T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINA KARŞI ÇEŞİTLİ SİNNAMİKASİT TÜREVLERİ İLE KOLİSTİN KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alaaddin KORKUT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINA KARŞI ÇEŞİTLİ SİNNAMİK ASİT TÜREVLERİ İLE KOLİSTİN KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alaaddin KORKUT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINA KARŞI ÇEŞİTLİ SİNNAMİK ASİT TÜREVLERİ İLE KOLİSTİN KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alaaddin KORKUT

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2023-6236 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2024

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.07.2024-536

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINA KARŞI ÇEŞİTLİ SİNNAMİK ASİT TÜREVLERİ İLE KOLİSTİN KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alaaddin KORKUT

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 08/07/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE (Danışman)
Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ
Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Bu belge, güvenli elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5543&eD=BSCMZVZH3Z&eS=536 adresinden yapılabilir. (PIN:43703)

ÖZET

KOLİSTİN DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* SUŞLARINA KARŞI ÇEŞİTLİ SİNNAMİK ASİT TÜREVLERİ İLE KOLİSTİN KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alaaddin KORKUT

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE

Haziran 2024; 75 sayfa

Enfeksiyon hastalıkları geçmişten günümüze halk sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. Antibiyotiklerin keşfiyle birlikte bu sorunun kontrol altına alındığı düşünülse de gereksiz ve aşırı antibiyotik kullanımı antimikrobiyal direnç kavramını gündeme getirmiştir. Özellikle *Acinetobacter baumannii* gibi klinik açıdan ciddi öneme sahip patojenler arasında antibiyotik direncinin giderek yayılması, araştırmacıları, bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yeni antimikrobiyal ajanlar ve/veya yaklaşımlar geliştirmeye yönlendirmiştir.

Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ve kazanımı açısından muazzam özelliklere sahip olan *A. baumannii,* klinik açıdan yüksek öneme sahip nozokomiyal patojenlerinden biridir. Klinikte karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının artmasıyla birlikte, nefrotoksik ve nörotoksik etkileri nedeniyle kullanımı sınırlandırılan kolistin yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Fakat son yıllarda rapor edilen kolistin dirençli suşların artması nedeniyle, *A. baumannii* için yeni antimikrobiyallerin ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Antibiyotiklerin, mevcut diğer antibiyotiklerle veya diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine edilmesi, dirençli patojenlere karşı en çok tercih edilen stratejilerden biridir. Sekonder metabolitler yüksek antimikrobiyal aktiviteleri ve düşük toksik etkileri sayesinde, tek başlarında veya antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılabilecek önemli kaynaklardır. Sinnamik asitler, bitkiler aleminde doğal olarak bulunan bir grup aromatik karboksilik asittir. Düşük toksisitelerinin yanı sıra antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivite gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiplerdir.

Bu bilgilere dayanarak, çalışmamızda sinnamik asit türevlerinden *p*-kumarik asit (*p*-KA), ferulik asit (FA) ve *p*-metoksisinnamik asidin (*p*-MSA) kolitsin dirençli *A. baumannii*'lere (KOLR-Ab) karşı antimikrobiyal, antibiyofilm ve kolistin ile sinerjistik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin bakteriyel membran hasar potansiyelleri de değerlendirilmiştir.

Çalıştığımız tüm izolatların kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri 32-128 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. Bu değerler izole edilen tüm *A. baumannii* izolatlarının kolistin direncine sahip olduğunu göstermiştir. KOLR-Ab izolatlarına karşı *p*-KA (128-256 µg/mL), FA (512-1024 µg/mL) ve *p*-MSA'nın (128-512 µg/mL) güçlü antimikrobiyal etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Kolistin ile

bileşiklerin, KOLR-Ab4 izolatına karşı kolistin ve FA (FİKİ = 0.51) dışındaki tüm kombinasyonları sinerjistik etki göstermiştir. Kolistinin bileşiklerle kombinasyonu sonucunda, kolistin MİK değerleri 1 µg/mL ila 4 µg/mL seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. Bu dramatik düşüş çalışmada elde ettiğimiz en önemli sonuçlardan biridir. Nefrotoksik ve nörotoksik etkileri nedeniyle kullanımı sınırlandırılan bu antibiyotiğin düşük dozlarda güvenli kullanımı için umut vadedici bir sonuçtur.

A. baumannii'nin biyofilm oluşturma becerisi, bu bakterilerin hastane ortamlarındaki zorlu koşullar altında hayatta kalmalarına ve antibiyotik direncinin yayılımına katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda, KOLR-Ab izolatlarının biyofilm üretim kapasiteleri mikrotitrasyon plaka bazlı CV tekniğiyle belirlenmiş ve sonuçlara göre izolatlardan biri güçlü, üçü orta derecede ve diğer biri de zayıf biyofilm üretimi göstermiştir. Ardından güçlü ve orta derece biyofilm üretim kapasitesine sahip izolatlara karşı kolistin, *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm klinik izolatlara karşı maddelerin biyofilm oluşumunu yaklaşık %20 ila %70 oranında inhibe ettiği ortaya konmuştur.

Tüm bileşiklerin bakteri hücre membranında oluşturduğu hasarın tespiti amacıyla, bileşikler ile bakterinin muamele edilmesi sonucu elde edilen süpernatantın 260 nm'de absorbansı (sitoplazmadan salınan nükleik asit miktarı) ölçülmüştür. *p*-MSA'nın MİK/4 konsantrasyonu dışındaki diğer tüm ajanların membran hasarına katkı sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bileşiklerin antimikrobiyal etkilerinin; bakteriyal membranın hasarı ve hücresel içeriğin hücre dışına sızıntısıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının, kolistine dirençli *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisine yönelik daha ileri araştırmalara temel oluşturacağı öngörülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Acinetobacter baumannii*, Antimikrobiyal direnç, Kolistin, Ferulik asit, *p*-Kumarik asit, *p*-Metoksisinnamik asit

JÜRİ: Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF VARIOUS CINNAMIC ACID DERIVATIVES AND COLISTIN COMBINATIONS AGAINST COLISTIN-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS

Alaaddin KORKUT

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. ELİF ODABAŞ KÖSE

June 2024; 75 pages

Infectious diseases are one of the most important problems that threaten public health from past to present. Although it is thought that this problem has been taken under control with the discovery of antibiotics, unnecessary and excessive use of antibiotics has brought the concept of antimicrobial resistance to the agenda. The increasing spread of antibiotic resistance, especially among clinically serious pathogens such as *Acinetobacter baumannii*, has led to the development of new antimicrobial agents and/or approaches for the treatment of infectious diseases caused by these pathogens.

A. baumannii is one of the nosocomial pathogens of high clinical importance, which has tremendous characteristics in terms of development and acquisition of resistance to antibiotics. With the increase in carbapenem-resistant *A. baumannii* strains in the clinic, colistin, which was restricted due to its nephrotoxic and neurotoxic effects, has started to be used again. However, due to the increase in colistin resistant strains reported in recent years, it is very important to develop new antimicrobials and treatment approaches for *A. baumannii*.

Combining antibiotics with other available antibiotics or other antimicrobial agents is one of the most preferred strategies against resistant pathogens. Secondary metabolites are an important resource that can be used alone or in combination with antibiotics due to their high antimicrobial activity and low toxic effects. Cinnamic acids are a group of aromatic carboxylic acids found naturally in the plant kingdom. In addition to their low toxicity, they have a wide range of biological activities such as antimicrobial, antioxidant and anticancer activity.

Based on this information, we investigated the antimicrobial, antibiofilm and colistin synergistic activities of cinnamic acid derivatives *p*-coumaric acid (*p*-KA), ferulic acid (FA) and *p*-methoxycinnamic acid (*p*-MSA) against colistin-resistant *A. baumannii* (KOLR-Ab). The bacterial membrane damage potential of these compounds was also evaluated.

The colistin minimum inhibitory concentration (MIC) values of all the isolates we studied were determined in the range of 32-128 µg/mL. These values showed that all *A. baumannii* isolates had colistin resistance. It was determined that *p*-KA (128-256

μg/mL), FA (512-1024 μg/mL) and *p*-MSA (128-512 μg/mL) showed strong antimicrobial effects against KOLR-Ab isolates. All combinations of colistin and compounds showed synergistic effect against KOLR-Ab4 isolate except colistin and FA (FICI = 0.51). As a result of the combination of colistin with compounds, colistin MIC values decreased from 1 μg/mL to 4 μg/mL. This dramatic decrease is one of the most important results of the study. This is a promising result for the safety of this antibiotic whose use is restricted due to its nephrotoxic and neurotoxic effects.

The ability of *A. baumannii* to form biofilms contributes to the survival of these bacteria under extreme conditions in hospital environments and the spread of antibiotic resistance. In our study, the biofilm production capacities of KOLR-Ab isolates were determined by microtiter plate-based CV technique and according to the results, one isolate showed strong, three showed moderate and one showed weak biofilm production. Then, the antibiofilm activity of colistin, *p*-KA, FA and *p*-MSA against the isolates with strong and moderate biofilm production capacity was analysed. According to the results obtained, the compounds inhibited biofilm formation by approximately 20% to 70% against all clinical isolates.

In order to determine the damage caused by the compounds on the cell membrane, the absorbance of the supernatant at 260 nm (the amount of nucleic acid released from the cytoplasm) was measured. It was determined that all agents except the MIC/4 concentration of *p*-MSA contributed to membrane damage. Therefore, the antimicrobial effects of the compounds are thought to be related to the damage of the bacterial membrane and leakage of cellular contents out of the cell. The results of this study are expected to form the basis for further research on the treatment of infectious diseases caused by colistin-resistant *A. baumannii*.

KEYWORDS: *Acinetobacter baumannii*, Antimicrobial resistance, Colistin, Ferulic acid, *p*-Coumarik acid, *p*-Methoxycinnamic acid

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. ELİF ODABAŞ KÖSE

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

ÖNSÖZ

Yüzyıllar boyunca toplum sağlığını tehdit eden enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmek için antibiyotiklerin keşfi, ticarileştirilmesi ve rutin olarak kullanımı modern tıp için devrim niteliğinde bir adımdır. Antibiyotiklerin keşfi sadece enfeksiyon hastalıklarını kontrol altına almakla kalmamış; kemoterapi, invaziv cerrahi ve organ transplantasyonu gibi çok önemli tıbbi yaklaşımların geliştirilmesinin önünü açmıştır. Fakat yanlış ve aşrı antibiyotik kullanımı sonucunda 21. yüzyılın başlarında antibiyotik direnci kavramı ön plana çıkmıştır. Klinik açıdan önemli patojenler arasında antibiyotik direncinin giderek yaygınlaşması hem tıbbi hem de ekonomik açıdan küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Çoklu ve pundrag dirençli bakterilerinin de ortaya çıkması ve giderek artmasıyla nozokomiyal enfeksiyonlara bağlı ölüm sayıları endişe verici düzeyde artmıştır. Özellikle *Acinetobacter baumannii* gibi klinik açıdan ciddi öneme sahip patojenler arasında antibiyotik direncinin giderek yayılması, araştırmacıları, bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yeni antimikrobiyal ajanlar ve/veya yaklaşımlar geliştirmeye yönlendirmiştir.

Bu tez çalışmasında, sinnamik asit türevlerinden *p*-kumarik asit, ferulik asit ve *p*-metoksisinnamik asidin kolitsin dirençli *A. baumannii*'lere karşı antimikrobiyal, antibiyofilm ve kolistin ile sinerjistik aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların halk sağlığı açısından büyük tehdit oluşturan enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için çalışan tüm araştırmacılara değerli katkılar sağlayacağı ve yapılacak ileri çalışmalara bir basamak oluşturacağı umut etmekteyiz.

Yüksek lisans eğitimim boyunca karşıma çıkan birçok engelle mücadelemde yoluma ışık tutan, bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, bir aile sıcaklığında her daim yanımda olan, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Elif ODABAŞ KÖSE'ye (Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri) en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim sayın hocam Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) teşekkürü bir borç bilirim. Başta çok değerli arkadaşım Serap ÖZKAYA GÜL olmak üzere çalışmalarımda her zaman destek olan Moleküler Kanser Biyolojisi Laboratuvarı ekibine, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu ve Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün saygıdeğer öğretim üyelerine/görevlilerine çok teşekkür ederim.

İnsanın sahip olduğu en büyük değerin ailesi ve dostları olduğu söylenir. Çünkü koşulsuz ve şartsız size her zaman destek olan kişiler onlardır. Bu yolda her zaman yanımda olan gerek maddi gerek manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli dostlarım Mustafa MUSLU ve İrem KAYA MUSLU'ya teşekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca aldığım doğru ya da yanlış tüm kararlarda yanımda olan, her koşulda ve şartta beni destekleyen, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim; babam Hüseyin KORKUT'a, annem Adile KORKUT'a, ağabeyim Osman KORKUT'a, ablam Şefika TOPCU'ya ve diğer tüm aile üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje kodu: FYL-2023-6236) ve bursiyeri olduğum

TÜBİTAK 2210-A program kodlu Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ v
AKADEMİK BEYAN ix
SİMGELER VE KISALTMALAR x
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK TARAMASI 4
2.1. Enfeksiyon Hastalıkları 4
2.2. Antibiyotik Keşfinin Kısa Tarihi ve Altın Çağı 5
2.3. Antimikrobiyal Ajan Kaynakları 8
2.4. Antibiyotik Hedefleri ve Etki Mekanizmaları 9
2.4.1. Hücre membran geçirgenliğinin bozulması 10
2.4.2. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu 10
2.4.3. Protein sentezinin inhibisyonu 11
2.4.4. Metabolik yolakların inhibisyonu 12
2.4.5. DNA replikasyonunun inhibisyonu 13
2.4.5. Transkripsiyonun inhibisyonu 13
2.5. Antibiyotik Direnci 14
2.6. Antibiyotik Direncinin Moleküler Mekanizmaları 15
2.6.1. Antibiyotik molekülünün modifikasyonları 15
2.6.2. Antibiyotik molekülünün yıkımı 16
2.6.3. Azaltılmış antibiyotik penetrasyonu ve efluks pompaları 17
2.6.4. Hedef bölgenin korunumu, modifikasyonları ve baypas stratejileri 19
2.7. ESKAPE patojenleri 22
2.8. Antibiyotik Direncine Alternatif Arayışlar 22
2.9. Tıbbı Bitkiler ve Sekonder Metabolitler 24
2.10. *p*-Kumarik Asit 24
2.11. Ferulik Asit 26
2.12. *p*-Metoksisinnamik asit 27

2.13. *Acinetobacter* spp. 28
2.14. *Acinetobacter baumannii* 29
2.14.1 *A. baumannii*'nin klinik önemi 29
2.14.2. *A. baumannii*'de antibiyotik direnci 30
2.14.3. *A. baumanni*'de kolistin direnci 33
2.14.4. *A. baumannii* biyofilminin oluşumu ve antibiyotik direncine katkısı 37
3. MATERYAL VE METOT 39
3.1. Bakteri Suşları ve Kimyasalların Hazırlanması 39
3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Saptaması 39
3.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi 40
3.4. Biyofilm Üretiminin Tespiti 41
3.5. Antibiyofilm Aktivitenin Tayini 42
3.6. Hücre Membran Hasarının Ölçülmesi 43
3.7. İstatistiksel Analiz 43
4. BULGULAR 44
4.1 Maddelerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi 44
4.2. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi 45
4.3. Biyofilm Üretiminin Tespiti 46
4.4. Antibiyofilm Aktivite 47
4.5. Hücre Membran Hasarının Tespiti 52
5. TARTIŞMA 54
6. SONUÇLAR 60
7. KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Kolistin dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı çeşitli sinnamik asit türevleri ile kolistin kombinasyonlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin değerlendirilmesi" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2024

Alaaddin KORKUT

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µg : Mikrogram

µm : Mikrometre

L : Litre

mL : Mililitre

mg : Miligram

Da : Dalton

% : Yüzde

°C : Santigrat Derece

. : Ondalık ayracı

Kısaltmalar

5S rRNA 5S ribozomal RNA

16S rRNA : 16S ribozomal RNA

23S rRNA : 23S ribozomal RNA

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ACB : *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleksi

AME : Aminoglikozid modifiye edici enzimler

Ara4N : 4-amino-4-deoksi-l-arabinoz

Ca : Kalsiyum

CAMHB : Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth

CAT : Kloramfenikol asetiltransferazlar

ÇİD : Çoklu ilaç direnci

CV : Kristal viyole

DHF : Dihidrofolik asit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EPS : Hücre dışı polimerik madde

ESBL : Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz

FA : Ferulik asit

FİK : Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu

FİKİ : FİK indeksi

IS : İnsersiyon sekansı

K+ : Bakteriyel büyüme kontrolü

K- : Sterilite kontrolü ya da negatif kontrol

KOL : Kolistin

KOLR-Ab : Kolistin dirençli *A. baumannii*

KPC : *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz

LPS : Lipopolisakkarit

mcr : Mobilize kolistin direnci

Mg : Magnezyum

MGE : Mobil genetik elementler

MHB : Mueller Hinton Broth

MİK : Minimum inhibitör konsantrasyonu

$MİK_K$: Ajanın kombinasyonda aldığı MİK değeri

$MİK_T$: Ajanın tek başına MİK değeri

MRSA : Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

OMP : Dış membran proteinleri

p-KA : *p*-kumarik asit

p-MSA : *p*-metoksisinnamik asit

PABA : *p*-aminobenzoik asit

PBP : Penisilin bağlayıcı proteinler

PBS : Fosfat tamponu

PEtN : Fosfoetanolamin

PTC : Peptidil transferaz merkezi

QS : Quarum algılama

RNA : Ribonükleik asit

RNAP : RNA polimeraz

ROS : Reaktif oksijen türeleri

SSCmec : Stafilokok kromozom kaseti

THF : Tetrahidrofolik asit

VRE : Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*

YTÜ : Yoğun bakım ünitesi

Zn : Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ABD'de 1990-1997 yılları arasında, hastalıklarla ilişkili ölüm oranları 4

Şekil 2.2. Antibiyotiklerle ilişkili keşiflerin zaman çizelgesi 6

Şekil 2.3. Faklı kaynaklardan elde edilen antibiyotiklerin etkinlik-toksisite ilişkisi 9

Şekil 2.4. Antibiyotik hedefleri ve etki mekanizmaları 9

Şekil 2.5. Gram-pozitif ve gram-negatif bakteri hücre membranlarının şematik diyagramı 10

Şekil 2.6. Ribozomun 30S alt biriminin inhibisyonu 12

Şekil 2.7. Topoizomerazlar ve kinolon grubu antibiyotiklerin etki mekanizması 13

Şekil 2.8. Antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizmaları 15

Şekil 2.9. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde bulunan farklı tipteki beş ana efluks transport ailesinin temsili 18

Şekil 2.10. Hedef bölgenin modifikasyonu yoluyla antibiyotik direnci 20

Şekil 2.11. Alternatif antimikrobiyal tedavi kaynakları 23

Şekil 2.12. *p*-kumarik asidin yapısı 25

Şekil 2.13. Ferulik asidin yapısı 27

Şekil 2.14. *p*-metoksisinnamik asidin yapısı 28

Şekil 2.15. Polimiksinlerin yapısı ve etki mekanizmaları 33

Şekil 2.2. Kolistin etki mekanizması ve direncinin moleküler temelleri 34

Şekil 3.1. Test edilecek maddeler için belirlenen konsantrasyon aralıkları 40

Şekil 3.2. Dama tahtası sinerji testi 41

Şekil 4.1. KOLR-Ab izolatlarının biyofilm üretim kapasiteleri 47

Şekil 4.2. Maddelerin KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi 48

Şekil 4.3. Maddelerin KOLR-Ab3 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi 49

Şekil 4.4. Maddelerin KOLR-Ab4 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi 50

Şekil 4.5. Maddelerin KOLR-Ab5 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi 52

Şekil 4.6. KOLR-Ab4 suşuna karşı tüm ajanların MİK, MİK/2 ve MİK/4 değerlerindeki konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerleri..... 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Sıvı mikrodilüsyon testleri sonucunda elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları 44

Çizelge 4.2. KOL + *p*-KA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları 45

Çizelge 4.3. KOL + FA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları 45

Çizelge 4.4. KOL + *p*-MSA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları ... 46

1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları yüzyıllar boyunca halk sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. Son 50 ila 100 bin yıl içerisinde insan nüfusunun artışıyla beraber iklim değişikliği ve biyoçeşitliliğin azalması gibi insanoğlunun çevre üzerindeki küresel etkileri artmış ve sonuç olarak bu durum bulaşıcı hastalıkların da artış göstermesine neden olmuştur (McMichael 2004). 20. yüzyılın başlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın ölüm nedenleri tüberküloz, pnömoni ve diyareyken, 20. yüzyılın sonunda ise tüm bunların yerini kalp hastalıkları ve kanser gibi kronik hastalıklar almıştır. Enfeksiyon hastalıklarının büyük ölçüde kontrol altına alınmasının en önemli nedeni antibiyotiklerin keşfi olmuştur (Cohen 2000).

