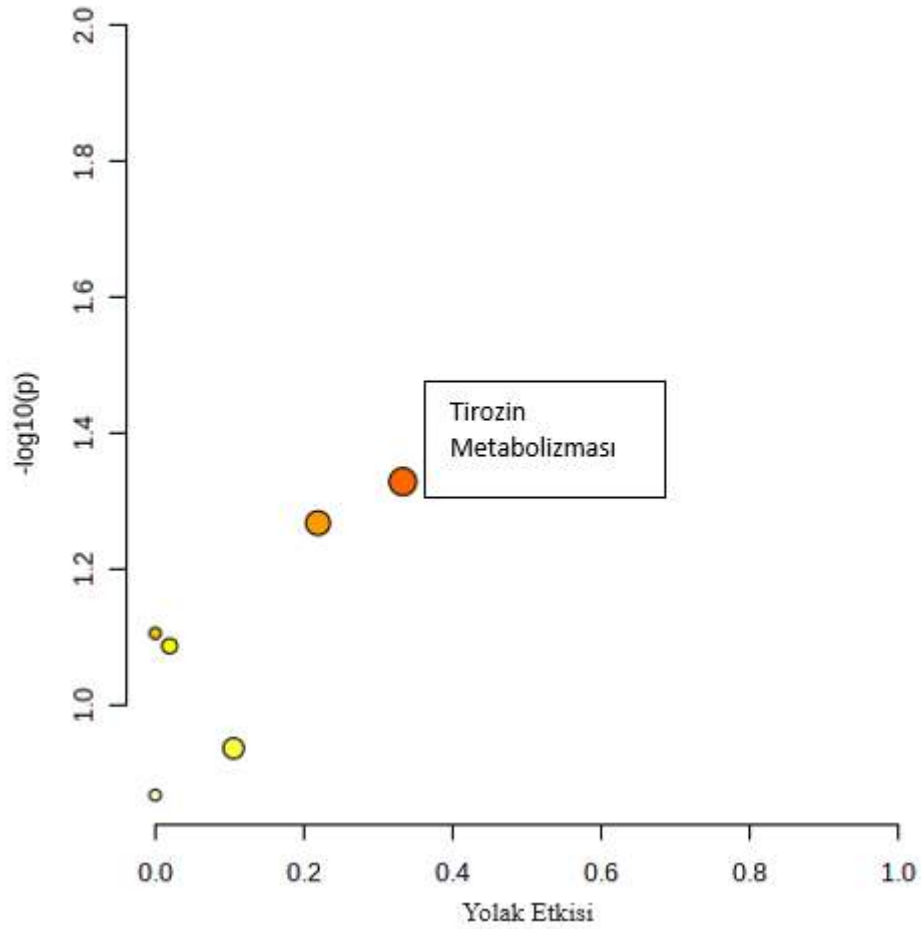
4.3.2.2 P5_K-P5_CAZ Grupları Arası Metabolik Değişim

P5_K ve P5_CAZ grupları arasındaki diferansiyel metabolitler ve metabolitlerin eşleştiği yollar Tablo 4.15’de, yolak etki analizi ise Şekil 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4.15 P5_K ve P5_CAZ grupları arası anlamlı değişen metabolitler ve eşlenen yolların analizi

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	P Değeri	Eşleşen Metabolitler	Değişim Katsayısı (FC)	Log2(FC)	P değeri
Tirozin metabolizması	1/13	0,04	3-(4-Hidroksifenil) piruvat	0,5	-0,953	0,01

Tablo 4.15’e göre, P5-K ve P5-CAZ grupları arasında değişen metabolitlere yapılan yolak analizi sonucu tirozin metabolizması yollarının etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.17 P5_K-P5_CAZ yolak etki analizi

5. TARTIŞMA

P. mirabilis idrar yolu enfeksiyonlarının ikinci en yaygın nedeni ve aynı zamanda nozokomiyal enfeksiyonların da önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir (Rózalski vd., 1997). Chanal vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada, klinik olarak izole edilmiş ve bir β -laktam antibiyotiği olan amoksisiline dirençli *P. mirabilis* suşları arasında β -laktamların prevelansını değerlendirmişlerdir. 1072 ardışık *P. mirabilis* suşun amoksisilin sıklığı %48,5 olarak tespit edilmiş ve 520 amoksisiline dirençli izolat arasında penisilinaz (407 suş (%78,3)), genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz (74 suş (%14,2)) ve inhibitör direnci (39 suş (%7,5)) fenotipi tespit edilmiştir. Amoksisilin direnci %97 oranla TEM veya TEM'den üretilen β -laktamazlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca Karim (2012) tarafından yapılan çalışmada, klinik olarak izole edilmiş ve çoklu ilaç direnci fenotipine sahip *P. mirabilis* suşlarının çoğunlukla β -laktamaz enzimleri ürettiği ve 3000 baz çiftinden büyük bir plazmid taşıdığını tespit etmişlerdir. Kütleme deneyi sonucunda da plazmidini kaybeden suşların antibiyotiklere olan dirençlerini de kaybettiklerini gözlemlemişlerdir. Bu bulgular, çoklu ilaç direnci fenotipinin oluşumunda plazmid veya kromozomal β -laktamaz enzimlerinin potansiyel katkısını göstermektedir.

Luzarro vd. (2009) tarafından yapılan çalışmasında incelenen 2070 adet *P. mirabilis* izolatın ampisilin, piperasilin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim ve seftriakson antibiyotiklerine karşı direnç geliştirdiği tespit edilerek *P. mirabilis*'in β -laktam antibiyotiklerinin çoğuna karşı dirençli olduğu gösterilmiştir.

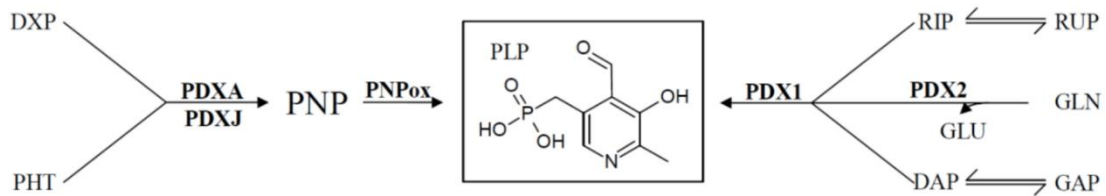
Yapılan bu tez çalışmasında, bir β -laktam antibiyotiği olan ampisiline karşı *P. mirabilis* suşuna direnç kazandırma işlemi uygulanmıştır. Ampisiline karşı direnç kazanan *P. mirabilis* suşunun başka bir β -laktam antibiyotiği olan seftazidime karşı da direnç kazandığı antibiyogram testleri sonucunda görülmüştür. Yapılan direnç kazandırma işlemi sırasında hücre metabolomunda ampisiline karşı ve seftazidime karşı *P. mirabilis*'in metabolomunda meydana gelen değişiklikler ve etkilenen yolların belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada tespit edilen metabolomik profillerdeki değişikliklerden hareketle direnç gelişimi mekanizmalarının

aydınlatılmasında katkı sağlayacağı ve yeni antibiyotik hedeflerinin geliştirilmesine fayda sağlayabileceği öngörüsünde bulunulabilir.

GC-MS tabanlı metabolomik analizlerden elde edilen verilere biyoinformatik analizler uygulanarak pasajların metabolom profilleri belirlenmiş ve metabolik yolak analizleri sonucu direnç kazanma sürecince ampisilin ve seftazidim antibiyotiklerinin birçok metabolik yolağa etki ettiği tespit edilmiştir.