1940'lı yıllarda penisilin kullanımının yaygınlaşmasıyla beraber antibiyotik altın çağı başlamış ve antibiyotik keşifleri giderek hız kazanmıştır. Günümüzde klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu altın çağda keşfedilmiş veya geliştirilmiştir (Lewis 2012). Ayrıca antibiyotiklerin keşfi ve rutin olarak kullanımı sadece enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için değil kemoterapi, yoğum bakım üniteleri, invaziv cerrahi ve organ transplantasyonu gibi yüksek risk arz eden alanların güvenliği için de gereklidir (Cook ve Wright 2022).

Temel olarak antibiyotikler ve antimikrobiyal ajanlar; mikroorganizmaları öldüren veya çoğalmalarını inhibe eden, doğal, sentetik ya da yarı sentetik bileşiklerdir (Barzic ve Ioan 2015). Bu ajanlar mikroorganizmaların yaşamını devam ettirmelerini sağlayan; hücre duvarı sentezi, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon gibi kritik süreçleri ve metabolik yolakları inhibe ederek ya da hücre membran permeabilitesini bozarak işlev görmektedir (Blair vd. 2014; Kapoor vd. 2017). Son yıllarda aşırı, gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımı nedeniyle ön plana çıkan "antimikrobiyal direnç" kavramı enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan morbidite ve mortalite oranlarının tekrardan artmasına neden olmuştur. Bu nedenle birçok hükümet Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) etkili ilaç ve antimikrobiyallerin araştırılmasına destek olmak amacıyla antibiyotik direnci hakkında bir rapor oluşturmasını talep etmiştir (Tacconelli vd. 2018).

Antimikrobiyal direncinin moleküler temelleri incelendiğinde aslında bunun bakteriyel evrim ve adaptasyonun bir sonucu olduğu anlaşılmaktadır. Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmaların çevresel toksinlere ve diğer mikroorganizmalara karşı bir savunma mekanizmasıdır (Blair vd. 2014; Darby vd. 2023; Munita ve Arias 2016). Zaten mikroorganizmalar bu bileşiklere karşı milyonlarca yıldır direnç geliştirmektedir. Ayrıca sıklıkla kullanılan mevcut antibiyotiklerin bakteriyal veya fungal kökenli olması nedeniyle bu antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direncin varlığı şaşırtıcı değildir (Yeh vd. 2020). Genellikle mekanizma antimikrobiyal ajanın veya antibiyotiğin etki mekanizmalarıyla ilişkili hedeflerde meydana gelen çeşitli modifikasyonlar veya bu hedeflerin çeşitli yollarla korunumu sonucu ortaya çıkmaktadır (Munita ve Arias 2016). Asıl sorun bu direnç paternlerinin klinik açıdan tehlikeli patojenlere aktarılması ve bu patojenler arasında yayılmasıdır. Bu direnç paternlerini kodlayan yabancı DNA yatay gen transferiyle patojen mikroorganizmalara aktarılmaktadır (Holmes vd. 2016). Gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımı sonucunda da antimikrobiyal direnç popülasyonda baskın hale gelmektedir. Böylece dirençli patojenler halk sağlığını tehdit eden ciddi enfeksiyon hastalıklarının yeniden ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Baym

vd. 2016). İlk başlarda tek bir antibiyotiğe karşı direnç geliştiren patojenler, günümüzde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direncine (ÇİD) sahip olabilmektedir. En yaygın görülen ve tedavisi zor olan ÇİD mikroorganizmalar arasında metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE), genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL) üreten *Escherichia coli* ve çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* yer almaktadır (Nithya vd. 2017).

Gram negatif bir bakteri olan *A. baumannnii*; cerrahi alan enfeksiyonları, bakteriyemi, ventilatör kaynaklı pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonları gibi nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan inatçı bir patojendir (Eliopoulos vd. 2008; Peleg vd. 2008). *A. baumannii* 1970'lerde düşük virülanslı bir patojen olarak tanımlanmış fakat son yıllarda artan antibiyotik ve invaziv tanı/tedavi yöntemlerinin kullanımıyla çoklu ilaç direnci kazanmıştır. Bu durum *A. baumannii* enfeksiyonlarının sıklığında ve şiddetinde bir artışa yol açmıştır (Wong vd. 2017). *A. baumannii* güçlü biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde tıbbi cihazlar ve yoğun bakım üniteleri gibi hastane ortamlarında uzun süre hayatta kalma konusunda oldukça başarılıdır. Sahip olduğu biyofilm oluşturma becerileri ve genetik plastisitesi sayesinde antibiyotiklerin birçoğuna karşı direnç geliştirme ve bu direnç paternlerini hastane ortamlarında yayma konusunda muazzam yetenekli bir patojendir (Kyriakidis vd. 2021; Pakharukova vd. 2018). Böylelikle ÇİD *A. baumannii*'den kaynaklanan enfeksiyonların tedavisi oldukça güçleşmektedir (Peleg vd. 2008). *A. baumannii*'ye karşı kullanılan son tedavi seçeneklerinden birisi karbapenem grubu antibiyotiklerdir. Fakat son yıllarda tespit edilen karbapenem dirençli izolatların hızla artmasıyla birlikte 2017 yılında DSÖ tarafından yayınlanan raporda karbapenem dirençli *A. baumannii* "yeni antibiyotik araştırmaları için öncelik 1" grubunda sınıflandırılan "kritik" bir patojen olarak tanımlanmıştır (Da Silva ve Domingues 2017).

Karbapenem dirençli *A. baumannii*'lerin de tespit edilmesiyle birlikte, bu patojenle mücadele için 1980'li yıllarda nefrotoksik ve nörotoksik etkilerinden dolayı kullanımı durdurulan kolistin "son çare" olarak yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Kolistin çoğu gram-negatif bakteriye karşı etkili olan bir katyonik antimikrobiyal peptittir (Cai vd. 2012; Li vd. 2006). Polikatyonik özelliği sayesinde bakterilerde bulunan negatif yüklü lipid A moleküleriyle elektrostatik etkileşime girerek LPS stabilizasyonunu bozmaktadır. Böylelikle dış membran permeabilitesi azalmaktadır. Ardından kolistin iç membrana nüfuz ederek hücre içeriğinin dışarıya sızmasına neden olur ve hücre ölüme sürüklenir (Aghapour vd. 2019; Bialvaei ve Samadi Kafil 2015). Fakat kolistinin yeniden kullanımıyla birlikte son on yılda rapor edilen kolistin dirençli suşların sayısı da artış göstermektedir (Da Silva ve Domingues 2017). Kolistin direnci genellikle lipid A modifikasyonları, LPS kaybı veya efluks pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu gibi birkaç mekanizma ile ortaya çıkmaktadır (Hamel vd. 2021). Günümüzde bu patojenin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde kolistinin artan kullanımı nedeniyle direnç patojenler arasında hızla yayılmaktadır. Dolayısıyla bu patojenin neden olduğu enfeksiyonlara karşı yeni antimikrobiyal ajanlara ve/veya stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Trebosc vd. 2019).

Antimikrobiyal direncin giderek artması ve yaygınlaşmasıyla beraber bilim camiası antimikrobiyal dirence karşı alternatif arayışlara yönelmiştir. Bunların arasında, geniş sekonder metabolit içeriğine sahip tıbbi bitkiler, hedef spesifik antikorlar,

oligonükleotitler ve gen terapi sistemleri, bakteriyofajlar (modifiye fajlar ve lizinler), antimikrobiyal peptitler, mikrobiyotayı güçlendiren probiyotikler ve fekal transplantasyon tedavisi gibi birçok alternatif strateji yer almaktadır (Allen vd. 2014; M. Kumar vd. 2021).

Bitki ekstraktları ve uçucu yağlar, düşük toksisite ve geniş antimikrobiyal etki spektrumu nedeniyle alternatif stratejiler arasında en çok üzerinde durulan antimikrobiyal kaynaklardandır. Gelişmekte olan ülkelerin %80'inde çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla tıbbi bitkilerden elde edilen geleneksel ilaçların kullanıldığı bildirilmiştir. Antimikrobiyal etkinliği tespit edilen 1340'tan fazla tıbbi bitkiden yaklaşık 30 binin üzerinde antimikrobiyal bileşik izole edilmiştir. Aslında izole edilen fenolikler, terpenler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler bitkilerin kendilerinin patojenlerden korumak amacıyla sentezlediği fitokimyasal bileşiklerdir. Terapötik amaçlı bu fitokimyasalların kullanılmasının en dikkat çekici avantajı sentetik kimyasal kaynaklı yan etkilerinin olmaması ve çoklu antimikrobiyal etki mekanizmaları sayesinde patojenlerin direnç geliştirmesinin zor olmasıdır. Antibiyotik direnci sorununa çözüm olarak bu biyoaktif maddeler, antimikrobiyal aktiviteyi arttırmak amacıyla, tek başına veya antibiyotiklerle kombine halinde değerlendirilebilmektedir.

Bitki sekonder metabolitlerinin fenolik asitler sınıfında yer alan sinnamik asitler bir grup aromatik karboksilik asittir (Ruwizhi ve Aderibigbe 2020). Yapısında bulunan bir benzen halkası ve kısa doymamış hidrokarbon zinciri nedeniyle polaritesi ve suda çözünürlüğü düşüktür (Sova 2012). Bu sekonder metabolitler bitki büyümesinde, gelişmesinde, üremesinde ve çevresel strese karşı önemli fizyolojik rollere sahiptir (Ververidis vd. 2007). Yapılan çalışmalar sinnamik asit ve türevlerinin antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, antienflamatuvar ve antidiyabetik özellikleri olduğunu göstermektedir (Ruwizhi ve Aderibigbe 2020).

Sinnamik asitler içerisinde yer alan *p*-kumarik asit (*p*-KA), ferulik asit (FA), *p*-metoksisinnamik asidin (*p*-MSA) yapılan birçok çalışmada antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite açısından etkili olduğu gösterilmiştir (Ibitoye ve Ajiboye 2019; Nakazono vd. 2005; Narasimhan vd. 2004). Bileşiklerin antimikrobiyal etkisinin, hidrofobik karakterleri nedeniyle membran üzerinde geri dönüşü olmayan değişikliklere sebep olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lou vd. 2012). Ayrıca bazı efluks pompaları üzerinde de inhibitör etki gösterdikleri moleküler kenetleme çalışmalarıyla gösterilmiştir (Choudhury vd. 2016). Bu bileşiklerin antimikrobiyal özelliklerinin dışında antioksidan, nöroprotektif, anti-kanser ve anti-diyabetik etkileri de olduğu bilinmektedir (Kheiry vd. 2019; Ou ve Kwok 2004; Płowuszyńska ve Gliszczyńska, 2021).

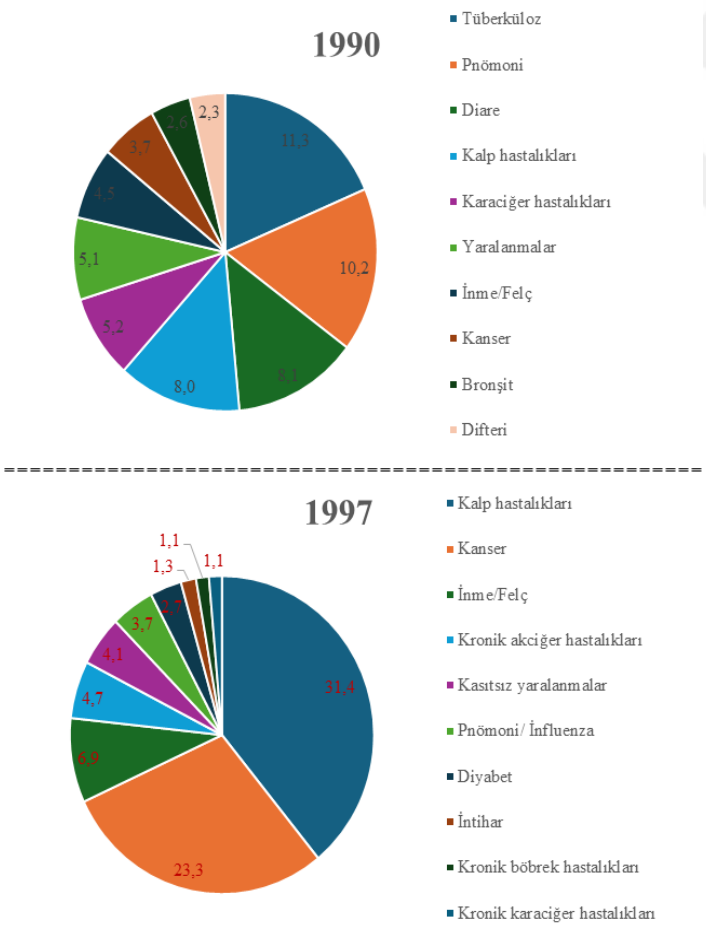
Yapılan bu tez çalışmasında, çeşitli hasta örneklerinden izole edilen 5 adet kolistin dirençli *A. baumannii* suşuna karşı çeşitli sinnamik asit türevlerinin (*p*-KA, FA ve *p*-MSA) tek başlarına ve kolistin ile kombine edilerek antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca test edilen sinnamik asit türevlerinin *A. baumannii* üzerindeki membran hasar potansiyellerinin de belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Enfeksiyon Hastalıkları

Enfeksiyon hastalıkları; enfekte bir kişiden veya hayvandan ya da kontamine olmuş bir nesneden bulaşan bir patojen veya toksik ürünün duyarlı bir konağa aktarılmasıyla oluşan hastalıklar olarak tanımlanabilir (van Seventer ve Hochberg 2017). Son 50-100 bin yılda insan nüfusunun yayılma isteği, canlı ve cansız dünya ile yaşadığı etkileşimler, nüfuslar arası yaşanan temaslar ve çatışmalar, yeni enfeksiyon hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (McMichael 2004).

Yirminci yüzyılın ortalarına kadar bulaşıcı hastalıklar dünya çapında önde gelen ölüm nedeniydi. 1900'lü yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok ölüme neden olan hastalıklar içerisinde ilk üç sırada (tüberküloz, pnömoni ve diyare) yer alan enfeksiyon hastalıkları ölümlerin %30'undan sorumluydu (Şekil 2.1). Ayrıca enfeksiyon hastalıkları bebek ve çocuk ölümlerinin yüksek oranda nedeniydi. O yıllarda enfeksiyon hastalıklarından kaynaklı ortalama yaşam süresi 47 yıl olarak belirlenmiştir (Cohen 2000).



Şekil 2.1. ABD'de 1990-1997 yılları arasında, hastalıklarla ilişkili ölüm oranları (Cohen 2000)

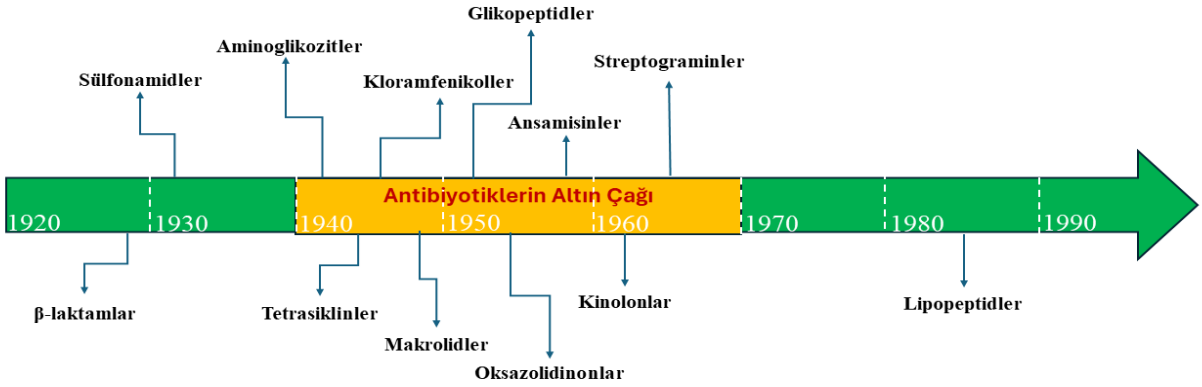
1928 yılında penisilinin keşfi ve 1940'lı yıllarda kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte antibiyotik keşfinin "Altın Çağı" başlamış ve enfeksiyona bağlı ölümlerin yüzdesi belirgin bir şekilde düşüş göstermiştir (Hutchings vd. 2019). ABD'de pnömoniye bağlı ölüm oranları yaklaşık %30, ağır enfeksiyonlardan (bakteriyel menenjit ve endokardit) kaynaklı ölüm oranları ise %60-75 oranında azalmıştır (Luepke vd. 2017). 20. yüzyılın sonlarına doğru ölüm oranları açısından ilk üç sırada yer alan enfeksiyon hastalıklarının yerini; kalp hastalıkları, kanser ve akciğer hastalıkları gibi kronik hastalıklar devralmıştır (Cohen 2000) (Şekil 2.1).

Ayrıca antibiyotiklerin sunduğu güvenilir enfeksiyon kontrolü kemoterapi uygulamalarından organ nakillerine, yoğum bakım ünitelerinden karmaşık ameliyatlara kadar tıpta kaydedilen pek çok değerli uygulamanın temelini oluşturmuştur (Cook ve Wright, 2022). Buna bağlı olarak da dünya genelinde yaşam süreleri bir yüzyıldan daha kısa bir sürede ortalama 23 yıl uzamıştır (van Seventer ve Hochberg 2017).

2.2. Antibiyotik Keşfinin Kısa Tarihi ve Altın Çağı

Antibiyotik altın çağı, birçok antimikrobiyal/antibakteriyel ilaç spektrumunun keşfedilmesiyle birlikte neredeyse tüm bakteriyel enfeksiyonların antibiyotikler tarafından tedavi edilebildiğinin ve bu hastalıkların artık tamamen tarihe karıştığının düşünüldüğü bir dönemdir (Bbosa vd. 2014). 1940'lardan itibaren penisilinin klinikte kullanımının onaylanmasıyla birlikte antibiyotik keşfi açısından "Altın Çağ" başlamıştır. Fakat sanılanın aksine keşfedilen ve kullanılan ilk antimikrobiyal ajan penisilin değildir. 2000 yıldan daha uzun süre önce Çin, Mısır ve Yunanistan'da, insanlar açık yaraların ve çeşitli hastalıkların tedavisi için antibiyotik üreten mikroorganizmalar içeren küflü ekmek ve şifalı toprak gibi çeşitli ürünleri kullanmışlardır (Aminov 2010; Hutchings vd. 2019). Diğer taraftan günümüzde sıklıkla kullanılan bir antibiyotik olan tetrasiklinin izlerine, Sudan, Nubia'da bulunan, tahminen MS 350-550 yıllarında yaşamış insan iskeleti kalıntılarında ve benzer şekilde Mısır'daki Dakhleh Vahası'nda bulunan geç Roma dönemi iskeletlerinde rastlanmıştır. Antik dönem iskeletlerinde tetrasikline rastlamak tesadüf değildir çünkü o dönemlerde yaşayan insanların diyetlerinde tetrasiklin içeren maddelere maruz kaldıkları düşünülmektedir. Dolayısıyla enfeksiyon hastalıklarıyla mücadele sadece son 100-150 yılda değil antik çağlardan günümüze kadar süregelmiştir ve eski insanlar çeşitli kaynaklardan elde ettikleri antimikrobiyal ürünleri kullanmışlardır (Aminov 2010; Nelson vd. 2010).

1900 yılında Paul Ehrlich, patojenlere zarar veren fakat konakçıya zarar vermeyen ilaçlar/kimyasallar için 'sihirli mermi' kavramını ortaya atmıştır (Wenzel 2020). Bu kavramla birlikte 1904 yılında, frengi etkeni *Treponema pallidum*'u tedavi etmek için büyük ölçekli ve sistematik bir tarama programı başlatmıştır. Bu program ilaç endüstrisinde günümüzde bile geçerliliği olan ilaç arama stratejilerinin temel taşı haline gelmiş ve antimikrobiyal ilaçlar da dahil olmak üzere binlerce ilacın tanımlanmasını ve klinik uygulamaya aktarılmasını sağlamıştır (Aminov 2010; Lewis 2012). İlk başarılı sihirli mermi, Paul Ehrlich ve ekibi tarafından keşfedilen, arsenik bazlı bir antimikrobiyal ajan olan arsfenamin, bir diğer adıyla salvarsandır. Salvarsan, 1910 yılında piyasaya sunulan ve klinikte kullanılan ilk sentetik antimikrobiyal ajan olarak bilinmektedir (Williams 2009).



Şekil 2.2. Antibiyotiklerle ilişkili keşiflerin zaman çizelgesi (Lewis 2012)

Erlich'in sistematik tarama programından ilham alan Gerhard Domagk da çeşitli azo bileşiklerini streptokoklarla enfekte edilmiş fareler üzerinde denemiş ve umut vadedici sonuçlar elde etmiştir (Ribeiro da Cunha vd. 2019). Domagk, 1932 yılında Josef Klarer ve Fritz Mietzsch isimli kimyagerler tarafından sentezlenen Prontosil'i ilk olarak streptokoklarla enfekte fareler üzerinde test etmiştir. Daha sonra kendi kızı da dahil olmak üzere çeşitli klinik vakalar üzerinde ilacı deneyerek çalışmalar yapmıştır (Christensen 2021; Domagk 1935). 1935 yılında piyasaya sunulan prontosil, kısa sürede "mucize ilaç" olarak kabul edilmiştir. Prontosil, boya endüstrisinde yaygın kullanılan, sentezlenmesi kolay ve maaliyeti düşük bir molekül olan sülfanilamidin prekürsörüdür (Aminov 2010; Apaydın ve Török 2019). İlerleyen yıllarda birçok şirket sülfonamid türevlerinin seri üretimine başlamış ve sülfa ilaçları olarak bilinen 5000'den fazla bileşik sentezlenmiştir (Ribeiro da Cunha vd. 2019). Bu ilaçların piyasaya girmesi streptokoklarla ilişkili menenjit, pnömoni, septisemi ve idrar yolu enfeksiyonları gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynamıştır (Christensen 2021).

Alexander Fleming'in 1928 yılında tesadüf eseri penisilini keşfetmesiyle birlikte antimikrobiyal tedavi kavramı bir devrin başlangıcı olmuştur. Penisilin, *Penicillium* spp.' den elde edilen doğal bir antibiyotiktir. Fleming bir tatil sırasında laboratuvarda bıraktığı *Staphylococcus* spp. plakalarının *Penicillium* spp. sporları tarafından kontamine olduğunu fark etmiş ve kontamine plakalar üzerindeki küf kolonilerinin çevresinde oluşan inhibisyon bölgelerini inceleyerek bu kolonilerin antimikrobiyal ajanlar ürettiği sonucuna ulaşmıştır (Fleming 1980). Aslında *Penicillium*'un antimikrobiyal aktivitesi zaman zaman birçok araştırmacının dikkatini çekmiş fakat Fleming'in üstün çabaları ve inancı penisilinin ortaya çıkışında etkili olmuştur. Fleming, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve disk difüzyon metodu gibi günümüzde de kullanılan duyarlılık testlerinin atası olan "ditch plate" metodunu geliştirmiştir. Bu metot, agar plakalarına açılan kanallara eklenen antimikrobiyal ajanların, plaka üzerine ekilen bakteriler üzerinde oluşturdukları inhibisyon bölgelerinin belirlenmesi esasına dayanan bir tarama yöntemidir. Böylelikle bu test, birçok antimikrobiyal ajanın ve antibiyotik üreten mikroorganizmanın belirlenmesi için toplu taramalar yapılabilmesine imkan sağlamıştır (Başustaoğlu vd. 2020; Zaffiri vd. 2012).

Fleming tüm çabalarına rağmen penisilini saflaştırmayı başaramamış ve 1940 yılında bu fikrinden vazgeçmiştir. Fakat aynı yıl Oxford'dan Howard Florey ve Ernest Chain liderliğindeki bir ekip klinik çalışmalarda kullanılacak kadar penisilini saflaştırmayı başarmıştır (Aminov 2010; Chain vd. 2005) ve 1941 yılında ilk kez bir insan üzerinde penisilini test etmişlerdir. 1943 yılında, İkinci Dünya Savaşı sırasında yaralanan askerlerin tedavisi amaçlı yoğun olarak antibiyotiğe ihtiyaç duyulmuş ve bu amaçla geniş ölçekte penisilin üretimi gerçekleştirilerek 1945 yılına kadar yaygın olarak kullanılmıştır (Aminov 2010; Başustaoğlu vd. 2020; Ribeiro da Cunha vd. 2019).

Antibiyotik tarihindeki en önemli dönüm noktalarından bir diğeri ise Selman Waksman'ın ortaya koyduğu "Waksman Platformu" ve ilk aminoglikozid grubu antibiyotik olan streptomisinin keşfidir. 1937 yılında Waksman, topraktan izole edilen aktinomisetlerin diğer bakterilerin büyümesini inhibe ettiğini fark etmiştir (Nicolaou ve Rigol 2018). Waksman, bakteriler arasındaki bu rekabetin oluşturduğu biyolojik mekanizmaları belirleyerek, antibiyotik üreten organizmaların tespiti için kavramsal bir tarama platformu oluşturmuştur (Lewis 2012; Woodruff 2014). Waksman, ortaya koyduğu bu metodoloji sayesinde farklı aktinomiset türlerinin neredeyse yarısının mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkilere sahip olduğunu tespit etmiştir. Günümüzde klinikte kullanılan antibiyotiklerin %90'ından fazlası aktinomisetlerden elde edilen antibiyotiklerden türetilmiştir (Ribeiro da Cunha vd. 2019). Bunların içerisinde sıklıkla karşılaştığımız eritromisin, gentamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler yer almaktadır. Bunların içinde en çok bilineni, 1944 yılında bir *Streptomyces griseus* suşundan elde edilen streptomisindir. Streptomisinin klinikte kullanımından önceki dönemin en büyük sorunlarından birisi, *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu tüberküloz hastalığıydı (Ribeiro da Cunha vd. 2019; Zaffiri vd. 2012). Penisilin, gram-pozitif bakterilere karşı etkili olmasına rağmen Gram negatiflere karşı etkili değildir. Streptomisin ise birçok Gram negatif bakteriye ve *M. tuberculosis*'e karşı güçlü antimikrobiyal etki göstererek, özellikle tüberküloz tedavisinde potansiyel bir ajan olmuştur (Nicolaou ve Rigol 2018; Zaffiri vd., 2012). Klinik denemelerde elde edilen başarılı sonuçların ardından 1946'da streptomisinin geniş klinik kullanımına onay verilmiştir. Streptomisinin tüberküloz tedavisinde güçlü bir ilaç olarak başarı göstermesi, 1952 yılında Waksman'a bu keşfinden dolayı Nobel Fizyoloji veya Tıp ödülünü kazandırmıştır (Woodruff 2014).

Antibiyotiklerin altın çağı penisilinin üretimiyle (1941) başlayıp nalidiksik asidin (1962) keşfine kadar sürdüğü düşünülse de sentetik olarak yeni antimikrobiyallerin keşfiyle bu süre 1990'lı yıllara kadar uzanmaktadır. Bu 20 yıllık sürede, mevcut antibiyotiklerin antimikrobiyal spektrumunu güçlendirmek amacıyla, varolan antibiyotikler üzerinde yapılan çeşitli kimyasal modifikasyonlarla, farklı nesil ve farklı etki mekanizmalarına sahip yarı sentetik veya sentetik birçok antibiyotik üretilmiştir (Bbosa vd. 2014).

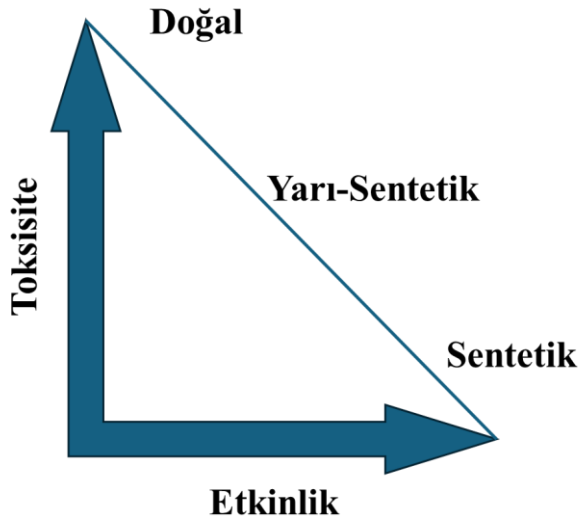
Wakman platformu gibi çeşitli "Antibiyotik Keşif Platformlarının (Antibiotic Discovery Platforms)" oluşturularak, çalışmaların sistematik prosedürlerle gerçekleştirilmesi günümüzde kullanılan birçok antibiyotiğin keşfi açısından en önemli etkenlerden biridir (Ribeiro da Cunha vd. 2019). Ancak her ne kadar bu gelişmeler, farklı bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için geniş skalada bir antibiyotik rezervuarı oluşturulmasını sağlamış olsa da geliştirilen ve klinikte kullanılan antibiyotik sayısı sonraki yıllarda giderek azalmaktadır. Buradaki temel sebep, bakterilerin antibiyotiklere

karşı geliştirdiği direnç paternleridir. Antibiyotik direnci bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılabilmektedir (Hutchings vd. 2019; Nicolaou ve Rigol 2018). Dolayısıyla bir ilaç piyasaya sunulduğunda, ilaç geliştirilme maliyetlerini geri kazanmadan, ilaca karşı direnç gelişebilmekte ve bu sorun da ilaç endüstrisinin antibiyotik geliştirme alanına yatırımlarının azaltmasıyla sonuçlanmaktadır. Bundan yarım yüzyıl öncesinde neredeyse tarihe karışacağı düşünülen enfeksiyon hastalıkları, antimikrobiyal direnç nedeniyle günümüzde de küresel ölçekte ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır (Bbosa vd. 2014; Luepke vd. 2017; Overbye ve Barrett 2005)

2.3. Antimikrobiyal Ajan Kaynakları

Antimikrobiyal ajanlar mikroorganizmaları öldüren ve/veya çoğalmalarını inhibe eden bileşiklerdir. Antibiyotikler ise mikroorganizmalar tarafından üretilen ve etkileşim halindeki diğer mikroorganizmalara karşı bir savunma aracı olarak kullanılan doğal antimikrobiyal ajanlardır (Madigan vd. 2014). Bu savunma aracının mikroorganizmalardan edinilip, tekrar onlara karşı kullanılması da antibiyotikleri tıp tarihindeki en başarılı kemoterapi türlerinden biri haline getirmiştir. Antibiyotikler sayesinde milyonlarca insanın hayatı kurtulmuş ve insanlık, yüzyıllardır süregelen birçok bulaşıcı hastalığı kontrol altına almayı başarmıştır (Aminov 2009). Fakat mevcut antibiyotiklerin önüne geçemediği enfeksiyonlara ya da doğal antibiyotiklere karşı direnç geliştiren bakterilere karşı çözüm oluşturmak amacıyla sentetik ve yarı-sentetik antibiyotikler de türetilmiştir. Sentetik ve yarı-sentetik antibiyotikler, doğal bir antibiyotiğin etki spektrumunu güçlendirmek ya da antibiyotik direncini ortadan kaldırmak amacıyla, çeşitli kimyasal modifikasyonlarla doğal antibiyotiklerden üretilen formlardır. Bunun yanı sıra tamamen laboratuvar ortamlarında geliştirilen bileşikler de sentetik antimikrobiyal ajanlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Madigan vd. 2014; Olsufyeva ve Yankovskaya 2020).

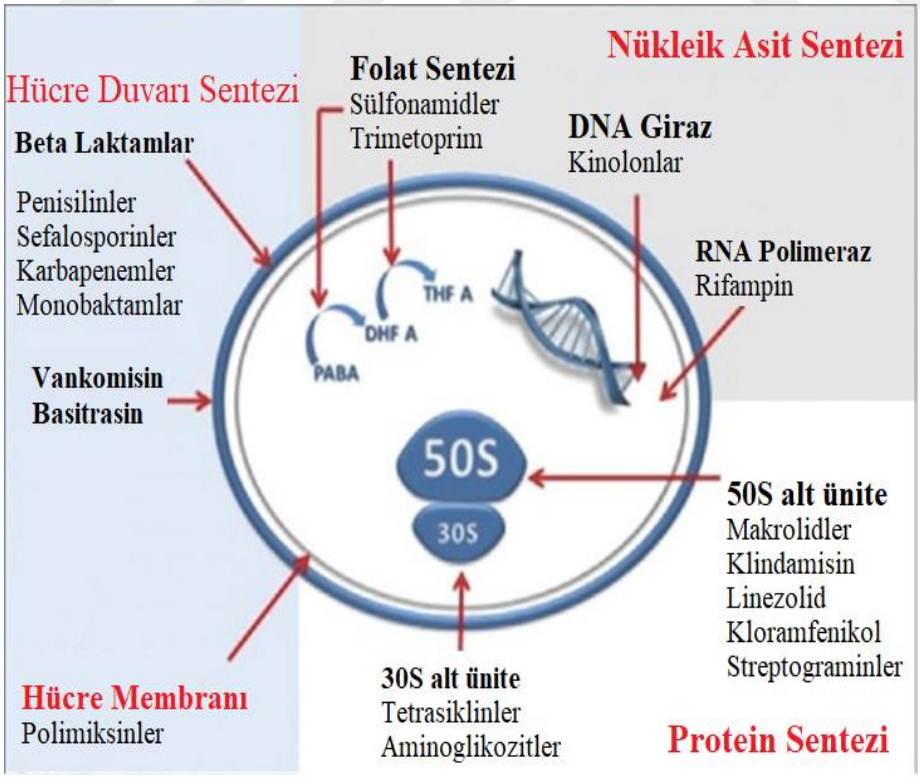
Doğal, sentetik ve yarı-sentetik antimikrobiyaller arasında etkinlik ve toksisite açısından bir ilişki bulunmaktadır. Doğal antimikrobiyaller etkinlik açısından en zayıf halka konumundadır. Bunun nedeni bu bileşiklerin doğada daha önceden var olması ve dolayısıyla bakterilerin bu bileşiklere karşı zaten direnç geliştirmiş olmalarıdır(Aminov 2009; Barzic ve Ioan 2015). Toksisite açısından bakıldığında da doğal antimikrobiyaller diğerlerine göre daha fazla toksik etkilere sahiptir. Yarı-sentetik antimikrobiyaller bu toksisiteyi azaltmak ve etkinliği arttırmak amacıyla üretilmiştir. Sentetik antimikrobiyaller ise zaten düşük toksisite ve yüksek etkinlik ilkesiyle geliştirilmektedir (Şekil 2.3) (Barzic ve Ioan 2015).



Şekil 2.3. Faklı kaynaklardan elde edilen antibiyotiklerin etkinlik-toksisite ilişkisi (Barzic ve Ioan 2015)

2.4. Antibiyotik Hedefleri ve Etki Mekanizmaları

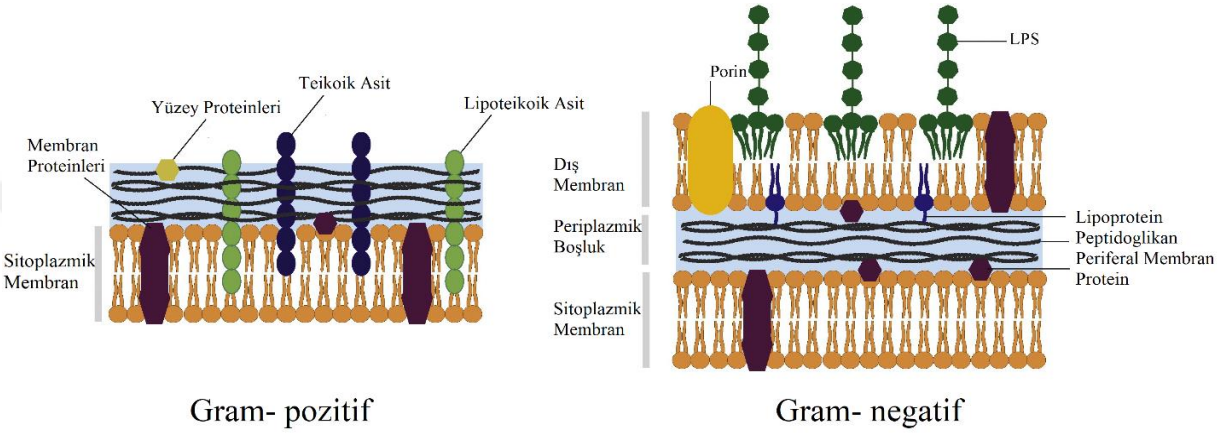
Antibiyotikler bakterileri öldürmek veya çoğalmalarını inhibe etmek amacıyla bakteri hücrelerinin canlılığı için önemli mekanizmaları hedef almaktadır. Bunlar; hücre membranı, hücre duvarı sentezi, protein sentezi, nükleik asit sentezi gibi hedeflerdir (Şekil 2.4) (Kapoor vd. 2017).



Şekil 2.4. Antibiyotik hedefleri ve etki mekanizmaları (Kapoor vd. 2017)

2.4.1. Hücre membran geçirgenliğinin bozulması

Bakteri hücrelerinin temel anatomisi incelendiğinde, Gram pozitif bakterilerde sitoplazmik membranı koruyan ve "hücre duvarı" olarak adlandırılan, kalın bir peptidoglikan tabakası görülmektedir. Gram negatif bakterilerde ise sitoplazmik membranı çevreleyen ince bir peptioglikan tabakasının dışında çift katlı lipit tabakadan oluşan "dış membran" yer almaktadır (Şekil 2.5) (Kapoor vd. 2017). Dış membranın sahip olduğu lipopolisakkarit (LPS) tabaka membran akışkanlığını azaltarak geçirgenlik eşiğini arttırmaktadır. Bu nedenle Gram pozitif bakterilere nazaran Gram negatif bakteriler antibakteriyel ajanlara karşı daha duyarsızdır (Cox ve Wright 2013).



Şekil 2.5. Gram-pozitif ve gram-negatif bakteri hücre membranlarının şematik diyagramı (Epand vd. 2016)

Memeliler de dahil olmak üzere birçok organizma tarafından üretilen katyonik antimikrobiyal peptitler (CAMP), bakteri membranlarının geçirgenliğini bozarak etki gösteren bir antibiyotik sınıfıdır. Genellikle 12 ila 20 aminoasitten oluşan ve yapılarındaki bazik karakterli aminoasitler nedeniyle +2 ila +7 arasında değişen pozitif yüklere sahip amfifilik yapılardır. Klinikte polimiksin B, polimiksin E (kolistin olarak da bilinmektedir) ve daptomisin gibi katyonik lipopeptid antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (Epand vd. 2016; Steinbuch ve Fridman 2016). Polimiksin B ve kolistin, LPS'nin lipid A çekirdeğine, LPS moleküllerini membran üzerinde lipid A'ya bağlı tutan kalsiyum ve magnezyum katyonlarından üç kat daha sıkı bağlanmaktadır (Steinbuch ve Fridman 2016). İlk olarak dış membranda biriken polimiksinler, ardından iç membrana nüfuz etmekte ve en sonunda sitoplazmaya kadar ulaşmaktadırlar. Böylece bu lipopeptit antibiyotikler, hücre membran homeostazını bozarak bakterisidal etki göstermektedirler (Epand vd. 2016).

2.4.2. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

Bakterilerde hücre duvarı; hücrenin yapısal bütünlüğünün, ozmotik yapının ve hücre içi basıncın korunmasını sağlayan kompleks bir yapıdır. Hücre duvarı ve hücre duvarının biyosentez yolağı antibiyotiklerin ana hedeflerinden birisidir (Miyachiro vd. 2019). Hücre duvarının en önemli ana bileşeni, iç membranı ağ benzeri bir yapıyla çevreleyen peptidoglikan tabakadır. Peptidoglikan, polimerize disakkarit alt birimleri olan N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşmaktadır. N-asetilmuramik

aside bağlı kısa saplı peptitlerde bulunan D-alanil-alanin kısmı ile glisin kalıntıları arasında Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) tarafından çapraz peptit bağları (transpeptidasyon) oluşturulmaktadır. Bu çapraz bağlanma hücre duvarını yapısal açıdan güçlendirmektedir (Dörr vd. 2019; Sauvage vd. 2008).