5.1 AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Vitamin B6 Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi

B6 vitamini, aynı zamanda piridoksin olarak da bilinen bir B vitamini türüdür. B6 vitamini, hücre fonksiyonlarını gerçekleştirmek amacıyla yağ asidi biyosentezi, amino asit biyosentezi ve katabolizması gibi hücresel düzeyde çeşitli süreçlerde görev almaktadır (Mooney vd., 2009; Hellmann & Mooney, 2010). B6 vitamini, piridoksin, piridoksamin ve piridoksal olarak bilinen üç değişken türe sahiptir. Bu türler, piridinin 4' pozisyonundaki değişken bir grupla birbirlerinden ayrılır. Piridoksin, B6 vitamini olarak da bilinen en yaygın türevidir. Kimyasal olarak, 4' pozisyonunda hidroksil metil grubuna ($-\text{CH}_3\text{OH}$) sahiptir. B6 vitamini ailesinin bir diğer türevi olan Piridoksamin, 4' pozisyonunda amino metil grubuna ($-\text{CH}_3\text{NH}_2$) sahiptir. Piridoksal, B6 vitamini ailesinin bir diğer formudur. 4' pozisyonunda aldehit grubuna ($-\text{CHO}$) sahiptir. Bu türevler fosforilasyon sonucunda biyolojik olarak aktif B6 vitamini formu olan piridoksal 5'-fosfat (PLP) haline dönüşebilir. PLP, B6 vitamini koenzimi olarak işlev görür ve birçok enzimatik reaksiyonda önemli bir rol oynar (Parra vd., 2018).



Şekil 5.1 PLP Biyosentezi

Şekil 5.1'de (Parra vd. (2018) kaynağından alınmıştır) PLP biyosentezine yol açan reaksiyonlar gösterilmiştir. Piridoksin biyosentez enzimleri PDXA (4-hidroksitreonin-4-fosfat dehidrojenaz) ve PDXJ (piridoksin 5'-fosfat sentaz); deoksiloz 5'-fosfat

(DXP) ve 4 fosfohidroksi-L-treonin (PHT) kullanarak piridoksin 5'-fosfat (PNP) sentezler. Bir flavin mononükleotid (FMN) bağımlı PNP oksidaz (PNPox) daha sonra PNP'yi PLP'ye dönüştürür. PDX1 ve PDX2 enzimleri DXP'den bağımsız olarak PLP biyosentezini katalize eder. Bu enzimler aracılığıyla L-Glutamin (GLN) üzerinden PLP sentezlenebildiği gibi; Ribuloz-5-fosfat (RUP) ve Riboz-5-fosfat (RIP) üzerinden veya Gliseraldehit-3-fosfat (GAP) ve Dihidroksiaseton fosfat (DAP) üzerinden de PLP sentezlenmesi mümkündür (Parra vd., 2018). Vitamin B6 metabolizması detaylı olarak Ek-A'da verilmiştir.

PLP, birçok temel metabolik yolun düzgün işleyişi için kritiktir. PLP'nin eksikliği veya azalması ciddi sonuçlara yol açabilir. Çalışmalar, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, maya ve bitkilerde PLP eksikliğinin organizma için ölümcül olabileceği, bu durumun ancak takviye bir vitamin kaynağı ile düzeltilebileceği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Sakai vd., 2002; Titiz vd., 2006; Wagner vd., 2006; El Qaidi vd., 2013; Boycheva vd., 2015; Parra vd., 2018).

Pease vd. (2002) yaptığı çalışmada, *E.coli*'de, büyüme hızı ile pdxB ve pdxA genlerinin ifadesi arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Rosenberg ve arkadaşları (2017) yüksek büyüme oranlarına ulaşmak amacıyla gereken B6 vitamini talebinin karşılanması için, PdxB ve PdxA enzimlerinin miktarının, muhtemelen amino asit ve dolayısıyla protein biyosentezine katılımı nedeniyle, artırılması gerektiğini söylemişlerdir.

Tramonti vd. (2021) yaptığı çalışmada *E. coli*'de PLP ile bağlanan, dolayısıyla PLP olmadan çalışması etkilenecek proteinleri listelemişlerdir. Bu proteinler Tablo 5.1'de (Tramonti vd., (2021) kaynağından alınmıştır) verilmiştir. Tablo 5.1, PLP'nin bakteriyel yaşamda ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.1 *E. coli*'de PLP bağlayan proteinler

Protein Adı	Aktivite	UniProt ID	Biyolojik Süreç
IlvE	Dallanmış zincirli amino asit aminotransferaz	P0AB80	Dallanmış zincirli amino asit biyosentezi
IlvA	Treonin deaminaz	P04968	Dallanmış zincirli amino asit biyosentezi
CysK	Sistein sentaz A	P0ABK5	Cys biyosentezi
CysM	Sistein sentaz B	P16703	Cys biyosentezi
TrpB	Triptofan sentaz, β	P0A879	Trp biyosentezi
LysA	Triptofan sentaz, β	P0A879	Lys biyosentezi

Tablo 5.1'in devamı			
ArgD	N-asetilornitin aminotransferaz/N-süksinildiaminopimelat aminotransferaz	P18335	Arg ve Lys biyosentezi
ThrC	Treonin sentaz	P00934	Thr biyosentezi
MetB	O-succinylhomoserine(thiol)-lyase	P00935	Cys ve Met biyosentezi
MetC	Sistatinyonin β -liyaz/l-sistein desülfhidraz/alanin rasemaz	P06721	Met biyosentezi
AlaC	Glutamat-piruvat aminotransferaz	P77434	Ala biyosentezi
AlaA	Glutamat-piruvat aminotransferaz	P0A959	Ala biyosentezi
TyrB	Tirozin aminotransferaz	P04693	Asp, Tyr, Leu, Phe biyosentezi
HisC	Histidinol-fosfat aminotransferaz	P06986	His biyosentezi
MalY	Sistatinyonin β -liyaz	P23256	Met biyosentezi
AspC	Aspartat aminotransferaz	P00509	Phe biyosentezi
LtaE	L-treonin aldolaz	P75823	Gly biyosentezi
Alr	Alanin rasemaz 1	P0A6B4	D-Ala biyosentezi
DadX	Alanin rasemaz 2	P29012	D-Ala biyosentezi
AvtA	Valin-piruvat aminotransferaz	P09053	Ala ve Val biyosentezi
SerC	Fosfoferin/fosfohidroksitreonin aminotransferaz	P23721	Ser, Lys, and PLP biyosentezi
SpeA	Arginin dekarboksilaz, biyosentetik	P21170	Poliamin biyosentezi
SpeC	Ornitin dekarboksilaz	P21169	Spermidin ve putresin biyosentezi
SelA	Selenosistein sentaz	P0A821	Selenosistein biyosentezi
WecE	dTDP-4-dehidro-6-deoksi-d-glikoz transaminaz	P27833	Polisakkarit biyosentezi
ArnB	UDP-4-amino-4-deoksi-l-arabinoz aminotransferaz	P77690	Polisakkarit biyosentezi
PabC	Aminodeoksikorizmat liyaz	P28305	Folat biyosentezi
BioF	8-amino-7-oksononanoat sentaz	P12998	Biyotin biyosentezi
BioA	Adenosilmetiyonin-8-amino-7-oksononanoat aminotransferaz	P12995	Biyotin biyosentezi
HemL	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	P23893	Tetrapirrol biyosentezi
TdcB	Katabolik treonin dehidrataz	P0AGF6	Ser ve Thr katabolizması
DsdA	d-serin amonyak-liyaz	P00926	Ser ve Thr katabolizması
Kbl	2-Amino-3-ketobutirat koenzim A ligaz	P0AB77	Thr katabolizması
AstC	Süksinilornitin transaminaz	P77581	Arg ve ornitin metabolizması
GlyA	Serin hidroksimetiltransferaz	P0A825	Gly, Ser ve tetrahidrofolat metabolizması
GadA	Glutamat dekarboksilaz A	P69908	Glu metabolizması
GadB	Glutamat dekarboksilaz B	P69910	Glu metabolizması
GcvP	Glycine decarboxylase	P33195	Gly metabolizması
TnaA	Triptofanaz/l-sistein desülfhidraz	P0A853	Trp metabolizması
CadA	Lysine decarboxylase 1	P0A9H3	Lys metabolizması
LdcC	Lysine decarboxylase 2	P52095	Lys metabolizması
YgeX	2,3-Diaminopropiyonat amonyak-liyaz	P66899	d-Ser katabolizması
DcyD	d-sistein desülfhidraz	P76316	d-amino asit metabolizması
GabT	4-Aminobutirat aminotransferaz	P22256	Gama-aminobütirat metabolizması
PuuE	4-Aminobutirat aminotransferaz	P22256	Gama-aminobütirat metabolizması
PatA	Putresin aminotransferaz	P42588	Putresin katabolizması
YbdL	Metiyonin-okso-asit transaminaz	P77806	L-kinurenin metabolizması
EpmB	Lizin 2,3-aminomutaz	P39280	Posttranslasyonel modifikasyon