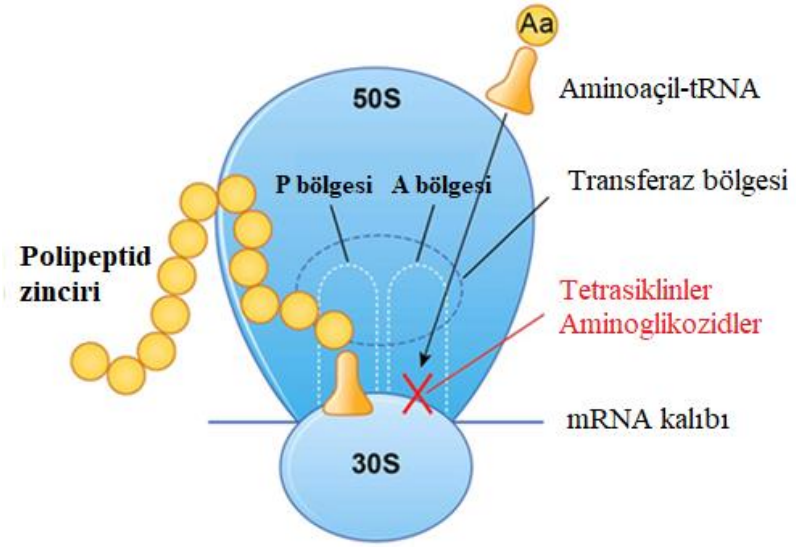
Penisilin gibi β-laktam grubu antibiyotiklerin ana hedefi PBP'lerdir. β-laktam halkası, PBP üzerine yerleşen D-alanil D-alanin dipeptidine yapısal açıdan oldukça benzerdir. Dolayısıyla β-laktam halkası ile PBP'nin kovalent bağlanması sonucunda peptidoglikan sentezinin inhibisyonu gerçekleşmektedir. Sonuç olarak bu durum, bakteride peptidoglikan tabakasının bozulmasına ve bakterinin parçalanmasına neden olmaktadır (Bush ve Bradford 2016; Kapoor vd. 2017).

Öte yandan vankomisin gibi glikopeptid grubu antibiyotikler *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. ve *Clostridium difficile* gibi Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Glikopeptidler, peptidoglikanların D-alanil D-alanil terminaline bağlanarak PBP'nin bu bölgeye bağlanmasını engellemekte ve hücre duvarı sentezini de inhibe etmektedir (Binda vd. 2014).

2.4.3. Protein sentezinin inhibisyonu

Ribozomlar, hücrelerde canlılığın devam etmesini sağlayan biyomoleküllerden biri olan "proteinlerin" sentezlendiği makromoleküler makinelerdir. Bu nedenle bakteriyel ribozomlar ve translasyon mekanizması antibiyotikler için ana hedeflerden birisidir. Bakteriyel 70S ribozomlar, 16S rRNA zinciri ve 20 proteinden oluşan 30S alt birimi ile 23S ve 5S rRNA zincirleri ve 34 proteinden oluşan 50S alt birimi olmak üzere iki ribonükleoprotein parçacığından oluşmaktadır (Orelle vd. 2013). Bu bileşenler ve diğer çeşitli faktörler bir arada çalışarak mRNA'daki genetik bilgiyi başlatma, uzama ve sonlandırma olmak üzere üç temel aşamadan sonra bir polipeptid zincirine çevirmektedir. Başlatma faktörleri ilk olarak mRNA'nın 5′ bölgesinin, ribozomdaki 30S alt biriminde bulunan P bölgesine bağlanmasını sağlamaktadır. Ardından mRNA kodonuna başlatıcı formil-metiyonin tRNA bağlanarak protein sentezi başlamaktadır (Arenz ve Wilson 2016). Devam eden süreçte aminoaçil-tRNA antikodonu, ribozomdaki A bölgesi üzerine denk gelen mRNA kodonu ile eşleşmekte ve ardından aminoaçil-tRNA, uzama faktörlerinin yardımıyla A bölgesinden P bölgesine transloke olmaktadır. 50S alt birimi üzerinde yer alan peptidil transferaz merkezi (PTC), peptidil-tRNA üzerindeki polipeptid zinciri ile aminoaçil-tRNA üzerindeki amino asit arasında peptid bağı oluşumunu katalize etmektedir. Ardından yüksüz kalan tRNA, ribozomdaki E bölgesinden serbest bırakılmaktadır. Uzama aşaması, bir durdurma kodonu gelinceye kadar eş zamanlı olarak devam etmektedir. Antibiyotikler gibi küçük moleküller, tüm bu aşamalarda yer alan ribozomal bileşenler ile etkileşime girerek protein sentezini inhibe edebilmektedirler (McCoy vd. 2011).

Aminoglikozitler ve tetrasiklinler, ribozomun 30S alt biriminde yer alan 16S rRNA'ya bağlanarak aminoaçil-tRNA'nın A bölgesine bağlanmasını engellemekte ve mRNA'nın yanlış okunmasına veya translasyonun erken sonlanmasına neden olmaktadır. Tetrasiklinler ribozomlara geri dönüşümlü (reversible) olarak bağlanıp, bakteri büyümesini ve çoğalmasını durdurarak bakteriyostatik etki oluşmaktadırlar. Aminoglikozitler ise bakterilerin ölümünü tetikleyen bakterisidal ajanlardır (Graber 2021; Krause vd. 2016).



Şekil 2.6. Ribozomun 30S alt biriminin inhibisyonu (Graber 2021)

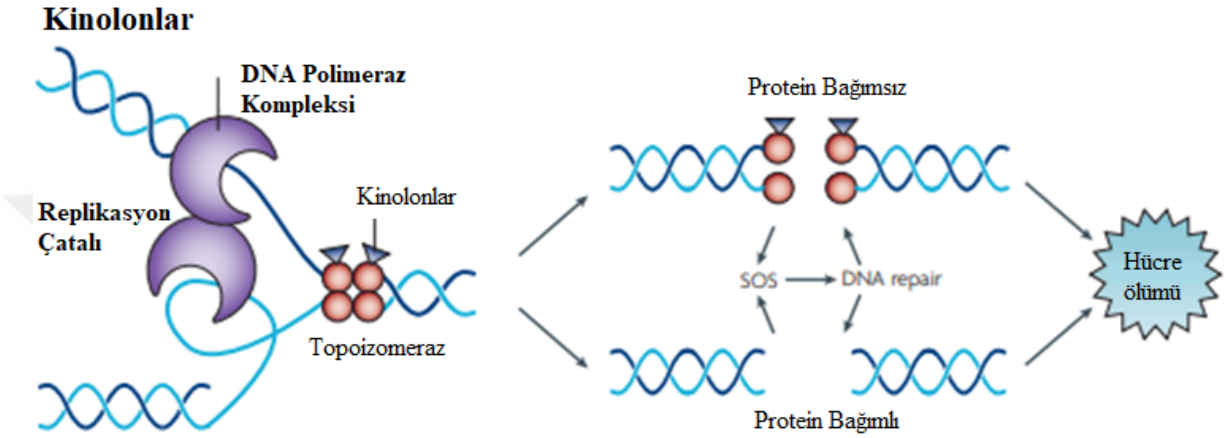
Protein sentezini inhibe eden bir diğer yöntem ise ribozomun 50S alt biriminin inhibisyonudur. Streptograminler, makrolidler, kloramfenikol, linkozamidler, oksazolidinonlar ve tiyopeptitler, ya 50S alt biriminin 23S rRNA'sına bağlanıp PTC aktivitesini bozarak ya da tRNA substratının buraya bağlanmasını engelleyerek etki göstermektedirler (Mukhtar ve Wright 2005). İlk sentetik antibiyotik olan kloramfenikol sadece A bölgesine, klindamisin ve tiamulin ise A ve P bölgelerinin her ikisine de etki ederek aminoaçil-tRNA'nın PTC alanına bağlanmasını ve peptid bağının oluşumunu inhibe etmektedirler. Diğer taraftan bir linkozamid türevi olan klindamisin, PTC alanına ve peptit çıkış tüneline bağlanarak peptidil transferaz reaksiyonunu engellemekte ve buna bağlı olarak peptidil-tRNA'nın ribozomdan ayrılmasına neden olmaktadır (McCoy vd. 2011).

2.4.4. Metabolik yolakların inhibisyonu

Antibiyotikler folat sentezini hedef alarak çeşitli metabolik yolakları inhibe edebilmektedir. Para-aminobenzoik asit (PABA) ile yapısal olarak benzer analoji gösteren sülfonamidler (sülfametoksazol ve trimetoprim), folat sentezini çeşitli bölgelerden inhibe edebilmektedir. Sülfametoksazol, dihidrofolik asidin (DHF) sentezlendiği reaksiyonda rol alan dihidropteroat sentaza, PABA'dan daha yüksek afiniteyle bağlanarak reaksiyonu inhibe etmektedir. DHF ile benzer analoji gösteren trimetoprim ise DHF'den tetrahidrofolik asit (THF) sentezlenen yolakta dihidrofolat redüktazı inhibe etmektedir (Kırmusaoğlu vd. 2019; Yoneyama ve Katsumata 2006). Dihidropteroat insan hücrelerinde bulunmadığı için sülfametoksazol bakterilere karşı yüksek seçicilik gösterir. Trimetoprim de bakteriyel dihidrofolat redüktaza karşı, insanda bulunan dihidrofolat redüktazdan 50 ila 100 bin kat daha fazla seçicilik sergiler. Ayrıca bakteriyostatik etki gösteren bu iki antibiyotiğin kombinasyonu (Trimetoprim sülfametoksazol) sinerjistik ve bakteriyosidal bir etkiye sahiptir (Yoneyama ve Katsumata 2006).

2.4.5. DNA replikasyonunun inhibisyonu

DNA replikasyonu tüm organizmalar için en önemli süreçlerden biridir. DNA replikasyonu, mRNA transkripsiyonu ve hücre bölünmesi dahil birçok süreç, kromozomal süper sarmalının topoizomeraz katalizli reaksiyonla modülasyonunu içermektedir (Kohanski vd. 2010). DNA topoizomerazlar, tek zincir kırığı oluşumunu ve onarımını sağlayan Tip I topoizomeraz ve aynı anda çift zincir kırığı oluşumunu ve onarımını sağlayan Tip II topoizomeraz olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (Yoneyama ve Katsumata 2006).



Şekil 2.7. Topoizomerazlar ve kinolon grubu antibiyotiklerin etki mekanizması (Kohanski vd. 2010)

Kinolon grubu antibiyotikler özellikle Tip II topoizomeraz grubu topoizomeraz II (DNA Giraz) ve topoizomeraz IV'ü hedef alarak kromozomal topolojinin korunmasını engeller. Böylelikle zincir kırıklarının tekrar birleştirilmesini önleyerek hücreyi DNA replikasyonu aşamasında durdurur (Kohanski vd. 2010). Ayrıca kinolonlar, enzim-DNA replikasyon komplekslerinin konsantrasyonunu arttırarak hücreleri öldüren bir zehir gibi davranırlar. Bu nedenle, kinolonlar "topoizomeraz zehirleri" olarak da adlandırılmaktadırlar.

Bakteride oluşan bu DNA kırıkları, SOS tepkisini ve diğer DNA onarım yolaklarını tetiklemektedir. Eğer bakteri DNA kırıklarını tamir edemez ise bu olay hücrenin ölümüne yol açabilmektedir (Şekil 2.6) (Aldred vd., 2014). 1962'de nalidiksik asidin keşfiyle ortaya çıkan kinolon grubu içinde oksolinik asit (birinci nesil), siprofloksasin (ikinci nesil), levofloksasin (üçüncü nesil) ve gemifloksasin (dördüncü nesil) gibi günümüzde de sıklıkla reçete edilen birçok antibiyotik yer almaktadır (Aldred vd. 2014; Yoneyama ve Katsumata 2006).

2.4.5. Transkripsiyonun inhibisyonu

Gen ekspresyonunun ilk adımı olan transkripsiyon, belirli bir DNA dizisinden bir RNA molekülünün sentezlenmesidir. Transkripsiyon, bakterilerde RNA polimeraz (RNAP) adı verilen çoklu alt birime sahip bir enzim tarafından katalize edilmektedir (Mosaei ve Harbottle 2019). Bakteriyel RNAP alt birim sekanslarının yüksek oranda

korunmuş olması ve ökaryotik organizmalarda bulunan RNAP I, RNAP II ve RNAP III ile oldukça farklı olması, RNAP'nin bir terapötik hedef haline gelmesini sağlamaktadır (Srivastava vd. 2011). Rifamisin grubu antibiyotikler (rifampin, rifabutin, rifapentin ve rifamixin), RNAP'nin β alt ünitesine güçlü bir şekilde bağlanarak, transkripsiyonu inhibe etmektedirler (Hamouche vd. 2021; Srivastava vd. 2011). Rifamisin grubu antibiyotiklerin bakteriyel RNAP'lere bağlanma afinitesi ökaryotik enzimlerden 100 kat daha fazladır. Bu durum enfeksiyonun tedavisi için terapötik bir seçicilik oluşturmaktadır (Mosaei ve Zenkin 2020). Rifamisinler güncel klinik uygulamalarda hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak özellikle M. *tuberculosis*'in neden olduğu tüberkülozun tedavisinde kullanımı büyük önem arz etmektedir (Campbell vd. 2001; Mosaei ve Zenkin 2020).

2.5. Antibiyotik Direnci

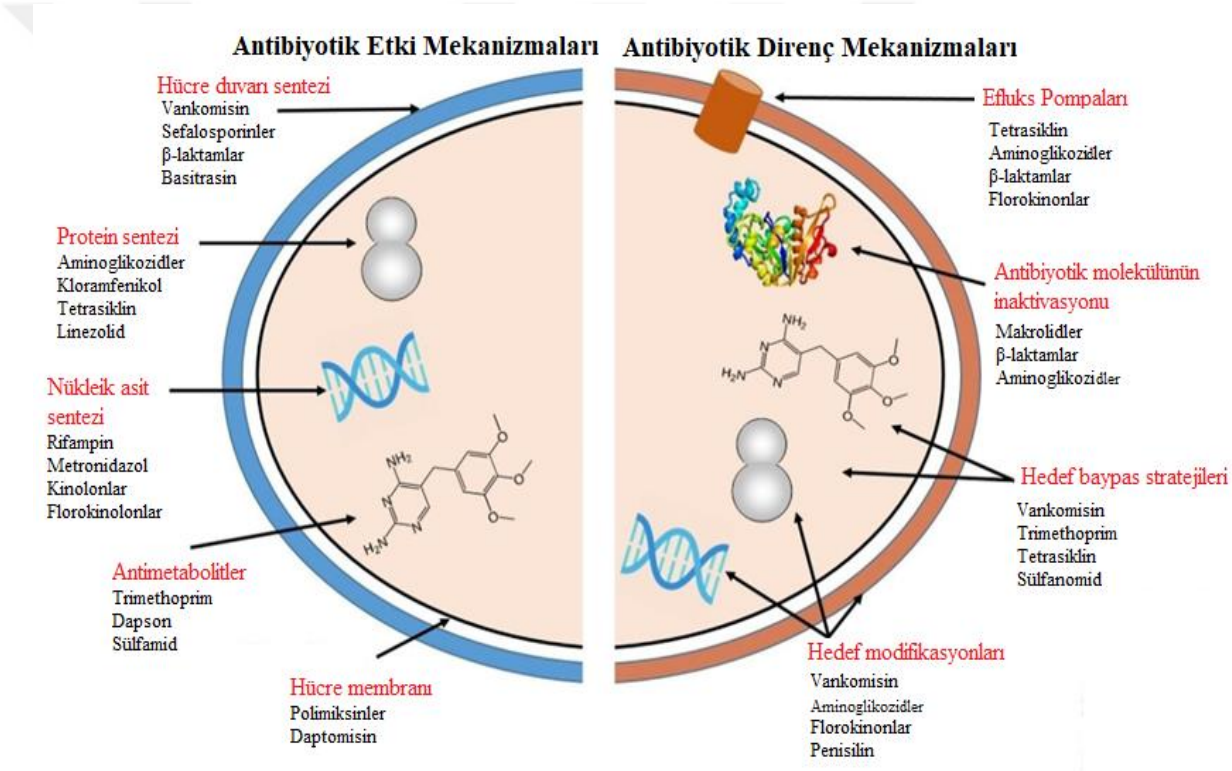
Antibiyotiklerin keşfi sadece enfeksiyon hastalıklarından kaynaklı mortalite ve morbidite oranını azaltmakla kalmamış; kemoterapi, invaziv cerrahi ve organ transplantasyonu gibi çok önemli tıbbi yaklaşımların geliştirilmesinin önünü açmıştır (Blair vd. 2014; Munita ve Arias 2016). Fakat yanlış ve aşrı antibiyotik kullanımı sonucunda 21. yüzyılın başlarında antibiyotik direnci kavramı ön plana çıkmıştır (Yeh vd. 2020). Aslında antibiyotik direnci kavramı yeni değildir, örneğin penisilin piyasaya sürülmeden birkaç yıl önce bakteriyal bir penisilinaz tanımlanmıştır. Antibiyotiklerin yetersiz, aşırı ve yanlış kullanımı bu gibi direnç patternlerinin artmasına ve yayılmasına neden olmuştur (Davies ve Davies 2010). Ne yazık ki bakteriyal patojenler arasında antimikrobiyal direncin hızla yayılmasıyla birlikte, antibiyotikler sayesinde kontrol altına alınan enfeksiyon hastalıkları yeniden önemli bir halk sağlığı tehdidi olarak gündeme gelmiştir. Bu nedenle 2016 yılında birçok devlet Dünya Sağlık Örgütü'nden (DSÖ) etkili ilaçların araştırılmasını ve geliştirilmesini desteklemek amacıyla antibiyotik direnciyle ilişkili bir rapor oluşturmasını talep etmiştir (Tacconelli vd. 2018). Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) bakterilerden kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle Avrupa'da her yıl yaklaşık 25 bin ölüm, Amerika'da ise her yıl en az 23 bin ölüm meydana gelmiş ve bunun Avrupa Birliği ekonomisine yıllık 1,5 milyar euro, Amerika Birleşik Devletleri ekonomisine ise yıllık 20 milyar dolara yakın zararı olduğu tahmin edilmektedir (Dadgostar 2019; O'Neill 2014).

Antimikrobiyal direnç, bakterilerin çevreleriyle etkileşimlerinin sonucunda ortaya çıkan evrimsel ve adaptasyonel bir mekanizmadır. Klinikte kullanılan mevcut antibiyotiklerin büyük çoğunluğu bakteriyel ya da fungal kökenlidir ve bu ajanlar mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilmektedir. Bakteriler, diğer mikroorganizmaların ürettiği toksinlere karşı hayatta kalmak için birçok direnç mekanizması geliştirmiştir (Holmes vd. 2016; Munita ve Arias 2016). Dolayısıyla antimikrobiyal direnç mekanizmaları ekolojik bir fenomendir ve insanlık tarihinden daha önceye dayanan milyonlarca yıllık evrimin ürünüdür. Öte yandan bakteriyel plazmitler ve/veya transpozonlar gibi mobil genetik elementler (MGE) üzerinde taşınan ve evrimsel süreçte kazanılmış direnç genleri, yatay gen transferi olarak tanımlanan çeşitli mekanizmalarla (transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon) diğer patojen bakterilere aktarılabilmektedir. Dolayısıyla bakteriler, çevresel moleküllerle (toksin) ve diğer mikroorganizmalarla etkileşimleri sonucunda, çeşitli direnç mekanizmaları elde edebilmekte ve bunu dirençli olmayan başka organizmalara da aktarabilmektedirler

(Holmes vd. 2016). Antibiyotik kullanımının artmasıyla birlikte popülasyonda bulunan direnç genlerine sahip bakteriler, antibiyotik stresi altında duyarlı bakterilere göre bir seçilim avantajı kazanırlar. Bu durum antimikrobiyal direncinin patojenler arasında hızla yayılmasına ve enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan olumsuzlukların da artmasına neden olmaktadır (Baym vd. 2016). Bu doğal gelişim gösteren bir süreç değil, insan tarafından yönlendirilmiş bir durumdur ve Darwinci doğal seçilim ve hayatta kalma kavramlarının en iyi örneklerinden biridir (Davies ve Davies 2010).

2.6. Antibiyotik Direncinin Moleküler Mekanizmaları

Bakteriler antibiyotiklere karşı dört ana tip direnç mekanizması geliştirmiştir: Bunlar (i) antibiyotiğin fonksiyonel gruplarının çeşitli enzimler vasıtasıyla modifikasyonu ya da hidrolizi, (ii) Antibiyotik penetrasyonunun azaltılması ya da efluks pompalarıyla antibiyotiğin hücre dışına taşınması, (iii) hedeflenen bölgenin modifikasyonu ve (iv) hedef baypas stratejileridir (Uluseker vd. 2021).



Şekil 2.8. Antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizmaları (Uluseker vd. 2021)

2.6.1. Antibiyotik molekülünün modifikasyonları

Bakteriler açısından antibiyotiklerle başa çıkmanın en etkili stratejilerinden biri, bileşiğe spesifik kimyasal kısımlar ekleyerek ilacı inaktive etmek ya da direkt antibiyotiği hedef alarak onu parçalayan enzimler üretmektir. Hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilerde sıklıkla görülen modifiye edici enzimlerin hedefi genellikle protein sentezi inhibitörü olarak çalışan antibiyotiklerdir. Modifiye edici enzimler

tarafından en sık katalize edilen biyokimyasal reaksiyonlar; (i) asetilasyon (aminoglikozidler, kloramfenikol, streptograminler), (ii) fosforilasyon (aminoglikozidler, kloramfenikol) ve (iii) adenilasyondur (aminoglikozidler, linkozamidler). Enzimler tarafından antibiyotiğin modifikasyonu, bileşiğin hedefine yönelik affinitesini azaltarak sterik bir engel oluşturur. Bu durum da bakterilerde minimum inhibitör konsantrasyonunun artışına (MİK) neden olmaktadır (Munita ve Arias 2016).

Antibiyotik molekülünün modifikasyonu yoluyla oluşan direncin en iyi örneği aminoglikozid modifiye edici enzimlerdir (AME). Bu enzimler aminoglikozidlerin amino ve hidroksil gruplarını modifiye ederek antibiyotiğin hücreye girişinin ve aynı zamanda 16S rRNA'ya karşı afinitesinin azalmasına neden olur. AME, antibiyotiğin amino gruplarını asetilleyen N-asetiltransferazlar (AAC'ler), ATP'den bir adenil grubunu antibiyotiğin hidroksil grubuna aktaran O-nükleotidiltransferazlar (ANT'ler) ve ATP kullanarak antibiyotiğin hidroksil grubunu fosforile eden O-fosfotransferazlar (APH'ler) olmak üzere üç farklı enzim grubundan oluşmaktadır (Zárate vd. 2018). AME enzimleri aminoglikozidleri modifiye ettikleri konumlara göre adlandırılmaktadır. Örneğin ANT (6′), 6′ pozisyonunda adenilasyon yapabilir. Ayrıca roma rakamları ya da küçük harfler de AME'leri direnç modellerine (aynı reaksiyonu katalize eden birden fazla enzim bulunuyorsa) göre tanımlamaktadır. Örneğin, gram-pozitiflerde en sık görülen aminoglikozid direnç paterni APH (3')-IIIa ve AAC (6')-Ie/ APH (2")-Ia'dır (Labby ve Garneau-Tsodikova 2013).

Antibiyotik modifikasyonunun bir diğer örneği de kloramfenikol antibiyotiğinin kloramfenikol asetiltransferazlar (CAT) tarafından modifiye edilmesidir (Munita ve Arias, 2016). Kloramfenikol, ribozomun 50S alt biriminde yer alan PTC alanına bağlanarak bu bölgeye uygun tRNA'nın yerleşmesini ve peptid bağı oluşmasını inhibe eden bir antibiyotiktir. Kloramfenikol direnci, membran geçirgenliğinin azaltılması ve 50S alt birimin 23S rRNA'sında mutasyonel değişimler olması gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelebildiği gibi yüksek dirençli kloramfenikol direncine en yaygın olarak hücre içi CAT üretimi aracılık etmektedir (Goodale vd., 2020). CAT enzimleri, asetil koenzim A'da bulunan asetil grubunu kullanarak kloramfenikolün 3'-hidroksil pozisyonundan asetilasyonunu katalize etmektedir. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif patojenlerde bulunabilen CAT enzimleri, yüksek dirençle ilişkili tip A ve düşük dirençle ilişkili tip B olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Alcala vd. 2020).

2.6.2. Antibiyotik molekülünün yıkımı

β-laktamlar birçok enfeksiyonun tedavisinde reçete edilen ve en yaygın kullanılan antibiyotik grubudur. β-laktam antibiyotiklerinin aşırı ve yanlış kullanılması nedeniyle, β-laktam direnci hızla yayılmıştır. Aslında, β-laktam grubu bir antibiyotik olan penisilin antibiyotiği ilaç pazarına girmeden bir yıl önce penisilinaz adı verilen bir direnç paterni bulunmuştur. Penisilinaz, penisilinin β-laktam halkasındaki amid bağını yok ederek, antibiyotiği etkisiz hale getirmektedir (Aurilio vd. 2022; De Angelis vd. 2020).

β-laktamazlar olarak adlandırılan bu enzimler, amino asit dizi homolojisine ve hidrolitik mekanizmalarına göre dört gruba (A, B, C ve D) ayrılmaktadır. A, C ve D sınıfı (serin β-laktamazlar) β-laktamazlar aktif kısımlarında yer alan "serin" nedeniyle

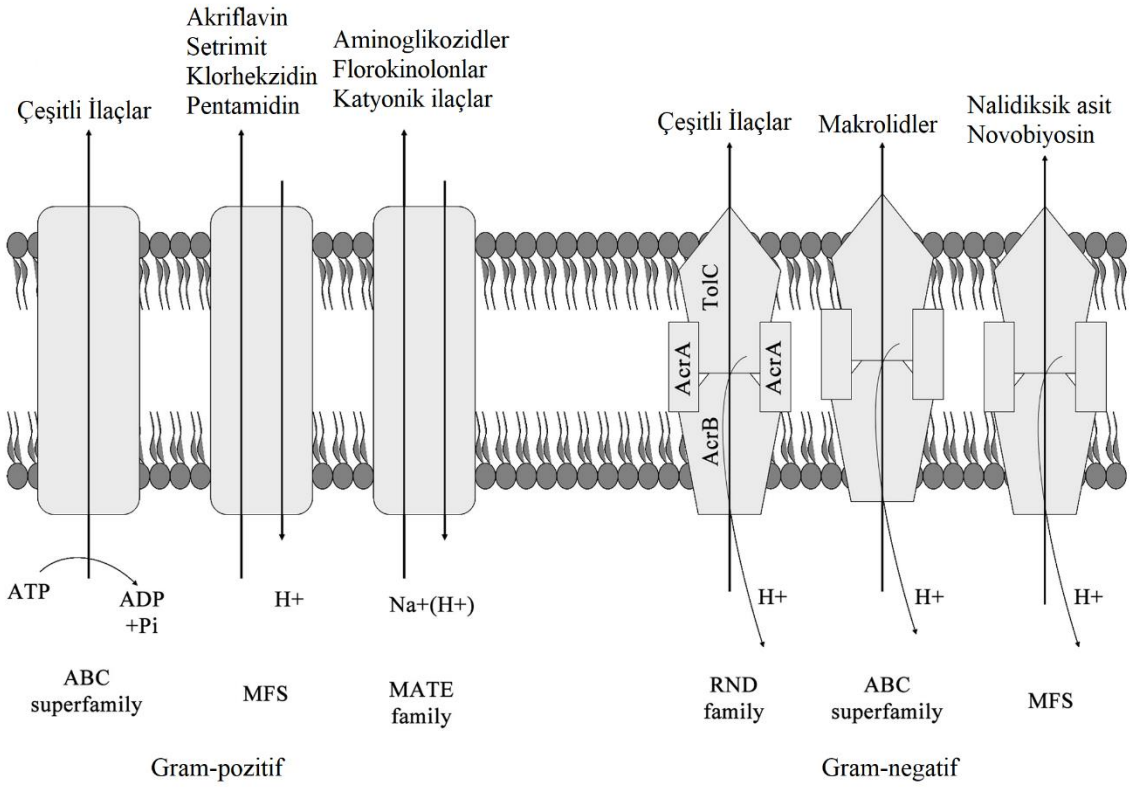
serin-reaktif hidrolaz ailesinde, B sınıfı β-laktamazlar (metallo-β-laktamazlar) ise aktif kısımlarında yer alan bir ya da daha fazla çinko (Zn^{+2}) iyonu nedeniyle metalloenzimler ailesinde yer almaktadır (Hussain vd. 2021). A sınıfı serin β-laktamazlar genişletilmiş spektrumlu β-laktamazları (ESBL'ler) ve *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC) enzimlerini içermektedir. Bu enzimler genellikle klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilebilmektedir (De Angelis vd. 2020; Munita ve Arias 2016). B sınıfı metallo-β-laktamazlar ise monobaktamlar hariç neredeyse tüm beta-laktam antibiyotiklerini hidrolize edebilmektedir. Fakat EDTA gibi iyon şelatlayıcı ajanların varlığında metallo-β-laktamazlar inhibe edilebilmektedir (Alfei ve Schito 2022). C sınıfı β-laktamazlar, sefamisinler de dahil tüm penisilinlere ve sefalosporinlere karşı dirence neden olan sefalosporinazlardır ve en yaygın görüleni AmpC'dir. AmpC β-laktamaz, genellikle kromozomal ampC genleri tarafından kodlansa da çoğu plazmid aracılığıyla aktarılmaktadır (Aurilio vd. 2022; Hussain vd. 2021). Öte yandan C sınıfı β-laktamazların karbapenemleri hidroliz potansiyeli zayıftır ve bu nedenle AmpC kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler kullanılabilir (Carcione vd. 2021). Ayrıca AmpC enzimleri kloksasilin, sefoksitin ve aztreonam gibi β-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilmektedir (Hussain vd. 2021). D sınıfı β-laktamazlar ise oksasilinleri hidrolize etme yeteneklerinden dolayı oksasilinazlar olarak sınıflandırılmaktadır (De Angelis vd. 2020). Bu enzimler oksasilin, kloksasilin, metisilin ve karbapenemlere karşı etki gösterirken penisilinlerle sınırlı aktiviteye sahiptir. Klavulanik aside karşı da düşük hassasiyet göstermektedir (De Angelis vd. 2020; Munita ve Arias 2016). OXA-18 β-laktamazlar haricindeki diğer OXA tipleri plazmit üzerinde taşınmaktadır (Carcione vd., 2021). Özellikle OXA-48 ve varyantları klinik açıdan oldukça önemli ve tedavisi zor bir direnç unsurudur. *K. pneumoniae* ve diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin yanı sıra *A. baumannii*'de de yaygın olarak görülmektedir (Aurilio vd. 2022).

2.6.3. Azaltılmış antibiyotik penetrasyonu ve efluks pompaları

Bakteri membranları, hücrenin ihtiyacı olan gerekli besinlerin içeriye alınmasına ve hücreye zararlı bileşiklerin ise dışarıda tutulmasına yardımcı olan seçici bir bariyer görevi görmektedir. Membranlar üzerinde hücreye gerekli maddelerin geçişini sağlamak için çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Bu mekanizmalardan biri porin adı verilen dış membran proteinleridir. Porinler, membran boyunca yerleşmiş, belirli bir geçirgenlik sınırına sahip su dolu gözeneklerden oluşur ve hücreye çeşitli hidrofilik bileşiklerin alınmasını sağlar. (Fernández ve Hancock 2012). Dış membran proteinleri ilaç geçirgenliğini ve direncini düzenleyen temel faktörlerden biridir. Örneğin hidrofilik antibiyotiklerden β-laktamlar hücre içerisine girmek için porinleri kullanırken, makrolidler ise lipid tabaka boyunca yayılabilmektedir. Fakat dış membranın protein ya da lipit tabakasında meydana gelen çeşitli modifikasyonlar ilaç geçirgenliğini değiştirerek, bakteri için bir direnç mekanizması oluşturmaktadır (Ghai ve Ghai 2018). Yine bakterilerde, antibiyotik molekülünün hücre içine alımını azaltmak için bazı porinlerin ekspesyonunu aşağı regüle eden veya porinleri işlevsiz hale getiren mutasyonlar gelişebilmektedir. Bazı non-sinonim porin mutasyonları nedeniyle porin kanallarının boyutunda değişiklikler meydana gelmekte ve bu durum porinlerin seçiciliğini değiştirerek antibiyotik direncine katkı sağlayabilmektedir. (Masi vd. 2017).

Antibiyotiklerin hücre içerisine alınımını ve hücre içerisinde birikimini önleyen bir başka direnç mekanizması da enerji bağımlı efluks pompalarıyla antibiyotiklerin

hücre dışına taşınmasını içermektedir. Hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilerde karakterize edilmiş pek çok efluks sistemi tanımlanmıştır. Ayrıca azaltılmış antibiyotik penetrasyonu ile efluks sistemlerinin kombinasyonu yüksek antibiyotik direnciyle ilişkili ve klinik açıdan yüksek öneme sahip büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Aygül 2015). Özellikle efluks pompaları birden fazla substrat taşıyabilmesi sebebiyle ÇİD ile yakından ilişkilidir. Ayrıca çoğu efluks sistemi kromozomal olarak kodlanmakla birlikte, spesifik birçok efluks pompası da MGE aracılığıyla diğer patojenler arasında kolaylıkla yayılabilmektedir (Soto 2013).



Şekil 2.9. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde bulunan farklı tipteki beş ana efluks transport ailesinin temsili (Soto 2013)

Bakteriyel hücre duvarı ve membran yapısı, efluks pompa sistemlerinin organizasyonunu şekillendiren önemli faktörlerdendir. Gram-negatif bakterilerde efluks pompa sistemlerinin birçoğu, iç membran ve dış membran bileşenlerinin yanı sıra periplazmada bulunan bir membran füzyon proteiniyle birlikte üçlü bir organizasyona sahiptir (Aygül 2015; Fernández ve Hancock 2012). Bunun yanında gram-pozitiflerde ise tek bir pompa proteini yer alabilmektedir. Genellikle tek bir pompa proteini kullanan sistemler daha dar bir antibiyotik spektrumuna sahipken üç proteinle organize olmuş efluks sistemleri daha geniş bir antibiyotik tanıma spektrumuna sahiptir. Dolayısıyla böyle sistemler patojenlerde ÇİD'e neden olabilmektedir (Aygül 2015; Blanco vd. 2016).

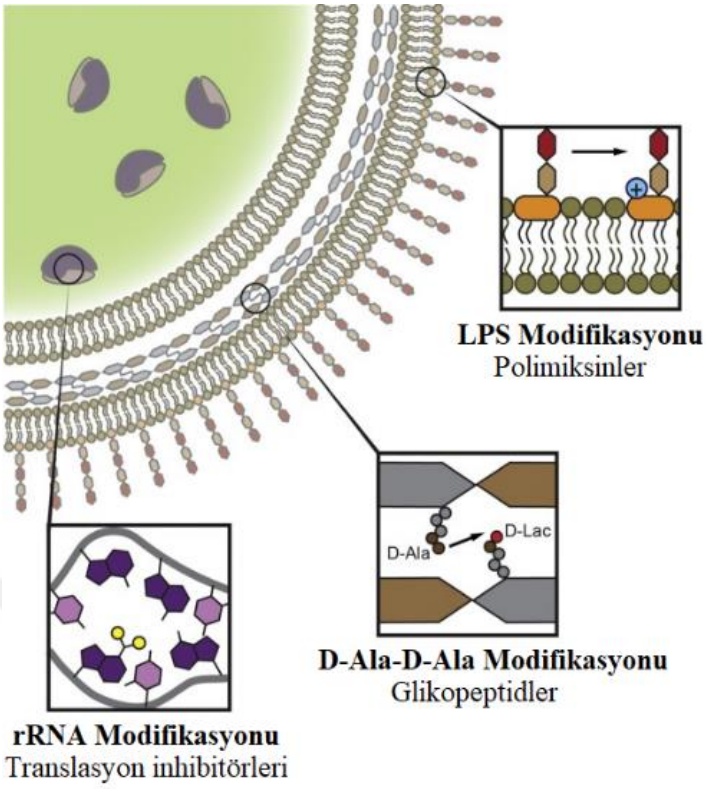
Prokaryotik sistemlerin ilaç atımı için kullandıkları beş ana efluks transport ailesi bulunmaktadır. Bunlar; Şekil 2.9'da da görüldüğü üzere (1) ATP-Binding

Cassette (ABC) süper ailesi, (2) major facilitator süper ailesi (MFS), (3) multidrug and toxic compound extrusion (MATE), (4) small multidrug resistance (SMR) ailesi, (5) resistance-nodulation-division (RND) süper ailesidir (Soto 2013). ABC ailesi antibiyotiklerin atımı için ATP hidrolizinden gelen enerjiyi kullanırken, diğerleri enerji kaynağı olarak proton hareket kuvvetini kullanmaktadır (Aygül 2015; Ghai ve Ghai 2018). MFS, ABC, SMR ve MATE ailelerine ait efluks pompaları hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerde bulunmakla birlikte MFS ve ABC ailelerine ait pompalar gram-pozitiflerde daha sıklıkla görülmektedir (Masi vd. 2017; Soto 2013). RND süper ailesi ise üçlü organizasyona sahip ve sadece gram-negatif bakterilere özgü efluks pompasıdır (Blanco vd. 2016).

Bakteri hücrelerinin düşük membran permeabilitesi, antibiyotiklerin aşması gereken ilk savunma hattıdır. Bunun ötesinde çeşitli mekanizmalar sayesinde ilk savunma hattını güçlendirmek adına porinlerinde çeşitli modifikasyonlar ve ekspresyonel değişiklikler de görülmektedir. Antibiyotikler tüm bu hatları geçse bile bakteriler efluks pompaları yardımıyla ilacı hücre dışına gönderebilmekte ve ÇİD'e destek vermektedir. Dolayısıyla bakterilerde kodlanmış bu savunma mekanizmaları klinik başarı açıdan aşılması gereken ciddi bir sorundur (Blanco vd. 2016; Ghai ve Ghai 2018; Masi vd. 2017).

2.6.4. Hedef bölgenin korunumu, modifikasyonları ve baypas stratejileri

Hedef koruma, bir direnç proteininin (hedef koruma proteini) hedef bölgeyi antibiyotik inhibisyonundan kurtarmak amacıyla hedef ve/veya inhibitör ile fiziksel etkileşime girmesi olarak tanımlanabilmektedir (Wilson vd. 2020). Bu proteinler hedef bölgeye bağlanmak için antibiyotiklerle rekabet eder ve ardından bölgenin konformasyonunu değiştirerek yeniden bağlanmayı engelleyebilmektedir. Direnç proteinleri tarafından oluşturulan bu modifikasyonlar, fiziksel bir etkileşimden kaynaklandığı için, bakterinin doğasında kalıcı bir değişikliğe neden olmamaktadır. Hedef bölgenin korunumuna en iyi örnekler tetrasiklin [Tet (M) ve Tet (O)], florokinolon (Qnr) ve fusidik asit (FusB ve FusC) dirençleridir (Blair vd., 2014; Munita ve Arias, 2016). Tetrasiklin direncine neden olan Tet (M) ve Tet (O), translasyon uzama faktörleri EF-G ve EF-Tu ile çok yakın bir sekans homolojisine sahip GTPazlardır. Bu direnç proteinleri, EF-G ve EF-Tu'ya benzer şekilde ribozoma bağlanabilmekte ve aynı zamanda tetrasiklin bağlanma bölgesiyle de bağlanmaları örtüşmektedir. Bu durum Tet (M) ve Tet (O) proteinlerinin ribozoma bağlı alandan tetrasiklinin fiziksel olarak yer değiştirmesine aracılık ettiğini göstermektedir (Wilson vd. 2020). Yapılan bir çalışmada Tet (M)'nin, tetrasiklin bağlanma bölgesine yakın, 16S rRNA'nın IV. alanı ile doğrudan etkileşime girdiğini ve tetrasiklini bağlanma bölgesinden çıkarttığı ortaya konmuştur. Tet (M) sadece tetrasiklini bölgeden uzaklaştırmakla kalmaz, aynı zamanda tetrasiklinin yeniden bağlanmasını da önlemektedir (Dönhöfer vd. 2012; Munita ve Arias 2016).



Şekil 2.10. Hedef bölgenin modifikasyonu yoluyla antibiyotik direnci (Schaenzer ve Wright 2020)

Hedef bölge odaklı antibiyotik direnç mekanizmaları arasında hedef bölgenin modifikasyonu gibi kalıcı kimyasal değişimler de mümkündür (Munita ve Arias 2016). Birçok antibiyotik, hedeflenen spesifik bölgeye yüksek afinite ile bağlanarak, hedefin normal işlevlerini yerine getirmesini engellemektedir. Bakterilerin buna karşı geliştirdiği stratejilerden biri, antibiyotiğin bağlanma bölgesine erişimini engelleyen veya affinitesini azaltan hedef bölgedeki değişikliklerdir. Hedef bölgenin enzimatik modifikasyonu sayesinde bakteriler glikopeptidlere, polimiksinlere ve ribozom hedefli birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmektedir (Şekil 2. 10) (Schaenzer ve Wright 2020). Hedef bölge modifikasyonları; hedef bölgeyi kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarıyla, hedef bölgede yapılan enzimatik değişiklerle veya hedef bölgenin baypas edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Blair vd. 2014).