Tablo 5.1'in devamı			
GlgP	Glikojen fosforilaz	P0AC86	Glikojen metabolizması
MalP	Maltodekstrin fosforilaz	P00490	Glikojen metabolizması
SufS	L-sistein desülfüraz	P77444	Demir-kükürt kümesi düzenneği
CsdA	Sistein sülfinat desülfinaz	Q46925	Demir-kükürt kümesi düzenneği
YdcR	MocR benzeri transkripsiyon faktörü	P77730	Transkripsiyonun düzenlenmesi
YjiR	MocR benzeri transkripsiyon faktörü	P39389	Transkripsiyonun düzenlenmesi
PLPHP	PLP homeostaz proteini	P67080	PLP bağlama
YhfX	Varsayılan	P45550	
YhfS	Varsayılan aminotransferaz	P45545	

Bu tez çalışmasında ampisilin ve seftazidim uygulanması sonucu gruplar arasında vitamin B6 metabolizmasının etkilendiği açıkça görülmüştür.

Çalışmada kullanılan antibiyotikler β -laktam antibiyotikler olup; bu antibiyotikler, penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanan ve bunları inhibe eden antibiyotiklerdir. Bu PBP'lere, bakteriyel hücre duvarlarının peptidoglikan tabakasının çapraz bağlanmasını (transpeptidasyon) katalize etmek için ihtiyaç vardır. Transpeptidasyonun engellenmesi bakterinin ozmotik basınca dayanamayıp yırtılmasıyla sonuçlanır (Sykes ve Papich, 2021). Transpeptidasyon, bakteriyel hücre duvarının ana yapısal bileşeni olan peptidoglikanın sentezinde çok önemli bir adımdır. Transpeptidasyonun inhibe edilmesi, hücre bölünmesi sırasında yeni peptidoglikanın oluşumunu engeller (Harry vd., 2006). Peptidoglikan sentezinin inhibe edildiği bir durumda, hücrenin bölünmesinin yaratacağı risk sebebiyle; peptidoglikan sentezi, hücre bölünmesinin durdurulmasına sebep olur (Puls vd., 2023).

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, β -laktam antibiyotiğinin sebep olacağı parçalanma riski ile birlikte, hücre bölünmesinin durdurulmasında büyüme ve gelişmede önemli rol oynayan vitamin B6 sentezinin aşağı regülasyonunun görev aldığı düşünülebilir. Tablo 5.1'de görüldüğü gibi, vitamin B6 sentezinin aşağı regülasyonu, hücre içindeki birçok metabolik yolağı etkileyecektir.

Çalışma sonucunda anlamlı bulunmuş metabolit değişimleri ve bu metabolitlerin vitamin B6 metabolizması ile ilişkileri aşağıda detaylı olarak tartışılmıştır.

5.2 AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezine Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara bakıldığında, direnç gelişimine bağlı olarak antibiyotik uygulamasında hücre membranının yapısında bulunan bir doymuş yağ asidi olan hekzadekanoik asidin (palmitik asit) aşağı regüle edildiği gözlenmiştir.

Armengol vd. (2019) yaptığı çalışmada, kolistin kullanımına bağlı membran akışkanlığı değişikliklerinin lokal rijiditeyi azaltacağı, buna bağlı olarak efflux pompalarının doğru paketlenmesini değiştirerek hücreye ulaşan ilaçların dışa atımını değiştirebileceğini raporlamışlardır.

Armengol vd. (2019) yapmış olduğu bu çalışmaya göre, yapılan bu tez çalışmasında gözlemlenen doymuş yağ asidi hekzadekanoik asit (palmitik asit) sentezinin aşağı regülasyonunun membran akışkanlığını değiştirerek membran akışkanlığını değiştirebileceği, bu sayede efflux pompaları aracılığıyla uygulanan antibiyotiğin dışa atımını kolaylaştıracağı sonucunu çıkartmak mümkündür.

Adebusuyi vd. (2011) yapmış olduğu çalışma da bu fikri destekler yöndedir. Adebusuyi ve arkadaşları (2011) inkübasyon sıcaklığına göre değişen membran akışkanlığının dışa atım (efflux) pompaları üzerindeki değişimi üzerine çalışmışlardır. Çalışmada, değişen membran yağ asitlerinin bileşiminin, bakteriler tarafından fizyolojik veya biyokimyasal stresin neden olduğu membran akışkanlığındaki değişiklikleri telafi etmek için kullanılan bir adaptasyon mekanizması olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada, membran akışkanlığının, zarda bulunan lipidlerin ve proteinlerin (efflux pompaları dahil) etkileşimlerini, hareketliliğini ve geçirgenliğini etkilediği sonucuna varılmıştır.

Armengol ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmaya göre, membran akışkanlığının artması efflux pompaları aracılığıyla uygulanan antibiyotiğin dışa atılmasını kolaylaştırabilir. Ancak, Adebusuyi ve arkadaşlarının (2011) belirttiği gibi, membran akışkanlığının artması aynı zamanda uygulanan antibiyotiğin hücre içine girişini de artırabilir.

Öte yandan, Adebuseyi ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada artan antibiyotik direncinin, efflux pompalarının artan aktivitesi veya genlerin üzerinde etkisiyle ilişkilendirilmediği de raporlamışlardır.

Bessa vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* ve *S. aureus*'un çoklu ilaca dirençli (MDR) izolatları arasındaki membran akışkanlığını antibiyotik (seftazidim veya siprofloksasin) yokluğunda ve varlığında değerlendirmişlerdir. *S. aureus*'un MDR izolatlarının subinhibitör siprofloksasin konsantrasyonlarına maruz bırakılmasının membran akışkanlığını değiştirmedeği raporlanmıştır. MRSA'nın, duyarlı *S. aureus*'a göre daha rijit bir membrana sahip olduğu ve *S. aureus*'un MDR izolatlarının subinhibitör siprofloksasin konsantrasyonlarına maruz bırakılmasının duyarlı veya MDR olmasına bakılmaksızın *S. aureus*'un membran akışkanlığını önemli ölçüde değiştirmedeğini, ancak *E. coli*'nin membran akışkanlığını hafifçe etkilediğini göstermektedir. Özetle, dirençlilik ile membran akışkanlığı arasındaki ilişkiye bakılan bu çalışmada çoklu ilaç dirençli izolatlar ile dirençli olmayanların membran akışkanlığında ciddi fark olmadığını raporlamışlardır.

Bütün bu bilgiler göz önünde alındığında, hegzadekanoik asit (palmitik asit) sentezinin aşağı regülasyonu ile ilgili ileri sürülen hipotezde açıklanması gereken hususlar mevcuttur. Bu hipotezin daha sağlam delillerle ileri sürülebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Öte yandan, vitamin B6 metabolizması ile hücre bölünmesi arasındaki ilişki düşünüldüğünde hegzadekanoik asit (palmitik asit) sentezinin de aynı zamanda hücre bölünmesi baskılanması ile ilgili olabileceğini de ileri sürmek mümkündür. Ek-A'da verilmiş olan doymamış yağ asitlerinin biyosentezine ait yolakta görüldüğü üzere hegzadekanoik asit (palmitik asit) diğer birçok yağ asidinin sentezi için önemlidir. Dolayısıyla hegzadekanoik asit (palmitik asit) sentezinin aşağı regülasyonu ile diğer birçok yağ asidinin de sentezi aşağı regüle edilebilmektedir. Bu durum da, membran fosfolipitlerinin sentezini etkileyebilecektir. Vitamin B6 metabolizması aşağı regüle edilir ve hücre bölünmesi engellenirken, hücre bölünmesi sırasında ihtiyaç duyulacak yeni membran fosfolipitlerinin de aşağı regüle ediliyor olmasının hücre bölünmesinin baskılanmasında bir parametre olabileceğini düşündürmektedir.

Ancak, her iki hipotez için de ileri çalışmaların yapılması ve bu ilişkilerin daha sağlam kanıtlarla ortaya konulması gerekmektedir.

5.3 AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Tirozin Metabolizmasına Etkisinin Değerlendirilmesi

Yapılan bu tez çalışmasında bir β -laktam antibiyotik olan seftazidime (CAZ) *P. mirabilis* bakterisinin çapraz direnç kazandığı gözlenmiştir. Bakteriye CAZ antibiyotiği uygulandığında tirozin metabolizmasında görev alan 3-(4-Hidroksifenil) piruvatın anlamlı bir şekilde aşağı regüle edildiği görülmüştür.

Tirozin aminotransferaz, amino asit biyosentezinde önemli bir rol oynayan bir enzimdir. Tirozin aminotransferaz, L-tirozin'i p-hidroksifenilpiruvata dönüştürür. PLP (piridoksal 5'-fosfat) kofaktörü enzimin aktif bölgesine bağlanarak katalizin gerçekleşmesini sağlamak için gereklidir. Sonuç olarak, tirozin aminotransferaz enziminin katalitik aktivitesi için PLP kofaktörünün bağlanması ve etkileşimi kritik öneme sahiptir (Meher vd., 2010).

Dolayısıyla, B6 vitamini metabolizmasının aşağı regüle olması ile ilişkili olarak, tirozin sentezinden sorumlu tirozin aminotransferaz enziminin aktivitesinin baskılanması ve bu sebeple tirozin metabolizmasının da aşağı regüle olarak etkilenmiş olabileceği sonucunun çıkartılması mümkündür.

5.4 AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Galaktoz Metabolizması, Amino Şeker ve Nükleotid Şeker Metabolizması, Nişasta ve Sükroz Metabolizması Üzerinde Etkisinin Değerlendirilmesi

Yapılan bu tez çalışmasında galaktoz metabolizması, amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması, nişasta ve sükroz metabolizması yolları ile ilişkilendirilen ve ortak olan bazı metabolitlerin anlamlı değişimleri gözlenmiştir. Yollardaki toplam metabolit sayılarına bakıldığında, anlamlı değişim gösteren metabolitlerin sayısının düşük olduğu görülmektedir. Bu yollar birbiriyle farklı yollar olmasına rağmen, bu yolların ortak özellikleri organizmadaki enerji dengesinin, büyüme ve gelişmenin, hücre dışı matriks oluşumunun ve birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde

kritik rol oynamalarıdır. Kullanılan antibiyotiğe bağılı olarak bakterinin hücre bölünmesini baskılayacağı daha önce açıklanmıştı. Bu metabolik yolların aşağı regülasyonunun da, antibiyotik stresine karşı mikroorganizmanın metabolik aktivitesini azaltarak, hücre bölünmesini ve çoğalmayı yavaşlatarak enerji yönetimi sağlamaya yönelik bir çaba olarak yorumlanması mümkündür.

5.5 AMP ve CAZ Antibiyotiklerinin Pürin Metabolizması Üzerinde Etkisinin Değerlendirilmesi

Yapılan bu tez çalışmasında pürin metabolizması metabolitlerinden ksantozin ve guaninin azalış gösterdiği gözlenmiş, ancak bu düşüş sınırdan anlamsız olarak bulunduğu için ($p = 0,05$) bulgular kısmındaki tablolarda yer verilmemiştir. Ancak, anlamlılık düzeyi sınırdan kaldığı için bu değişimin de tartışılması uygun görülmüştür.

Kennelly vd. (2024), *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunda pürinlerin c-di-GMP metabolizmasındaki etkisi üzerine yaptıkları çalışmada; pürinlerin, bakteriyel hücrelerde planktonik (serbest yüzen) ve biyofilm durumları arasındaki geçişi düzenlemekte ikinci haberci molekül olarak yer alan c-di-GMP (siklik di-guanozin monofosfat) seviyelerini azalttığını ve bunun sonucunda biyofilm oluşumunda azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. c-di-GMP seviyesinin düşük olması biyofilm oluşumunun azalmasına neden olmaktadır. Pürin metabolizmasında meydana gelen bu aşağı akış ile c-di-GMP sinyali arasındaki bağlantı, bakterilerin yaşam tarzı değişikliklerini metabolik durumlarına göre koordine etmelerini sağlayan kritik bir kontrol noktasıdır.

Ksantozin ve guanin metabolitlerindeki azalış pürin metabolizmasında aşağı regüle sonuç vermiştir. Pürinlerdeki bu azalma c-di-GMP seviyelerinin artmasına sebep olacağından, bu durumun biyofilm oluşumu yönünde sonuç vereceği düşünülebilir.

6. SONUÇ

Antimikrobiyallerin artan ve yanlış kullanımı, mikroorganizmalarda antimikrobiyal direncin hızla yayılmasına ve enfeksiyonlara karşı etkili tedavileri tehdit eden küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmesine yol açmıştır. Bu sebeptendir ki direnç mekanizmalarının aydınlatılması, dirençle mücadele edilmesi ve yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi ve mevcut antibiyotiklerin daha etkili kullanımı için kritik önem taşımaktadır.