Mutasyona bağlı direncin en bilinen örneği rifamisin direncidir. Rifamisin, rpoB tarafından kodlanan RNA-polimerazın β-alt birimine bağlanarak bakteriyel transkripsiyonu bloke eden bir antibiyotiktir. Bu gen üzerinde meydana gelen nokta mutasyonları ve delesyonlar rifamisine karşı bakteriye direnç kazandırır (Goldstein 2014). *M. tuberculosis*'te rpoB'de meydana gelen mutasyonların büyük bir kısmı yaklaşık 100 bp'den küçük bir alanda oluşmaktadır ve bu mutasyonlar sonucunda, tahmini 2.3×10^{-8} gibi yüksek sıklıkta direnç ortaya çıkmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bu bölgede yer alan nokta mutasyonlarından kaynaklı aminoasit ikameleri (özellikle bu bölgede yer alan 8 aminoasit) yüksek seviyeli rifamisin direnciyle karakterize edilmektedir (Lambert 2005). Mutasyonel dirence bir diğer örnek ise DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü inhibe eden florokinolonlara karşı geliştirilen dirençtir.

DNA girazın (gryA ve gryB) ve topoizomeraz IV'ün (parC ve parE) alt birimlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, florokinolonların hedef bölgeye olan afinitelerinin azalmasına neden olmaktadır (Redgrave vd. 2014).

Direnç kazanımının bir diğer yolu da hedef bölgenin enzimatik modifikasyonlarıdır. Bu mekanizmanın en iyi karakterize edilmiş örneği, erm (ermA, ermB ve ermC) genlerinin kodladığı ribozomal metilazların, makrolidlerin ribozom üzerindeki bağlanma bölgesini değiştirmesidir (Aksu vd. 2012). Bu enzimler, bakteriyel 50S ribozomal alt birimdeki 23S rRNA'nın A2058 pozisyonundaki adenin kalıntısında mono- ya da dimetilasyonu katalize ederek ilaç bağlanma afinitesini azaltırlar. Erm metiltransferazlar sadece makrolid direncinden sorumlu olmayıp benzer bağlanma bölgelerine sahip linkozamidlere ve streptogramin B antibiyotiklerinin tüm üyelerine karşı da çapraz dirence neden olmaktadır. Erm enzimleri çoğunlukla gram-pozitif stafilokoklar, streptokoklar ve enterokoklar arasında görülmekle birlikte, gram-negatif bakteriler arasında da giderek yaygınlaşmaktadır (Dzyubak ve Yap 2016).

Bakteriler antibiyotiklerin toksik etkilerinden kaçınmak için antibiyotikler tarafından inhibe edilmeyen yeni hedefler geliştirebilmektedir ve bu yeni hedefler, eskisiyle benzer biyokimyasal işlevleri yerine getirebilmektedir (Lambert 2005). Metisilin dirençli *S. aureus*'ta (MRSA) bulunan PBP2a proteini, duyarlı suşlarda bulunan PBP proteinlerinden farklı olarak β-laktamlar için azaltılmış afiniteye sahiptir (Kumar 2020). MRSA'da bu direnç, plazmitler aracılığıyla taşınmayan içsel bir dirençtir ve stafilokok kromozom kaseti (SCCmec) olarak adlandırılan büyük bir DNA fragmanında yer alan eksojen mecA geninden (*Staphylococcus sciuri* veya *Staphylococcus fleuretti*'den köken aldığı düşünülmektedir) kaynaklanmaktadır (Peacock ve Paterson 2015). Hücre duvarı sentezi sırasında, peptidoglikan zincirlerinin uzamasını ve çapraz bağlanmasını sağlayan transpeptidaz ve transglikozilasyon reaksiyonlarının katalizasyonu PBP'ler tarafından gerçekleşmektedir. β-laktam antibiyotikler PBP'lerin transpeptidasyon alanlarına bağlanarak, peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını inhibe etmekte ve böylece bakteriyel ölüme neden olmaktadır (Lade ve Kim 2023). MRSA'da bulunan PBP2a, transpeptidaz aktivitesini koruduğu için hücre duvarı inhibisyonu önlenmektedir. Fakat PBP2a'nın transglikosilaz alanı bulunmadığından dolayı transglikosilasyon için doğal PBP'ler de gereklidir. MRSA, hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için β-laktamların etkisini bu şekilde baypas edebilmektedir (Darby vd. 2023).

Bir diğer baypas stratejisi ise Enterococcus türlerinde (özellikle *E. faecium*) ve diğer gram-pozitif bakterilerde vankomisine dirençten sorumludur (Miller vd. 2014; Stogios ve Savchenko 2020). Vankomisin hücre duvarındaki D-alanin-D-alanin terminaline bağlanarak peptidoglikanın çapraz bağlanması inhibe etmektedir. Vankomisin direncinde bu aminoasit terminalinde (D-alanin-D-alanin) genellikle D-alanin-D-laktat dönüşümü ya da daha az sıklıkla D-alanin-D-serin dönüşümü görülmektedir (Ahmed ve Baptiste 2018). D-alanin-D-laktat dönüşümü antibiyotik afinitesini 1000 kat azaltarak yüksek seviyeli dirence, D-alanin-D-serin dönüşümü ise yedi kat azaltarak düşük seviyeli dirence neden olmaktadır (Miller vd. 2014). Enterokoklarda vankomisin direnciyle ilişkili on farklı gen kümesi (*vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanF vanL, vanM* ve *vanN*) tanımlanmıştır (Stogios ve Savchenko 2020). Klinikte vankomisine dirençli enterokok (VRE) izolatlarının çoğunda plazmitlere veya kromozoma yerleşmiş MGE'lerde bulunan *vanA* ve *vanB* kümeleri görülmektedir

(Miller vd., 2014). Vankomisin direnci, antibiyotik hedef modifikasyonu ve baypas stratejisine önemli bir örnektir (Munita ve Arias 2016).

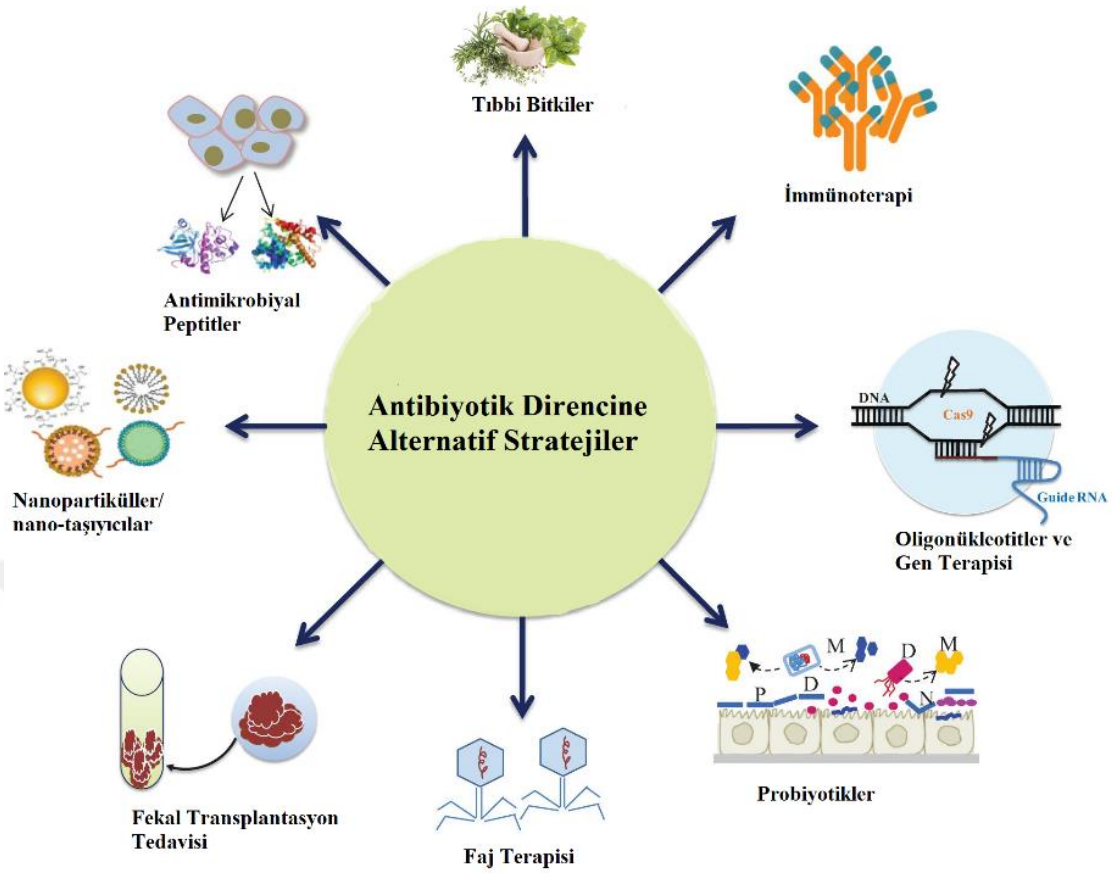
2.7. ESKAPE patojenleri

Hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonlar, bakteriler, mantarlar, virüsler gibi çok farklı ajanların; hastalar, sağlık çalışanları, kontamine ekipmanlar, ziyaretçiler ve diğer çeşitli kaynaklar yoluyla yayılmasıyla oluşan ciddi bir sorundur (Santajit ve Indrawattana 2016). Eldeki verilere göre nozokomiyal enfeksiyonların insidansının ABD'de %5, Avrupa'da %7.1 ve gelişmekte olan ülkelerde %15,5 olduğu tahmin edilmektedir (Pendleton vd. 2013). ÇİD bakterilerinin de ortaya çıkması ve giderek artmasıyla nozokomiyal enfeksiyonlara bağlı ölüm sayıları endişe verici düzeyde artmıştır (De Oliveira vd. 2020). Ayrıca bu durum hem sağlık sistemleri açısından (yoğum bakım ünitelerinin yoğunluğu ve cerrahi işlemlerdeki zorluk) hem de küresel ekonomik maliyetler (artan tedavi masrafları ve tanısal belirsizlik) açısından üzerine düşülmesi gereken bir konudur (Santajit ve Indrawattana 2016; Wang vd. 2020).

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla görülen ve antimikrobiyal ajanların biyosidal etkisinden "kaçabilen" altı bakteri türünü, ESKAPE (*E. faecium, S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp.) patojenleri olarak tanımlanmıştır (Pendleton vd., 2013). Ayrıca DSÖ tarafından yayınlanan raporda antibiyotiğe dirençli bakterilerin öncelik listesinde yer alan 12 bakteri içinde ESKAPE patojenleri de yer almaktadır. Rapora göre kritik öncelikli bakteriler arasında karbapenem dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* ile karbapenem ve üçüncü nesil sefalosporin dirençli Enterobacteriaceae bulunmaktadır (Tacconelli vd. 2018). Tüm bu nedenlerden dolayı ESKAPE patojenleri, birçok hükümet ve bilimsel kuruluş tarafından küresel açıdan en önemli sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (Wang vd. 2020).

2.8. Antibiyotik Direncine Alternatif Arayışlar

Antibiyotiklerin aşırı ve yoğun kullanımıyla birlikte antibiyotiğe dirençli bakteriler ortaya çıkmış ve bu durum enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için antibiyotiklere olan güveni azaltmıştır. Hatta bu direnç paternlerinin klinik açıdan önemli patojenlerin arasında da yayılması, hastanelerde mortalite ve morbidite oranlarında ciddi oranda artışa neden olmaktadır (Wang vd. 2020). DSÖ'nün tahminlerine göre, 2050 yılına kadar ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu ölümlerin yılda 700 binden yaklaşık 10 milyona çıkabileceği düşünülmektedir. Bu durum, bilim insanlarını dirençli patojenlere karşı yeni antimikrobiyal ajanlar ve/veya yaklaşımlar geliştirmeye yönlendirmiştir (Kumar vd. 2021).



Şekil 2.11. Alternatif antimikrobiyal tedavi kaynakları (Kumar vd. 2021)

Tıbbı bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler, bakteriyofajlar (modifiye fajlar ve lizinler), antimikrobiyal peptitler, probiyotikler, fekal transplantasyon tedavileri, immünoterapi nanopartiküller/nano-taşıyıcılar, oligonükleotitler ve gen terapisi gibi yaklaşımlar dirençli patojenlere karşı mücadelede üzerine çalışılması gereken ileriye dönük stratejilerdir (Şekil 2.11) (Allen vd. 2014; M. Kumar vd. 2021). Sekonder metabolitler ve antimikrobiyal peptitler gibi farmasötiklerin doğal antimikrobiyal etkilere ve düşük toksisiteye sahip olmaları, bu bileşiklerin antibiyotik alternatifi olarak ya da antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımını gündeme getirmiştir (Rima vd. 2021; Wang vd. 2020). Rekombinant fajlar, probiyotikler, immünoterapi ve fekal transplantasyon tedavileri ise insan mikrobiyotasının düzenlenmesini ve bağışıklık sisteminin güçlenmesini sağlar. Böylece dirençli patojenlere karşı yeni savunma mekanizmalarının oluşması sağlanmış olur (Allen vd. 2014). Oligonükleotitler ve gen terapisi, direkt olarak bakterilerin direnç mekanizmalarını hedef alarak, ilgili direnç geninin inaktive edilmesini sağlayarak bakterilerin yeniden duyarlı hale gelmesini sağlayabilir (Kumar vd. 2021). Direnç mekanizmalarını hedef alan bir diğer strateji ise nanopartiküller/nano-taşıyıcılardır. Antibiyotiğin güvenli bir şekilde hedefe ulaşmasını ve etki göstermesini sağlamanın yanı sıra, bakteri hücre duvarının bozulması, biyofilm inhibisyonu, konakçıda immün yanıtın modülasyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi çeşitli etki mekanizmaları sayesinde bir antimikrobiyal ajan olarak da hareket edebilmektedir (Vassallo vd. 2020; Yeh vd. 2020).

2.9. Tıbbı Bitkiler ve Sekonder Metabolitler

Bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisi için uzun yıllardır tıpta kullanılmaktadır ve günümüzde 100 bin bitki türünün kullanımı üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. 2007 yılındaki DSÖ verilerine göre günümüzde kullanılan ilaçların %25'i geleneksel tıpta kullanılan bitkilerden türetilmiştir (Górniak vd. 2019). Bununla birlikte antimikrobiyal direncin giderek yaygınlaşmasıyla, enfeksiyon hastalıkları için kullanılan ilaç cephaneliğinin arttırılması ve yenilenmesi gerektiği anlaşılmıştır. Bu amaçla son yıllarda tıbbi bitkiler, bilim camiasının dikkatini çekmiş ve bitki ekstraktlarının, uçucu yağların ve bitki türevli bileşiklerin antimikrobiyal etki potansiyelleri bu alandaki umutları arttırmıştır (Savoia 2012).

Bitki sekonder metabolitleri, bitkilerin nitrojen metabolizmasıyla elde ettiği ve böceklere, otoburlara ve mikroorganizmalara karşı savunma mekanizması olarak kullandığı bileşiklerdir (Othman vd. 2019). Bitkilerden ekstrakte edilen sekonder bileşikler, farmakolojik aktivitelerinin değerlendirilebilmesi için aktif grup özelliklerine göre farklı fitokimyasal kategorilere ayrılmıştır. Bunlar temel olarak; flavonoidler, alkaloidler, terpenler, fenolikler, polifenoller ve kumarinler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu fitokimyasallar aktif gruplarına göre farklı şekillerde antimikrobiyal etkinlik gösterebilmektedir (Savoia 2012).

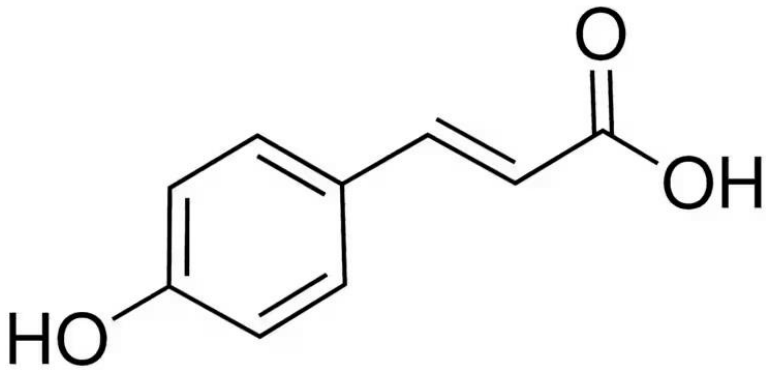
Sekonder bileşiklerin antimikrobiyal etki spektrumları oldukça geniştir. Örneğin flavonoidler, hücre membran geçirgenliğini bozabilir, hücre duvarı sentezini inhibe edebilir veya DNA giraz inhibitörü olarak çalışabilmektedir. Öte yandan çoğu alkoloid de efluks pompalarını veya tip II topoizomeraz enzimlerini inhibe edebilir (Keita vd. 2022; Khameneh vd. 2019). Yapılan çalışmalarda bir alkoloid olan piperidin türevi bileşiklerin, *S. aureus* ve MRSA'daki NorA efluks pompasının aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kumar vd. 2008). Çeşitli fenolik bileşikler ve polifenoller de benzer şekilde hücre membran hasarı, topoizomeraz ve efluks pompa inhibisyonu gibi çok geniş spektrumda etki gösterebilmektedir (Othman vd. 2019).

Sekonder metabolitlerin bu geniş etki spektrumları göze alındığında, bu bileşikler antimikrobiyal direnç sorunuyla mücadelede antibiyotik alternatifi olarak umut verici ajanlar olarak görülmektedirler (Górniak vd. 2019; Savoia 2012). Ayrıca bu fitokimyasalların antibiyotiklerle kombine olarak kullanılması, dirençli bakterilere karşı mevcut antibiyotiklerin etkinliğini korumasına ya da geliştirmesine katkı sağlayabilir. Dolayısıyla bitkilerden elde edilen/edilecek olan bileşikler, antimikrobiyal dirençle mücadelede uygun maliyetli ve yenilikçi bir strateji olarak görülmektedir (Alibi vd. 2021; Keita vd. 2022).

2.10. *p*-Kumarik Asit

4-hidroksisinnamik asit ya da yaygın adıyla *p*-kumarik asit (*p*-KA), sinnamik asit türevleri arasında yer alan ve şikimat (shikimate) yolağıyla sentezlenen bir fenolik asittir (Pei vd. 2016). Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en sık bulunan yedi sinamik asit türevi; o-kumarik asit, m-kumarik asit, *p*-KA, kafeik asit, ferulik asit (FA) ve sinapik asittir (Marcato vd. 2022). *p*-KA bitki ve mantarların sekonder metabolizmasında merkezi bir rol oynar çünkü çeşitli fenolik asitlere, flavonoidlere ve lignin öncüllerine dönüşebilmektedir (Pei vd. 2016). *p*-KA yaygın olarak mısır, yulaf,

buğday gibi tahıllarda ve elma, üzüm, portakal, domates, patates ve ıspanak gibi meyve ve sebzelerde bulunur (Jun Li vd. 2022; Pragasam vd. 2013). Yapılan çalışmalarda *p*-KA'nın, karsinogenez, ateroskleroz, nöronal hasar ve anti-inflamatuar aktiviteler gibi çeşitli patolojik durumlara karşı koruma sağladığı kanıtlanmıştır (Kheiry vd. 2019). Fenil hidroksil grubu sayesinde antioksidan özelliklere sahip olan *p*-KA'nın ayrıca antimikrobiyal, anti-ülser, anti-mutajenik özelliklere sahip olduğu da bildirilmiştir (Pei vd. 2016; Pragasam vd. 2013).



Şekil 2.12. *p*-kumarik asidin yapısı [3-(4-hidroksifenil) -2-propenoik asit]

Bitkilerden ekstre edilen fenolik asitlerin genel olarak antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin gram-negatiflere (*E. coli, P. aeruginosa*) göre gram-pozitiflerde (*S. aureus, S. epidermidis, Lactobacillus* spp.) daha etkili olduğu çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (Cueva vd. 2010; J. Liu vd. 2020).

p-KA'nın antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek amacıyla da birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada üç gram-pozitif ve üç gram-negatif bakteri üzerinde çalışılmış ve *p*-KA'nın test edilen tüm patojenlerin büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir Gram pozitiflerden *S. aureus, Streptococcus pneumonia* ve *Bacillus subtilis*'in hepsi için MIK_{50} = 20 µg/mL; Gram negatiflerden *E. coli* için MIK_{50} = 80 µg/mL, *Shigella dysenteriae* için MIK_{50} = 10 µg/mL ve *Salmonella typhimurium* için de MIK_{50} = 20 µg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada *p*-KA'nın dış ve iç membranların geçirgenliğini arttırdığı ve DNA çift sarmalındaki fosfat anyonuna bağlanabildiği tespit edilmiştir (Lou vd. 2012).