Antimikrobiyal direnç mekanizmalarının anlaşılmasında, metabolik yolların aydınlatılması önemli rol oynamaktadır. Direnç kazanmış mikroorganizmaların metabolik yollarındaki ortaya çıkan değişiklikler mikroorganizmaların direnç kazanmasını sağlayabilir. Dolayısıyla metabolik profillerin ayrıntılı analizi, Antimikrobiyal direnç mekanizmalarının anlaşılmasında kritik öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında, *P. mirabilis* suşuna adım adım AMP antibiyotiği uygulanmış olup, 5. pasaj sonucunda AMP antibiyotiğine karşı tamamen direnç kazandığı sonucuna ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra başka bir β -laktam antibiyotiği olan CAZ antibiyotiğine karşı da AMP dirençli suşların çapraz direnç geliştirdiği gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda AMP antibiyotiğine karşı antibiyotik direnç gelişimi sürecince *P. mirabilis* pasajlarının antibiyotiğe yanıt olarak vitamin B6 metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi, tirozin metabolizması yollarında önemli değişiklikler olduğu ve bu yolların *P. mirabilis*'in hayatta kalabilmek ve direnç kazanabilmek için temelde vitamin B6 metabolizması olmak üzere, bu yolla ilişkili diğer yolları regüle ettiği sonucuna varılmıştır.

7. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilmiş olan metabolomik sonuçları incelendiğinde, yalnızca metabolomik analizler ile kesin sonuca her zaman ulaşamayabileceği, bu analizlerin mutlaka genomik, proteomik, lipidomik ve/veya başka omik teknolojileri kullanılarak desteklenmesi gerektiği anlaşılmıştır. Bu sebeple, ileride yapılacak araştırmalarda metabolomik deneylere ek olarak proteomik ve/veya lipidomik gibi çalışmaların da yapılmasının daha doğru sonuç vereceğinden omik teknolojilerin birlikte kullanımı önerilebilir.

Antibiyotik direnci mekanizmalarının daha detaylı açıklanabilmesi için bu hususta ileri çalışmalarının yapılması önemlidir. Farklı bakteriler ve farklı antibiyotiklerle çalışmaların artması farklı etki mekanizmaların ve yolların açıklanması için önemlidir.

GC-MS'in düşük moleküler ağırlıklı, uçucu ve polarlığı düşük bileşiklerin analizine daha uygun olmasının yanı sıra, metabolitlerin türevlendirme ön işleminden geçmesi analiz süresini uzatmaktadır. Bu sebeple, ileri analizler yapılırken LC-MS kullanılarak ön işlem gerektirmeden doğrudan analiz yapılabilir.

Metabolomik keşif çalışmalarında anlamlı çıkan metabolitler üzerinde daha hedeflenmiş analizler yapılması analizlerin doğrulanması için önemlidir. Bu sebeple, ilk keşfedilen potansiyel biyobelirteçler daha ayrıntılı incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Abejew, A. A., Wubetu, G. Y., & Fenta, T. G. (2024). Relationship between Antibiotic Consumption and Resistance: A Systematic Review. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2024, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2024/9958678>
- Adebusuyi, A. A., & Foght, J. M. (2011). An alternative physiological role for the EmhABC efflux pump in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *BMC Microbiology*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-252/FIGURES/5>
- Anna Mielko, K., Jan Jabłoński, S., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2023). Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics. *Scientific Reports* |, 11, 20859. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99873-x>
- Armbruster, C. E., & Mobley, H. L. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 743-754.
- Armengol, E., Domenech, O., Fusté, E., Pérez-Guillén, I., Borrell, J. H., Sierra, J. M., & Vinas, M. (2019). Efficacy of combinations of colistin with other antimicrobials involves membrane fluidity and efflux machinery. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2031-2038. <https://doi.org/10.2147/IDR.S207844>
- Bertini, I., Hu, X., & Luchinat, C. (2014). Global metabolomics characterization of bacteria: pre-analytical treatments and profiling. *Metabolomics*, 10(2), 241-249. <https://doi.org/10.1007/S11306-013-0571-4>
- Bessa, L. J., Ferreira, M., & Gameiro, P. (2018). Evaluation of membrane fluidity of multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in presence and absence of antibiotics. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 181, 150-156. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.03.002>
- Boycheva, S., Dominguez, A., Rolcik, J., Boller, T., & Fitzpatrick, T. B. (2015). Consequences of a deficit in vitamin B6 biosynthesis de novo for hormone homeostasis and root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 167(1), 102-117. <https://doi.org/10.1104/PP.114.247767>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 39(6), 1211-1233.
- Chanal, C., Bonnet, R., De Champs, C., Sirot, D., Labia, R., & Sirot, J. (2000). Prevalence of β -Lactamases among 1,072 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*:

- a 2-Year Survey in a French Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1930. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1930-1935.2000>
- Chen, C.Y., Chen, Y.H., Lu, P.L., Lin, W.R., Chen, T.C., & Lin, C.Y. (2012). *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.11.007>
- Cho, W. C. S. (2007). Proteomics Technologies and Challenges. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(2), 77-85. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60018-7](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60018-7)
- Dong, Z. C., & Chen, Y. (2013). Transcriptomics: Advances and approaches. *Science China Life Sciences*, 56(10), 960-967. <https://doi.org/10.1007/S11427-013-4557-2/METRICS>
- Ehsan, N., Ahmad, S., Navid, A., & Azam, S. S. (2018). Identification of potential antibiotic targets in the proteome of multi-drug resistant *Proteus mirabilis*. *Meta Gene*, 18, 167–173. <https://doi.org/10.1016/J.MGENE.2018.09.004>
- El Qaidi, S., Yang, J., Zhang, J. R., Metzger, D. W., & Bai, G. (2013). The vitamin B₆ biosynthesis pathway in *Streptococcus pneumoniae* is controlled by pyridoxal 5'-phosphate and the transcription factor PdxR and has an impact on ear infection. *Journal of bacteriology*, 195(10), 2187–2196. <https://doi.org/10.1128/JB.00041-13>
- Emwas A. H. (2015). The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1277, 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13
- Feith, A., Teleki, A., Graf, M., Favilli, L., & Takors, R. (2019). HILIC-Enabled ¹³C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites*, 9(4), 63. <https://doi.org/10.3390/metabo9040063>
- Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Frontiers in Microbiology*, 11, 500668. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00256/BIBTEX>
- Goodacre, R. (2005). Metabolomics – the way forward. *Metabolomics*, 1, 1-2. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-1111-7>
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2020). An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(7), 635–654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>
- Greenwood, D., & O'Grady, F. (1969). A comparison of the effects of ampicillin on *Escherichia coli* and *proteus mirabilis*. *Journal of Medical Microbiology*, 2(4), 435–441. <https://doi.org/10.1099/00222615-2-4-435>