Bir diğer çalışmada ise hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin, *B. subtilis, E. coli* ve *Lactobacillus* spp. üzerindeki antimikrobiyal etkisi pH, lipofilite ve yapıdaki çift bağlar üzerinden karşılaştırılmış ve sonuç olarak pH'nın düşmesisinin ve lipofilitedeki artışın her iki bileşiğin de antimikrobiyal aktivitesini etkilediği ortaya konmuştur. Ek olarak, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin yapısındaki temel fark olan yan zincirdeki çift bağın, hidroksisinnamik asitlerin antibakteriyel aktivitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Sánchez-Maldonado vd. 2011).

p-KA'nın, domuz ve tavuk eti gibi gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılması üzerinde de çeşitli *in vitro* ve *in situ* çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada *p*-KA, kafeik asit ve rutinin antioksidan yeteneği ve bunların antibakteriyel gıda koruyucu özellikleri ikili gıda sistemlerinde (tavuk çorbası antimikrobiyal

testlerde; domuz eti ise duyusal testlerde) çalışılmış ve bileşiklerin tavuk çorbasından izole edilmiş *S. aureus*'un gelişimini başarılı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Stojković vd. 2013). Bir diğer gıda çalışmasında ise, pastörize meyve sularında en çok karşılaşılan *Alicyclobacillus acidoterrestris* patojenine karşı *p*-KA'nın antibakteriyel aktivitesi çalışılmış (MİK= 0.2 mg/mL), agaroz jel ve floresan spektroskopisi sonuçları, *p*-KA'nın bakteri DNA çift sarmalının oluklarına (gloove) yerleşerek, bozulmuş proteinlere bağlanarak ve hücre membran bütünlüğünü bozarak antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Jun Li vd. 2022).

Bag ve Chattopadhyay (2017) tarafından yapılan bir çalışmada nisin ve *p*-KA'nın gıda kaynaklı bakterilerden *Bacillus cereus* ve *S. typhimurium*'a karşı sinerjistik, antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre *p*-KA tek başına *B. cereus*'a karşı (MİK= 0.104 mg/mL) *S. typhimurium* ile karşılaştırıldığında (MİK= 0.041 mg/mL) daha yüksek bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Ayrıca *p*-KA, bireysel etkilerinde *B. cereus* biyofilmine karşı %63.75'lük antibiyofilm etkinliği gösterirken, *S. typhimurium* için bu değer %52.65 olarak tespit edilmiştir. Ek olarak *p*-KA'nın nisin ile kombinasyonu her iki bakteriye karşı sinerjistik etki oluşturmuş ve bu kombinasyonun her iki bakteri biyofilmlerine karşı %70'in üzerinde antibiyofilm etkinliği göstermiştir (Bag ve Chattopadhyay 2017).

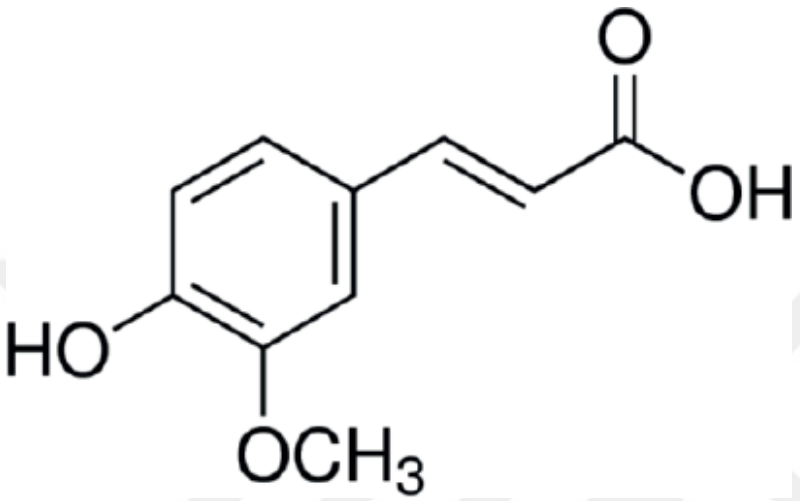
2.11. Ferulik Asit

Sinnamik asit türevi olan bir diğer fenolik bileşik ise Ferulik asittir (FA). Birçok bitkide yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen FA, yaygın olarak kepekli tahıllar, ıspanak, maydanoz, üzüm, pirinç, buğday, arpa, elma, portakal, kahve ve yer fıstığı gibi çeşitli bitki türlerinden elde edilebilmektedir (Berton vd. 2020; Ou ve Kwok 2004). Sinnamik asit türevlerinin sahip olduğu fenil halkasına bağlı olan hidroksil ve metoksi gruplarının sayısına bağlı olarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir. Dolayısıyla FA, reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya nitrojen oluşumunun inhibisyonunu ve aynı zamanda serbest radikallerin nötralizasyonunu sağlayan güçlü antioksidasyon özelliklere sahiptir (Marcato vd. 2022; Zduńska vd. 2018). Doğal olarak ve bol miktarda ekstrakte edilebilmesi, düşük toksisitesi ve sentetik bileşiklere kıyasla yüksek biyouyumluluğu nedeniyle FA; gıda, biyomedikal, farmasötik ve kozmetik uygulamalarda büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antikanser ve anti-aritmik aktivite de dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir (Berton vd. 2020; Zduńska vd. 2018).

FA'nın gram-pozitif, gram-negatif bakterilere ve mayalara karşı geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Ergün vd., 2011). Gastrointestinal sistemde yer alan bakterilerle (*E. coli, K. pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter koseri* ve *P. aeruginosa*) yapılan bir çalışmada FA, kafeik asit ve klorojenik asidin arilamin N-asetiltransferaz aktivitesi üzerindeki olası etkileri değerlendirilmiş ve bileşiklerin, bakterilerde arilamin N-asetiltransferaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Lo ve Chung 1999).

Gallik asit ve FA'nın antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğini çeşitli bakterilerde (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* ve *L. monocytogenes*) çalışılmıştır. Çalışma sonucunda her iki fenolik bileşiğin de biyofilm oluşumu üzerinde önleyici etkiye sahip olduğu ve gram-negatif bakterilerin oluşturduğu biyofilm kütlesini daha

yüksek oranda azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca iki bileşik de test edilen tüm bakterilere karşı %70'in üzerinde antibiyofilm aktivitesine sahiptir (Borges vd. 2012). Gallik asit ve FA, hücre membranlarında lokal yırtılma veya gözenek oluşumuna neden olduğu ve membran özelliklerinde (yük, hücre içi ve hücre dışı geçirgenlik ve fizikokimyasal özellikler) geri dönüşü olmayan değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir (Borges vd. 2013).

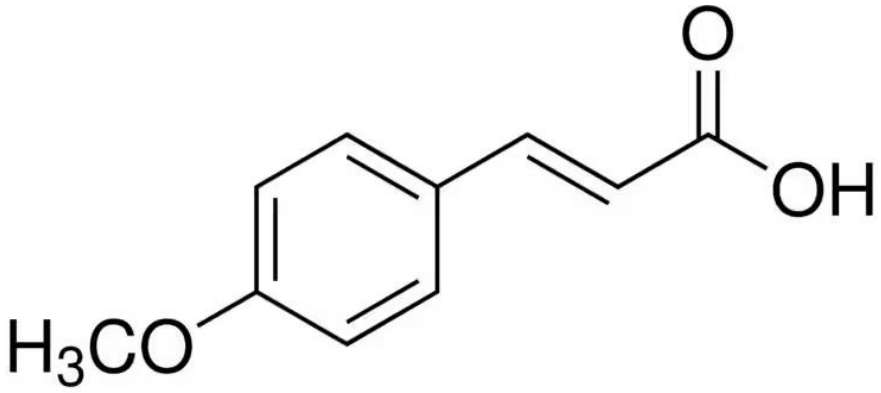


Şekil 2.13. Ferulik asidin yapısı [3- (4-hidroksi-3-metoksifenil) prop-2-enoik asit]

Başka bir çalışmada ise gıda kaynaklı fırsatçı bir patojen olan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla görülen *Cronobacter sakazakii*'ye karşı FA'nın antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Olası antimikrobiyal etki mekanizması anlamak açısından pH, membran potansiyeli ve hücre içi ATP konsantrasyonundaki değişiklikler ölçülmüştür. Sonuç olarak FA'nın *C. sakazakii* suşlarına karşı 2.5 ila 5.0 mg / mL arasında değişen MİK değerleri ile etki gösterdiği, ayrıca pH'da azalma, hücre membran hiperpolarizasyonu ve ATP konsantrasyonunda azalma tespit edilmiştir. Dolayısıyla FA'nın etki mekanizmasının kısmen hücre membran hasarına bağlı olduğu düşünülmüştür (Shi vd. 2016).

2.12. *p*-Metoksisinnamik asit

Doğal bir sinnamik asit türevi olan *p*-metoksisinnamik asit (*p*-MSA), diğer adıyla 4-metoksisinnamik asit, geniş terapötik aktivite spektrumuna sahip bir fenolik bileşiktir (Şekil 2.14). Bitkilerde özellikle kahve, yer fıstığı, karabuğday ve sorgumda yaygın olarak bulunur (Płowuszyńska ve Gliszczyńska 2021). Yapılan çeşitli araştırmalarda *p*-MSA'nın hepatoprotektif, nöroprotektif, anti-diyabetik, anti-kanser, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gibi pek çok fizyolojik etkinliğe sahip olduğu ortaya konmuştur (Wang vd. 2023).



Şekil 2.14. *p*-metoksisinnamik asidin yapısı [3-(4-metoksifenil) prop-2-enoik asit]

Çeşitli bitkilerden izole edilmiş *p*-MSA'nın, hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinliği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, yuzu (*Citrus junos*) tohumlarından ekstrakte edilen *p*-MSA, *Micrococcus luteus, S. aureus, E. coli* ve *S. enteritidis'*e karşı güçlü antimikrobiyal aktivite (sırasıyla 80, 60, 50 ve 60 µg/mL MİK değerleri) göstermiştir (Nakazono vd., 2005). Öte taraftan *Phyllostachys bambusoides*'ten ekstrakte edilen *p*-MSA ve çeşitli fenolik bileşiklerin karyojenik oral streptokoklar, *Streptococcus mutans* ve *S. sobrinus*'a karşı önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kim vd. 2011). *p*-MSA'nın bir quorum algılama (Quorum sensing) ve biyofilm oluşumunu engellediği ve ayrıca bazı virülans faktörlerin üretimini ve gen ekspresyonlarını azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cheng vd. 2020; Malheiro vd. 2019).

2.13. *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter cinsini ilk olarak 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog Beijerinck tarafından kalsiyum asetat içeren zenginleştirilmiş besiyerinde topraktan izole edilmiş ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak tanımlamıştır (Peleg vd. 2008). Günümüzde kullanılan cins tanımı olan *Acinetobacter*, Yunanca'da "hareketsiz" anlamına gelen " *Akinetos* " kavramına atıfta bulunularak, 1954 yılında Brisou ve Pr´evot tarafından *Achromobacter* cinsi içindeki hareketsiz mikroorganizmaları hareketli olanlardan ayırmak için kullanılması önerilmiştir (Brisou ve Prevot 1954; Vázquez-López vd., 2020).

1974 yılında *Acinetobacter* cinsi, *Acinetobacter calcoaceticus*'un tanımlanmasıyla birlikte Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabına dahil edilmiş ve 1986 yılından günümüze kadar taksonomisi kapsamlı bir revizyon geçirmiştir (Lessel 1971; Van Looveren ve Goossens 2004). Fenotipik yöntemlerle tür bazında sınıflandırmanın sorunlu olması nedeniyle ilk başta tek türden oluştuğu düşünülen (*A. calcoaceticus*) *Acinetobacter* cinsi, özellikle DNA-DNA hibridizasyon gibi moleküler tekniklerin kullanılmasıyla birlikte, bu cins içerisinde günümüze kadar 33 genomik tür tespit edilmiştir (Van Looveren ve Goossens, 2004; Vázquez-López vd., 2020). Ayrıca tespit edilen türler arasından A. calcoaceticus, *A. baumannii*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU'un fenotipik olarak birbirinden ayırt edilmeleri oldukça zordur. Bu nedende bu türler, *A. calcoaceticus-A. baumannii* kompleksi (ACB) içerisinde gruplandırılmıştır (Peleg vd. 2008). ACB kompleksi içerisinde yer alan türler

arasında *A. baumannii* klinik açıdan en önemli bakteri iken, *A. calcoaceticus* nadiren ciddi hastalıklara neden olan çevresel bir patojendir. Dolayısıyla ACB kompleksi tanımlaması klinik bağlamda yanıltıcı olabilmektedir (Peleg vd. 2008; Vázquez-López vd. 2020).

2.14. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*), Moraxellaceae familyasına ait gram-negatif, aerobik bir bakteridir ve mikroskop altında incelendiğinde basil ve kok (kokobasil) arası bir şekle sahiptir (Buckle 2015). *A. baumannii*, katalaz pozitif, oksidaz negatif, non-fermentatif ve hareketsiz bir bakteridir (Actor 2012). Geleneksel kültür koşullarında izole edilmesi ve çoğaltılması kolay olan *Acinetobacter* türleri, rutin olarak kullanılan çoğu agar bazlı besiyerinde 20-44°C'de (hasta izolatları ise 37°C'de) kolayca üretilebilmektedir (Actor 2012). *Acinetobacter* spp.'nin tür bazında tanımlanmasını yapmak için çeşitli moleküler yöntemler kullanılabilir. Bunlar arasında, DNA-DNA hibridizasyonu referans standart yöntem olsa da MALDI-TOF kütle spektrometresi, API 20NE, Vitek 2, Phoenix ve MicroScan WalkAway gibi ticari sistemlerle de rutin laboratuvarlarda tür tayini yapılabilmektedir. Fakat *A. baumannii, A. pittii* ve *A. nosocomialis* türlerinin bu sistemler tarafından sadece *A. baumannii* olarak tanımlanması, klinik açıdan düşündürücüdür (Wisplinghoff 2017).

2.14.1 *A. baumannii*'nin klinik önemi

A. baumannii hastane enfeksiyonlarında yaygın olarak görülen fırsatçı bir patojendir. Bakteriyemi, cerrahi alan enfeksiyonları, hastane ilişkili zatürree, menenjit, idrar yolu enfeksiyonu ve yara enfeksiyonu gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Eliopoulos vd. 2008; Hazhirkamal vd. 2021). *A. baumannii*'nin hastanelerdeki çeşitli yüzeylerde ve malzemelerde kolonize olması ve değişen çevre koşullarına karşı uzun süre hayatta kalma becerisine sahip olması, hastane ortamları açısından büyük bir endişe kaynağıdır (Taitt vd. 2014). Bu sayede organizma hastalara direkt olarak bu yüzeyler ile ya da sağlık çalışanları ve hasta yakınları aracılığıyla kolayca bulaşabilmektedir. Ayrıca *A. baumannii*'nin bir diğer önemli rezervuarı da enfekte hastalardır ve bakterinin hastalar arasında hızla yayılmasına neden olur (Cisneros ve Rodríguez-Baño 2002).

Son yirmi yılda, klinikte kullanılan neredeyse tüm antibiyotiklere karşı *A. baumannii'*nin direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Artan antibiyotik direnciyle birlikte enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm oranları da artmıştır (Alrahmany vd. 2022). A. *baumannii* enfeksiyonlarının çoğu, yoğun bakım ünitesi ortamındaki hastalarda görülmekte ve dünya çapında yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonların %20'sini temsil etmektedir (Lee vd. 2017). Yoğun bakım ünitelerinde ÇİD *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle ağır hastalarda görüldüğü için %26 ila %68 arasında değişen yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Hastalarda mortalite oranları altta yatan hastalığın şiddetiyle doğrudan ilişkili olsa da *A. baumanni* enfeksiyonlarının da artan mortalitenin bir belirteci olduğu düşünülmektedir (Eliopoulos vd. 2008). ABD'de ÇİD *A. baumannii*'nin her yıl yaklaşık 12 bin enfeksiyona ve 500 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (Nasr 2020). Tüm bu nedenlerden ötürü *A.baumannii*, klinik önemi yüksek ESKAPE patojenleri arasında yer almaktadır. Ayrıca DSÖ'nün 2018 yılı raporuna göre, karbapenem dirençli *A. baumannii'*yi antibiyotik araştırma ve geliştirme

çalışmaları için yüksek öncelikli hedeflerden birisi olarak tanımlamıştır (Tacconelli vd. 2018).

2.14.2. *A. baumannii*'de antibiyotik direnci

Antibiyotik direncinin hızla yayılmasıyla birlikte patojen bakterilerden kaynaklı enfeksiyonların tedavisi zorlaşmıştır. Bakterilerde direnç gelişimi içsel direnç ya da kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılabilir (Munita ve Arias 2016). İçsel direnç gelişimi, antibiyotik maruziyeti sonucu, antibiyotik hedefleriyle ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklı olurken; kazanılmış direnç ise, dirençli bir bakterilerden duyarlı bakterilere yatay gen transferiyle aktarılabilmektedir. *A. baumannii* de bahsedilen bu mekanizmalarla antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir (Blair vd. 2014; Holmes vd. 2016).

Antibiyotik direncinde *A. baumannii'nin* en etkileyici silahı, sahip olduğu genetik plastisitesidir. Bu sayede hızlı bir şekilde yeni genetik mutasyonlar ve re-aranjmanlar kazanabilirler. MGE'ler tarafından taşınan yabancı genetik unsurların kolay bir şekilde entegrasyonunu sağlayabilmektedirler (Kyriakidis vd. 2021). Ayrıca, biyofilm oluşturma yeteneği de *A. baumannii*'nin hastane ortamlarındaki tıbbi cihazlarda daha uzun süre hayatta kalmasını ve antibiyotiklere karşı ekstra koruyucu bariyer oluşturmasını sağlamaktadır. Bu nedenle tedavi için daha yüksek dozlarda antibiyotik gerektirirler ve bunun sonucunda antimikrobiyal direnç kaynaklı ölümlerin artmasına, hastanede kalış sürelerinin uzamasına ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktırlar (Eze vd. 2018).

Karbapenemler, ÇİD *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antibiyotik grubudur. Fakat son yıllarda yaygın kullanımları neticesinde karbapenem direnç insidansı arttığından polimiksin grubu antibiyotikler tercih edilmeye başlanmıştır (Kyriakidis vd. 2021). Polimiksinler, nefrotoksik ve nörotoksik etkileri nedeniyle uzun yıllar önce kullanımından vazgeçilmiş antibiyotik grubudur. Fakat β-laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi antibiyotiklere karşı dirençli hale gelen *A. baumannii* de dahil birçok bakteriye karşı kullanılacak "son çare" antibiyotik olduğu düşünülmektedir (Mohapatra vd. 2021). Ancak polimiksin ve tigesiklin (pandrag direnci) direncinin de artmasıyla beraber, yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması için daha fazla çaba sarf edilmesi gerekmektedir (Durante-Mangoni ve Zarrilli 2011).

A. baumannii; β-laktamazlar, AME'ler, efluks pompaları, permeabilite kusurları ve hedef bölge modifikasyonları dahil olmak üzere bir dizi direnç mekanizmasına sahiptir (Lee vd. 2017; Lin ve Lan 2014).

2.14.2.1. β-laktamazlar

β-laktamazlar, β-laktam antibiyotiklerin hidrolizini kataliz eden enzim gruplarıdır ve dört ana sınıfa ayrılmaktadır. *A. baumannii'*de TEM, GES, CTX-M, SHV, SCO, PER, CARB, VEB veya KPC gibi birçok A sınıfı β-laktamaz bulunmuştur. Bunların bazıları dar spektrumlu β-laktamazlardır (SCO-1 ve TEM-1 gibi) ve çoğunlukla penisilinlere karşı aktiftir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020). Bir kısmı seftazidim, seftriakson ve sefotaksim gibi geniş spektrumlu β-laktamların

hidrolizinden sorumlu ESBL'lerdir (CTX-M, KPC, TEM-92, SHV, GES, PER-1 ve VEB-1) (Vrancianu vd. 2020).

A. baumannii'de B sınıfı β-laktamaz grubunda ise IMP, VIM, NDM ve SIM olmak üzere dört ana tip MBL tanımlanmıştır. Bu enzimler neredeyse tüm β-laktamları güçlü bir şekilde hidrolize edebilirken, EDTA ve dipikolinik asit gibi metal şelatörler tarafından inhibe edilebilmektedir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020; Vrancianu vd. 2020).

A. baumannii, kendine özgü kromozomal olarak kodlanmış AmpC sefalosporinazlara (ADC) sahiptir. AmpC β-laktamazın varlığı, *A. baumannii'*de çoğu β-laktama karşı dirençte önemli bir rol oynar ve klavulanat, sulbaktam gibi β-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez (Lee vd. 2017; Lin ve Lan 2014). AmpC genlerine IS*Aba1* insersiyon sekanslarının eklenmesiyle AmpC indüksiyonu gerçekleşir ve bu durum geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnci arttırmaktadır (Kyriakidis vd. 2021; Lee vd. 2017).