- Han, X. (2016). Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* 2016 12:11, 12(11), 668-679. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.98>
- Harry, E., Monahan, L., & Thompson, L. (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *International review of cytology*, 253, 27-94.
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- Hellmann, H., & Mooney, S. (2010). Vitamin B6: A Molecule for Human Health? *Molecules*, 15(1), 442. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES15010442>
- Hollywood, K., Brison, D. R., & Goodacre, R. (2006). Metabolomics: Current technologies and future trends. *PROTEOMICS*, 6(17), 4716-4723. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200600106>
- Isenstein, D., & Honig, E. (1990). *Proteus vulgaris* Empyema and Increased Pleural Fluid pH. *Chest*, 97(2), 511. <https://doi.org/10.1378/CHEST.97.2.511>
- Kanehisa, M., & Subramaniam. (2002). The KEGG Database. *Novartis Foundation Symposium*, 247, 91–103. <https://doi.org/10.1002/0470857897.CH8>
- Karim, G.F. (2012). Plasmid mediated multidrug resistant of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Kirkuk University Journal-Scientific Studies*, 7(2), 30–41. <https://doi.org/10.32894/KUJSS.2012.63498>
- Kart, D., Yabanoglu Ciftci, S., & Nemutlu, E. (2020). Altered metabolomic profile of dual-species biofilm: Interactions between *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*. *Microbiological Research*, 230, 126346. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2019.126346>
- Kennelly, C., Tran, P., & Prindle, A. (2024). Environmental purines decrease *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by disrupting c-di-GMP metabolism. *Cell Reports*, 43(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114154>
- Kok, M., Maton, L., van der Peet, M., Hankemeier, T., & van Hasselt, J. G. C. (2022). Unraveling antimicrobial resistance using metabolomics. *Drug discovery today*, 27(6), 1774–1783. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.03.015>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Fiehn, O. (2018). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods*, 15(1), 53–56. doi:10.1038/nmeth.4512
- Lei, Z., Huhman, D. V., & Sumner, L. W. (2011). Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25435. <https://doi.org/10.1074/JBC.R111.238691>
- Lenz, E. M., & Wilson, I. D. (2007). Analytical strategies in metabonomics. *Journal of proteome research*, 6(2), 443-458. <https://doi.org/10.1021/PR0605217>

- Lin, Y., Li, W., Sun, L., Lin, Z., Jiang, Y., Ling, Y., & Lin, X. (2019). Comparative metabolomics shows the metabolic profiles fluctuate in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103468>
- Luis Capelo, J., Partridge, S. R., Hospital, W., Peter Damborg, A., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Clemente, L., Moura, I. B., Sampaio, D. A., Albuquerque, T., Vieira, L., & Caniça, M. (2016). Draft Genomic Analysis of an Avian Multidrug Resistant *Morganella morganii* Isolate Carrying qnrD1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01660>
- Luzzaro, F., Brigante, G., D'Andrea, M. M., Pini, B., Giani, T., Mantengoli, E., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. (2009). Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type β -lactamase: epidemiology and clinical management. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 328–333. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2008.09.007>
- Mehere, P., Han, Q., Lemkul, J. A., Vavricka, C. J., Robinson, H., Bevan, D. R., & Li, J. (2010). Tyrosine aminotransferase: biochemical and structural properties and molecular dynamics simulations. *Protein & cell*, 1(11), 1023. <https://doi.org/10.1007/S13238-010-0128-5>
- Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2021). Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics. *Scientific reports*, 11(1), 20859. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99873-x>
- Mobley, H. L., & Belas, R. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract.
- Mohd Kamal, K., Mahamad Maifiah, M. H., Abdul Rahim, N., Hashim, Y. Z. H. Y., Abdullah Sani, M. S., & Azizan, K. A. (2022). Bacterial Metabolomics: Sample Preparation Methods. *Içinde Biochemistry Research International (C. 2022)*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/9186536>
- Mooney, S., Leuendorf, J. E., Hendrickson, C., & Hellmann, H. (2009). Vitamin B6: A Long Known Compound of Surprising Complexity. *Molecules*, 14(1), 329. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES14010329>
- Muller, H. E. (1986). Occurrence and Pathogenic Role of *Morganella-Proteus-Providencia* Group Bacteria in Human Feces. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 404-405.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology*, 16(9), 373–378. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01214-1)
- Pagani, L., Migliavacca, R., Pallecchi, L., Matti, C., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., & Rossolini, G. M. (2002). Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1549–1552. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1549-1552.2002>

- Parra, M., Stahl, S., & Hellmann, H. (2018). Vitamin B6 and Its Role in Cell Metabolism and Physiology. *Cells* 2018, Vol. 7, Page 84, 7(7), 84. <https://doi.org/10.3390/CELLS7070084>
- Patel, S., & Ahmed, S. (2015). Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *İçinde Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (C. 107, ss. 63-74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.020>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *İçinde Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 13, Sayı 4, ss. 263-269). <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pease, A. J., Roa, B. R., Luo, W., & Winkler, M. E. (2002). Positive Growth Rate-Dependent Regulation of the *pdxA*, *ksgA*, and *pdxB* Genes of *Escherichia coli* K-12. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 184(5), 1359-1369. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1359-1369.2002>
- Pinu FR, Villas-Boas SG, Aggio R. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. *Metabolites*. 2017;7(4):53. Published 2017 Oct 23. doi:10.3390/metabo7040053
- Pitt, J. J. (2009). Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19. /pmc/articles/PMC2643089/
- Puebla-Barragan, S., Renaud, J., Sumarah, M., & Reid, G. (2020). Malodorous biogenic amines in *Escherichia coli*-caused urinary tract infections in women-a metabolomics approach. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-66662-X>
- Puls, J. S., Brajtenbach, D., Schneider, T., Kubitscheck, U., & Grein, F. (2023). Inhibition of peptidoglycan synthesis is sufficient for total arrest of staphylococcal cell division. *Science Advances*, 9(12), eade9023.
- Ramautar, R., Somsen, G. W., & de Jong, G. J. (2019). CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2016–2018. *Electrophoresis*, 40(1), 165. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201800323>
- Ramirez, T., Daneshian, M., Kamp, H., Bois, F. Y., Clench, M. R., Coen, M., Donley, B., Fischer, S. M., Ekman, D. R., Fabian, E., Guillou, C., Heuer, J., Hogberg, H. T., Jungnickel, H., Keun, H. C., Krennrich, G., Krupp, E., Luch, A., Noor, F., ... Leist, M. (2013). Metabolomics in toxicology and preclinical research. *Altex*, 30(2), 209-25. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.209>
- Rózalski, A., Sidorczyk, Z., & Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 61(1), 65-89. <https://doi.org/10.1128/.61.1.65-89.1997>

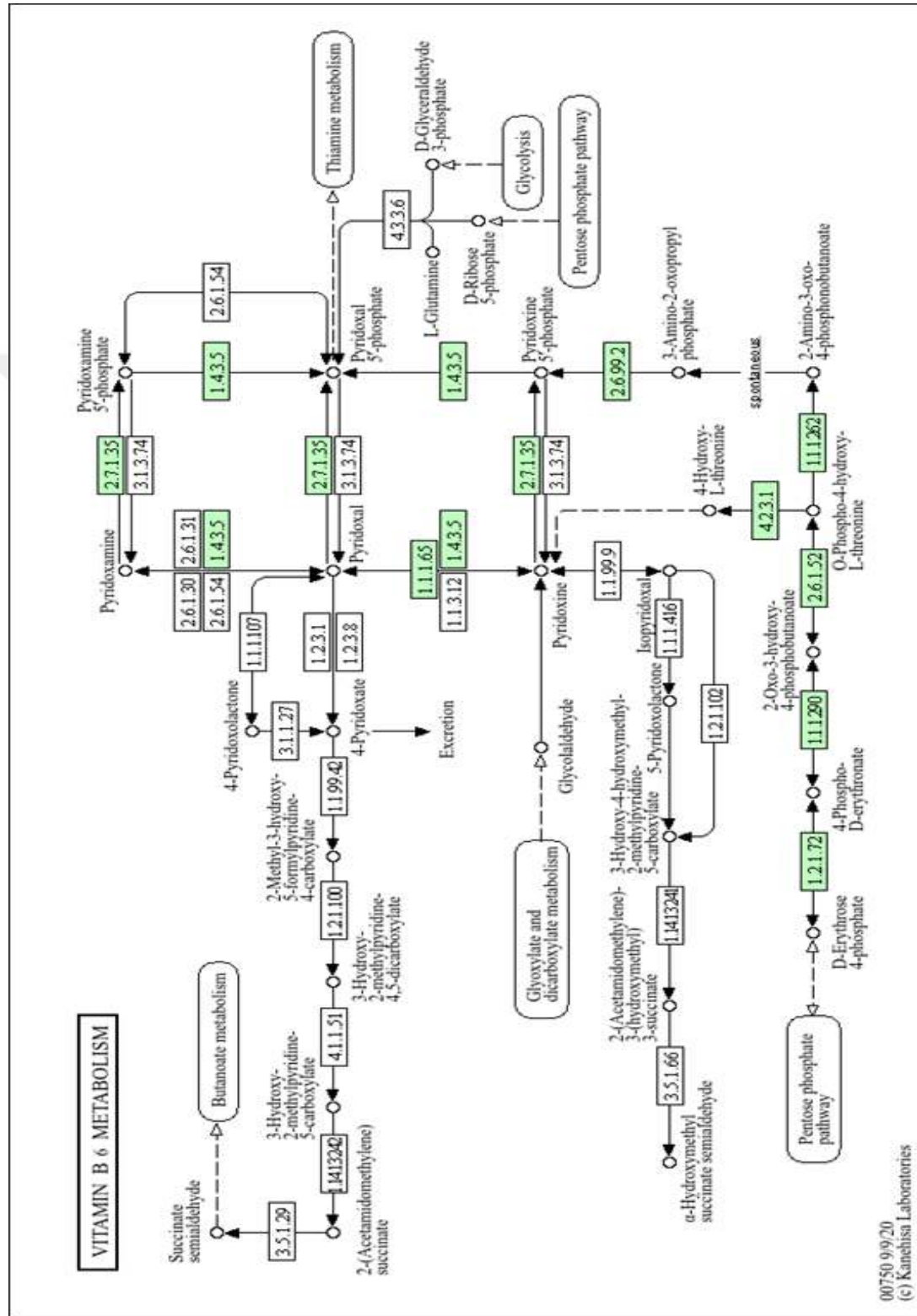
- Rosenberg, J., Ischebeck, T., & Commichau, F. M. (2017). Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnology Advances*, 35(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.11.004>
- Sakai, A., Kita, M., Katsuragi, T., Ogasawara, N., & Tani, Y. (2002). yaaD and yaaE are involved in vitamin B6 biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(3), 309–312. <https://doi.org/10.1263/jbb.93.309>
- Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M. F., & Wudy, S. A. (2013). Introduction to gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1065, 27–44. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0_3
- Schelli, K., Zhong, F., & Zhu, J. (2017). Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus aureus* metabolic response to different antibiotics. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1764–1774. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12839>
- Schwaiger-Haber, M., Stancliffe, E., Arends, V., Thyagarajan, B., Sindelar, M., & Patti, G. J. (2021). A Workflow to Perform Targeted Metabolomics at the Untargeted Scale on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *ACS measurement science*, 1(1), 35–45. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.1c00007>
- Segers, K., Declerck, S., Mangeling, D., Heyden, Y. Vander, & Eeckhaut, A. Van. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *İçinde Bioanalysis (C. 11, Sayı 24, ss. 2297-2318)*. Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0014>
- Shaaban, M., Elshaer, S. L., & Abd El-Rahman, O. A. (2022). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases, AmpC, and carbapenemases in *Proteus mirabilis* clinical isolates. *BMC microbiology*, 22(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02662-3>
- Spellberg, B., & Gilbert, D. N. (2014). The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu392>
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2021). Antibacterial drugs. Sykes, J. E. (Eds). In *Greene's infectious diseases of the dog and cat* (pp. 103-126). USA: WB Saunders
- Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., Fiori, B., Losito, A. R., D’Inzeo, T., Campana, L., Ruggeri, A., Di Meco, E., Liberto, E., Fadda, G., Cauda, R., & Spanu, T. (2012). Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* bloodstream infections: Risk factors and outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3224–3231. <https://doi.org/10.1128/AAC.05966-11/ASSET/5BA73088-E147-4FAB-88C5-029BC14C4266/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991009410002.JPEG>
- Tian, L., Gao, C., Lu, J., Liao, S., & Gong, G. (2024). Key biological processes and essential genes for *Proteus mirabilis* biofilm development inhibition by protocatechuic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 412, 110570. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2024.110570>

- Titiz, O., Tambasco-Studart, M., Warzych, E., Apel, K., Amrhein, N., Laloi, C., & Fitzpatrick, T. B. (2006). PDX1 is essential for vitamin B6 biosynthesis, development and stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 48(6), 933-946. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02928.X>
- Tramonti A, Nardella C, di Salvo ML, Barile A,D'Alessio F, de Crécy-Lagard V, Contestabile R. (2021). Knowns and Unknowns of Vitamin B6 Metabolism in *Escherichia coli*. 9:eESP-0004-2021. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2021>
- Wagner, S., Bernhardt, A., Leuendorf, J. E., Drewke, C., Lytovchenko, A., Mujahed, N., Gurgui, C., Frommer, W. B., Leistner, E., Fernie, A. R., & Hellmann, H. (2006). Analysis of the *Arabidopsis* *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis. *The Plant cell*, 18(7), 1722-1735. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.036269>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2018). Epigenomics technologies and applications. *Circulation Research*, 122(9), 1191-1199. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310998/FORMAT/EPUB>
- Weckwerth, W., & Morgenthal, K. (2005). Metabolomics: From pattern recognition to biological interpretation. *İçinde Drug Discovery Today* (C. 10, Sayı 22, ss. 1551-1558). [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03609-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03609-3)
- Weckwerth, Wolfram. (2007). *Metabolomics: methods and protocols*. Humana Press.
- Weissenbach J. (2016). The rise of genomics. *Comptes rendus biologies*, 339(7-8), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.05.002>
- Xiao, J. F., Zhou, B., & Ransom, H. W. (2012). Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends in analytical chemistry: TRAC*, 32, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.009>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst. *Current Protocols in Bioinformatics*, 34(1), 14.10.1-14.10.48. <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI1410S34>
- Zhang, A., Sun, H., Han, Y., Yuan, Y., Wang, P., Song, G., Yuan, X., Zhang, M., Xie, N., & Wang, X. (2012). Exploratory urinary metabolic biomarkers and pathways using UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition approach. *The Analyst*, 137(18), 4200–4208. <https://doi.org/10.1039/C2AN35780A>
- Zheng, H., Wang, C., Yu, X., Zheng, W., An, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, G., Qi, M., Lin, H., & Wang, F. (2024). The Role of Metabolomics and Microbiology in Urinary Tract Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 3134, 25(6), 3134. <https://doi.org/10.3390/IJMS25063134>

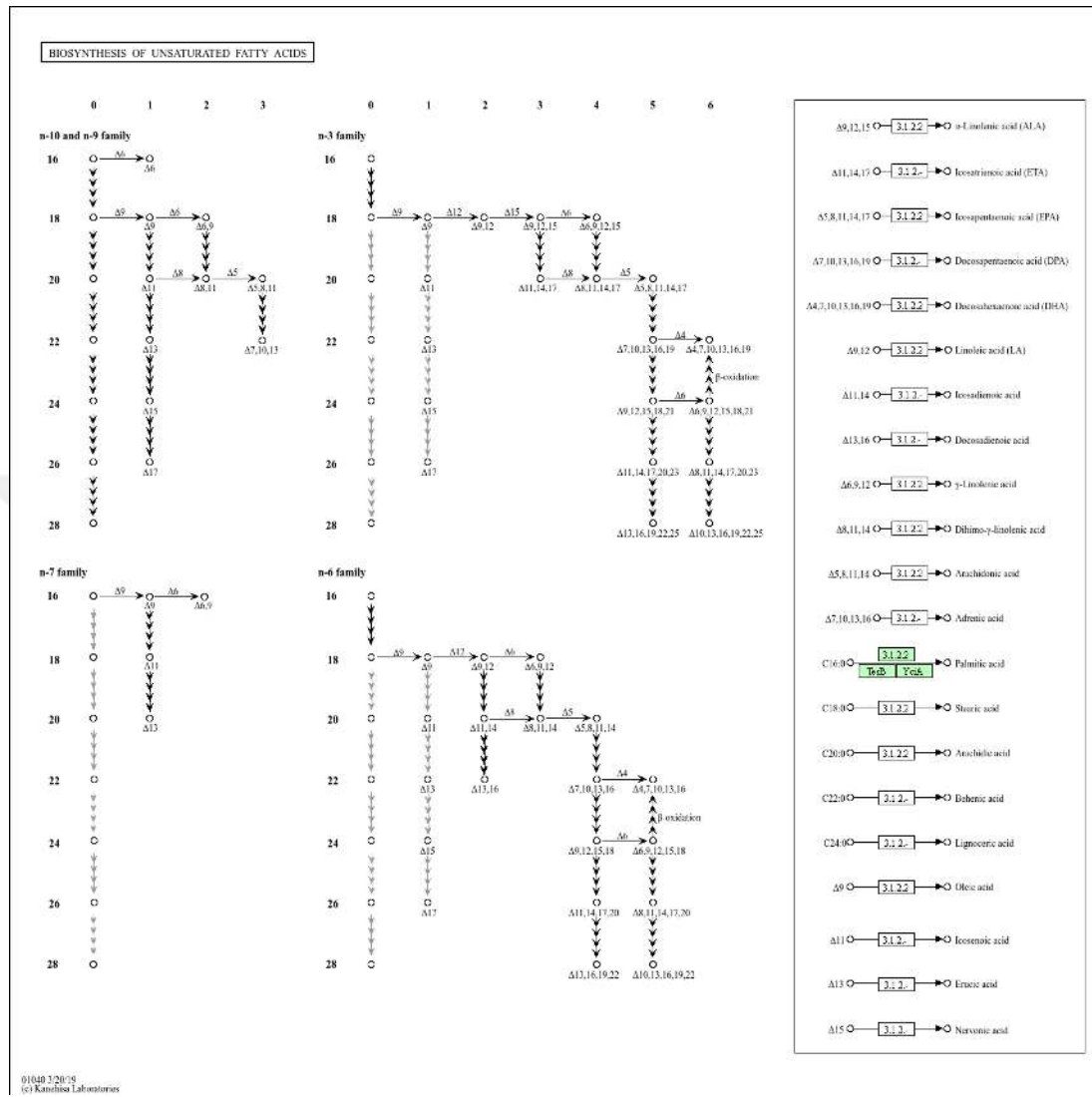


EKLER

Vitamin B6 Metabolizmasına Ait Yolak Haritası

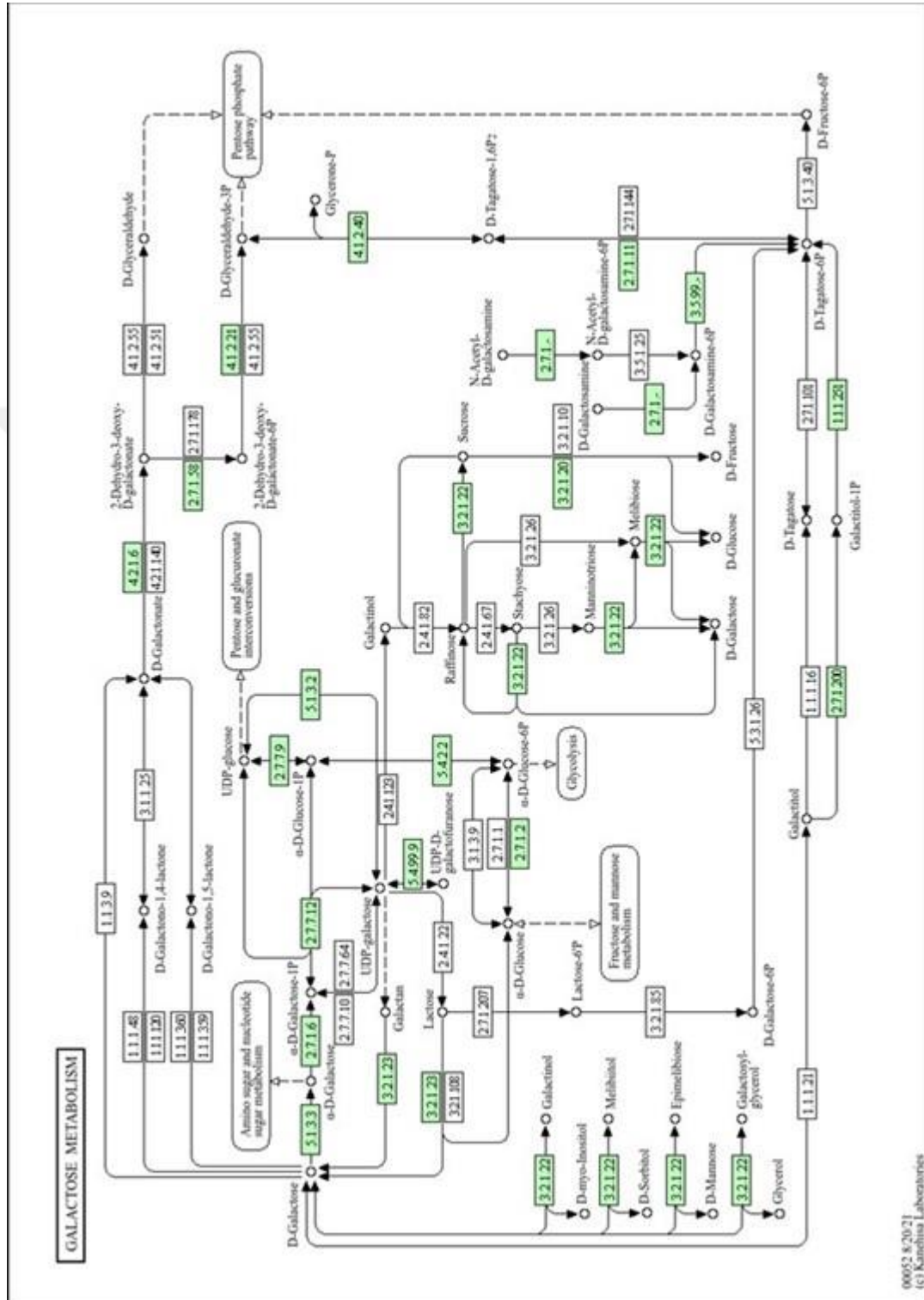


Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezine Ait Yolak Haritası



[illegible]

Galaktoz Metabolizmasına Ait Yolak Haritası



[illegible]

[illegible]