OXA grubu β-laktamazlar olarak da adlandırılan D sınıfı β-laktamazlar karbapenem direncinin esas unsurudur (Vázquez-López vd. 2020). Yaklaşık 400'den fazla OXA tipi enzim tanımlanmıştır. A. *baumannii* suşlarında yaygın olarak bulunan OXA enzimleri ise; OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 ve OXA-235'tir (Vrancianu vd. 2020). Bu enzimler plazmit kaynaklı olabileceği gibi kromozomal lokuslarda da bulunabilir. *A. baumannii*, bazal seviyelerde kromozomal olarak kodlanmış OXA-51 grubu karbapenemaz üretebilmektedir fakat $bla_{\text{OXA-51}}$ geninin yukarı akışına eklenen IS*Aba1* insersiyon sekansları bu genin aşırı ekspresyonunu başlatarak karbapenem direncinin artmasına neden olabilmektedir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020).

2.14.2.2. Aminoglikozid modifiye edici enzimler

A. baumannii'de aminoglikozid direncinin ana mekanizması AME'lerdir. AME enzimleri, antibiyotiğin fonksiyonel gruplarının modifikasyonunu sağlan AAC, ANT ve APH olmak üzere üç enzim grubundan oluşmaktadır (Kyriakidis vd. 2021; Lin ve Lan 2014). Bu enzimler plazmitler ve transpozonlar aracılığıyla aktarıldığı için *A. baumannii* suşları arasında kolayca yayılabilmektedir. Yapılan birçok çalışmada *A. baumannii* suşlarında APH (3′)-VI, AAC (3)-I ve ANT (3")-I enzimlerinin sentezinin yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Kishk vd. 2021). Ayrıca Çin'de yapılan bir çalışmada, dört AME taşıyan ÇİD *A. baumannii* suşu tanımlanmıştır. Bu *A. baumannii* izolatlarının AME'lerin kombinasyonunu üretebildiğinin bir göstergesidir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020; Lee vd. 2017).

2.14.2.3. Dış membran proteinleri

Öte yandan *A. baumannii*'de β-laktam direnci OMP'ler aracılığıyla enzimatik olmayan yollardan da gerçekleşebilmektedir. Aslında OMP'ler sadece β-laktam direncinden değil, aztreonam, kloramfenikol ve nalidiksik asit (OmpA) gibi çeşitli antibiyotiklere karşı dirençten de sorumlu olabilmektedir (Uppalapati vd. 2020). *A. baumannii* dış membranı, OmpA, OmpW, CarO ve OprD gibi çok sayıda OMP'ye sahiptir. Bu porinler, moleküllerin dış membran boyunca taşınmasını sağlayarak *A.*

baumannii suşlarının virülansında ve antibiyotik direncinde önemli bir role sahiptir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020; Vrancianu vd. 2020). CarO ve Omp22-23 gibi bazı porinlerin ekspresyonunun azalması veya kaybı, *A. baumannii*'de artmış karbapenem direnciyle ilişkilidir (Lee vd. 2017). Ayrıca yapılan bir çalışmada OmpA ve CarO'nun, OXA-23 (karbapenemaz) ile fiziksel bir etkileşime girerek antibiyotik inaktivasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wu vd. 2016).

2.14.2.4. Efluks pompaları

A. baumannii'de dış membran hücreye antibiyotik girişini sınırlarken, çoklu ilaç efluks pompaları ise farklı antibiyotik sınıflarının hücre dışına atımını sağlamaktadır. Efluks pompaları tüm canlı hücrelerde bulunur fakat ÇİD genellikle efluks pompalarının aşırı ekspresyonuyla ilişkilidir (Vila vd. 2007). *A. baumannii*'de RND, MATE, MFS ve SMR aileleri antimikrobiyal dirençle ilişkili olduğu bildirilen dört ana efluks pompa sistemidir. Bunlar arasında en yaygın olanlar RND ve MFS sistemleridir (Abdi vd. 2020).

AdeABC, RND süper ailesinde yer alan üç bileşenli (AdeA, AdeB, AdeC), çoklu ilaç taşıyıcısıdır. Aminoglikozid ve tigesiklin başta olmak üzere çeşitli antibiyotiklere karşı dirence neden olmaktadır (Wieczorek vd. 2008). *A. baumannii'*deki AdeABC pompası, AdeRS adında iki bileşenli sistem tarafından regüle edilmekte ve bu sistemde meydana gelen mutasyonlar AdeABC'nin aşırı eksprese edilmesine neden olmaktadır (Abdi vd. 2020). *A. baumannii'*de, MFS süper ailesinde yer alan Tet (A) tetrasikline, Tet (B) tetrasiklin ve minosikline, CmlA kloramfenikole, MdfA ise siprofloksasin ve kloramfenikole karşı dirence neden olan taşıyıcı sistemlerdir. MATE ailesine bağlı AbeM ise florokinolonlara ve imipeneme, SMR ailesinden AbeS ise *A. baumannii*'de eritromisin ve kloramfenikol direnciyle ilişkili olan diğer ilaç ekstrüzyon sistemleridir (Vila vd. 2007).

2.14.2.5. Hedef bölgenin korunumu ve modifikasyonları

A. baumannii'de PBP modifikasyonları, DNA giraz mutasyonları, Tet (M) proteini aracılıyla ribozomal koruma ve LPS modifikasyonları hedef bölge korunumu ve modifikasyonlarıyla karakterize edilen direnç mekanizmalarıdır.

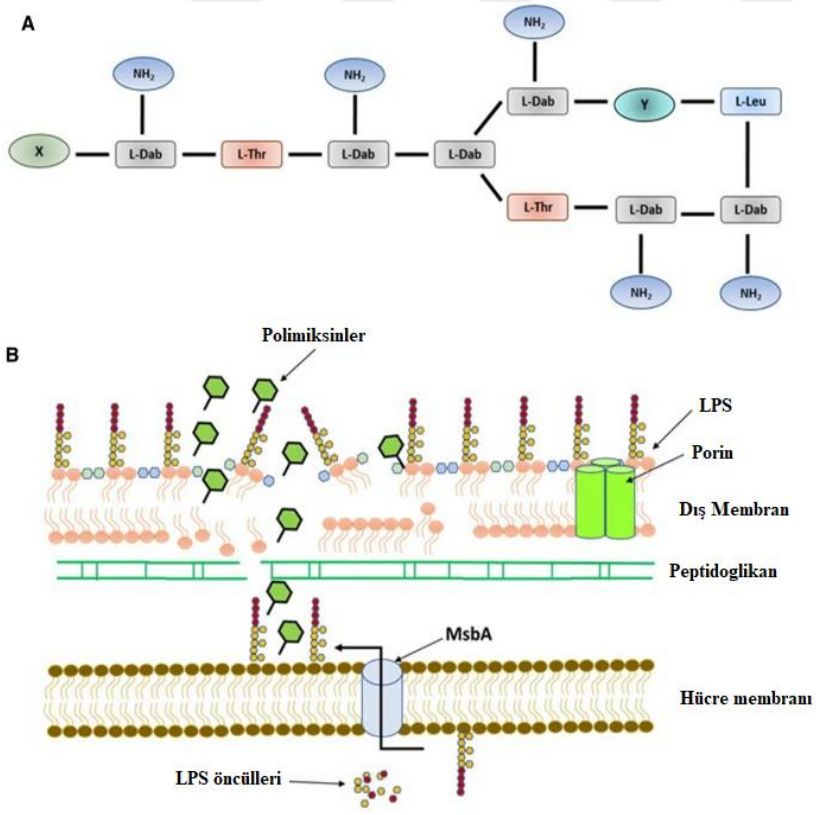
A. baumannii'de imipenem direnici β-laktamazların yokluğunda imipenem için düşük afiniteye sahip modifiye PBP'lerin aşırı ekspresyonuyla sağlanmaktadır (Lee vd. 2017; Lin ve Lan 2014). Öte yandan *A. baumannii*'de en yaygın florokinolon direnç mekanizması, *gyrA*, *gyrB* ve *parC* genlerindeki mutasyonlar yoluyla DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün modifikasyonuna dayanmaktadır. Bu bölgede gerçekleşen mutasyonlar florokinolonların enzim-DNA kompleksine afinitesini azaltarak dirence neden olmaktadır (Vrancianu vd. 2020). Tetrasiklin ve minosiklin direncine neden olan Tet (M) proteini ise hedef bölge korunumuna en iyi örnektir. *A. baumannii*'de Tet (M) proteinini kodlayan *tetM* geni *S. aures*'taki genle neredeyse %100 homolojiye sahiptir ve bu direnci birbirlerine aktardıkları düşünülmektedir. Tet (M) proteini sayesinde ribozoma bağlı tetrasiklin, bağlanma bölgesinden uzaklaştırılarak translasyonun devamı sağlamaktadır (Kyriakidis vd. 2021).

Son olarak hedef bölge modifikasyonları kapsamında değerlendirilen LPS modifikasyonları, polimiksinlere karşı dirençte ön safta yer almaktadır. *A. baumannii*, dış membrandaki lipid A'nın yapısına fosfoetanolamin (PetN) ilavesiyle (pmrCAB operonu, *mcr* genleri) ve lipid A biyosentezinde meydana gelen spontan mutasyonlar (*lpx* genleri) aracılığıyla dış membranın yapısını modifiye ederek polimiksinlere karşı direnç sağlayabilmektedir (Ayoub Moubareck ve Hammoudi Halat 2020).

2.14.3. *A. baumanni*'de kolistin direnci

2.14.3.1. Polimiksinler

Polimiksinler ilk olarak 1947'de, gram-pozitif toprak bakterisi *Paenibacillus polymyxa*'dan izole edilen yaklaşık 1,2 kDA kütleye sahip CAMP'lerdir (Mohapatra vd. 2021; Trimble vd. 2016). Polimiksinler hidrofobik bir yağ asidi kuyruğuna bağlı kısa çıkıntılı polikatyonik bir peptid halkası ile karakterize edilen küçük lipopeptid moleküllerdir. Beş farklı polimiksin türü (Polimiksin A, B, C, D ve E) bulunmaktadır (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015). Bunlar arasında klinikte yaygın olarak kullanılan kolistin ve Polimiksin E arasındaki temel fark Şekil 2.15'te de görüldüğü gibi peptit halka yapısında yer alan tek bir aminoasit farklılığıdır. Kolistinin peptit halkasında D-lösin yer alırken, Polimiksin E'de bunun yerini D-fenilalanin almaktadır (Mohapatra vd. 2021).

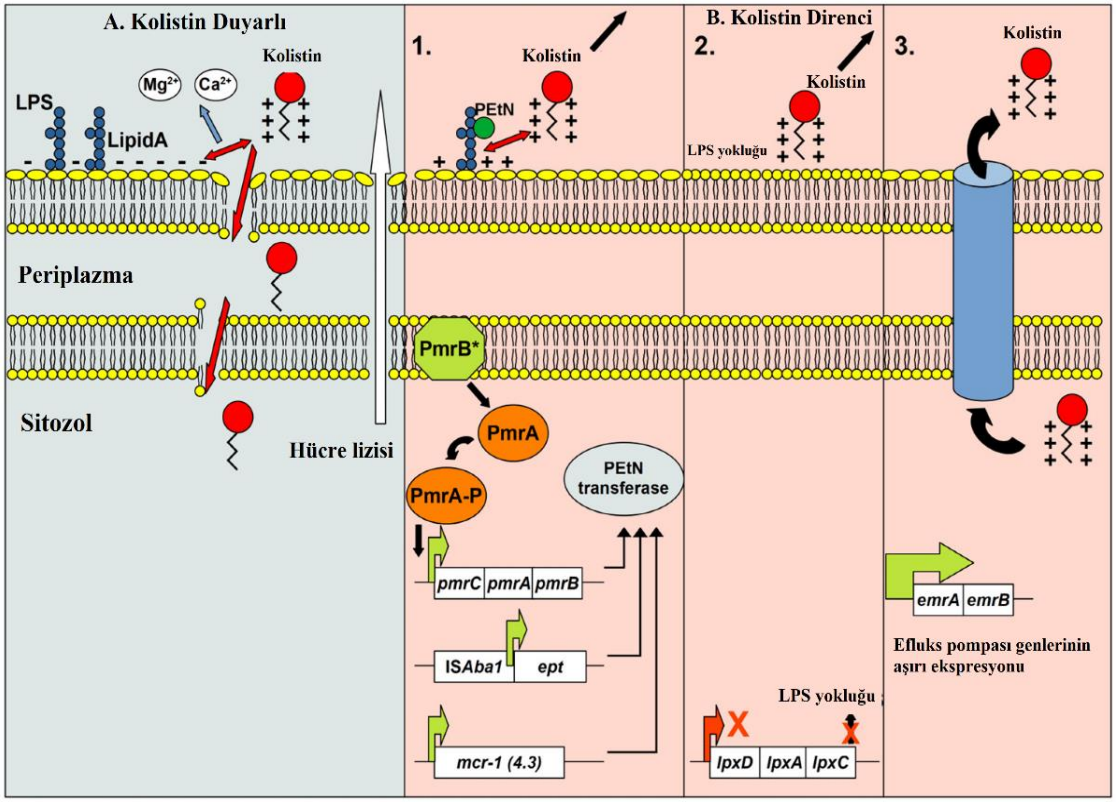


Şekil 2.15. Polimiksinlerin yapısı ve etki mekanizmaları **a**) Polimiksin B ve kolistinin yapısı (Polimiksin B ve kolistin arasındaki fark Y bölgesindeki aminoasit farklılıklarından kaynaklanır); **b**) polimiksinlerin antimikrobiyal etki mekanizması (Mohapatra vd. 2021)

Polimiksinlerin sahip olduğu katyonik peptit halkası yapıya hidrofilik özellikler katarken yağ asidi zinciri ise hidrofobik özelliklerden sorumludur. Bu özellikleriyle polimiksinler hücre membranlarına girerek yapının parçalanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.15). Ayrıca insanda gözlenen nefrotoksisite ve nörotoksisite de bu yapısal özelliğin bir sonucudur (Mohapatra vd. 2021; Trimble vd. 2016).

2.14.3.2. Kolistin etki mekanizması

Kolistin, diğer polimiksinler gibi ribozomal olmayan peptit sentetazlar tarafından üretilen, 1750 Da moleküler ağırlığa sahip polikatyonik bir antibiyotiktir (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015). Klinikte oral ve topikal kullanım için kolistin sülfat, parental kullanım içinse kolistimetat sodyum olmak üzere iki farklı kolistin formu bulunmaktadır (Novović ve Jovčić, 2023). Kolistin 1950'li yılllarda klinikte kullanılmaya başlamış fakat toksik etkileri ve aminoglikozid gibi daha az toksik antibiyotiklerin keşfiyle birlikte 1980'lerde kullanımından vazgeçilmiştir (Cai vd. 2012; Novović ve Jovčić 2023). Son yıllarda ise ÇİD gram-negatif patojenlerin artmasıyla beraber son çare olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Ne yazık ki, *A. baumanni* de dahil çoğu ÇİD bakteride kolistin direnci ve kolistin heterodirenci tanımlanmıştır (Cai vd. 2012).



Şekil 2.16. Kolistin etki mekanizması ve direncinin moleküler temelleri **a**) duyarlı patojenlerde kolistinin etki mekanizması; **b**) kolistin direnç mekanizmaları (Novović ve Jovčić 2023)

Dış membran, toksik ajanların hücre içine girişini engelleyen bir geçirgenlik bariyeri olarak çalışmaktadır. Hidrofobik ya da büyük antimikrobiyal moleküllerin

geçişini sınırlayan bu yapıda yer alan LPS'ler dış membran bütünlüğünden ve geçirgenliğinden sorumlu esas elemanlardır (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015). LPS yapısı, O antijen zinciri, bir çekirdek polisakkarit kısmı ve hidrofobik bir çapa görevi gören lipid A olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Kolistin gibi polimiksin grubu antibiyotiklerin temel hedefi lipid A ile etkileşime girerek LPS'nin ve dolayısıyla dış membranın yapısını bozmaktır (El-Sayed Ahmed vd. 2020).

Kolistin pozitif yüklü bir antibiyotik olması nedeniyle anyonik gram-negatif bakteri membranlarında birikmeye meyillidir. Pozitif yüklü kolistinin negatif yüklü lipid A ile elektrostatik etkileşimi, LPS stabilizasyonunu sağlayan iki değerlikli katyonların (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) kolistin ile yer değiştirmesine neden olmaktadır (Andrade vd., 2020; Velkov vd. 2010). Kolistinin yapısında bulunan hidrofobik terminal açil yağ zinciri Lipit A'ya bağlanır. Böylelikle Lipid A'nın yağ açil zincirlerinin paketlenmesi zayıflar ve dış membran tabakasının permeabilizasyonu bozulur (Novović ve Jovčić 2023). Bunun sonucunda dış membrana yerleşen kolistin iç membrana ulaşarak, lipofilik asit-yağ zinciri yoluyla iç membranın fosfolipit çift tabakasının bütünlüğünü bozar. Böylece membranın parçalanmasına, takiben hücre içeriğinin dışarıya salınmasına ve sonunda hücre lizisine neden olur (Andrade vd. 2020; Hamel vd. 2021).

A. baumannii'de membran hasarı dışında kolistinle ilişkili birkaç mekanizma daha tanımlanmıştır. Örneğin kolistin oksidatif stresi indükleyerek hidroksil radikal ölüm yolağı mekanizmasıyla etki edebilmektedir. Ayrıca NADH oksidaz gibi hayati öneme sahip solunum enzimlerinin kolistin tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (El-Sayed Ahmed vd. 2020; Hamel vd. 2021). Direkt olarak antimikrobiyal bir etki yaratmasa da kolistin, LPS'ye bağlanarak lipid A'nın endotoksin aktivitesini inhibe etmektedir. Gram-negatif bakterilerin endotoksinleri LPS'nin lipid A bölgesidir ve kolistin bu alana bağlanarak endotoksini nötralize etmektedir. Bu sayede şoka neden olan, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) ve İnterlökin 8 (IL-8) gibi sitokinlerin salınımı baskılanmaktadır (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015; El-Sayed Ahmed vd. 2020).

2.14.3.3. Kolistin direncinin moleküler mekanizmaları

Kolistinin etki mekanizması LPS etkileşimleriyle başlamaktadır. Dolayısıyla bakterilerde kolistin direncinin gelişimi de bu antibiyotiğin hedefi olan LPS'lerde meydana gelmektedir. *A. baumannii*'de kolistin direnciyle ilişkili üç ana mekanizma tanımlanmıştır (Beceiro vd. 2014; Vázquez-López vd. 2020). Bunlar (i) lipid A biyosentetik yolağının inhibisyonuyla membran LPS'sinin tamamen kaybı, (ii) lipid A'nın modifikasyonlarıyla LPS'nin negatif yükünün azaltılması ve (iii) efluks pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonudur (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015).

4-amino-4-deoksi-l-arabinoz (Ara4N) ve/veya fosfoetanolamin (PEtN) ilavesiyle Lipid A'da meydana gelen modifikasyonların, *Salmonella enterica* ve *P. aeruginosa* gibi birçok gram-negatif patojende kolistin direncinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Bu modifikasyonlar sayesinde, lipid A'nın negatif yükü azalmakta ve buna bağlı olarak kolistinin de membrana afinitesi azalmaktadır (Cai vd. 2012).

Ara4N modifikasyonu, PEtN modifikasyonuna kıyasla daha yaygın ve etkili bir mekanizma olsa da Ara4N biyosentezi ve bağlanmasıyla ilişkili genler *A. baumannii*'de yer almamaktadır. Bu nedenle, *A. baumannii*'deki lipid A modifikasyonuna

PmrAB'deki mutasyonlar aracılık etmektedir (Ko vd. 2017). İki bileşenli bir sistem olan PmrAB'de meydana gelen mutasyonlar, pmrCAB operonunun yukarı regülasyonuna (PEtN transferaz *pmrC*) neden olarak pEtN sentezini ve lipid A'nın 4'-fosfat veya 1'-fosfat gruplarına PEtN eklenmesini sağlamaktadır. *A. baumannii*'de kolistin direnci ile ilişkili en yaygın amino asit ikameleri, membrana bağlı bir histidin kinaz olan PmrB proteininde tespit edilmiştir (Novović ve Jovčić 2023). Ayrıca yapılan çalışmalarda, *pmrA* / *pmrB* lokusunda herhangi bir mutasyon gerçekleşmeden, başka genlerin PmrAB sisteminin aşırı ekspresyonunu tetikleyerek kolistin direncine neden oldukları düşünülmektedir (Da Silva ve Domingues 2017).

Öte yandan *A. baumannii*'de yer alan pmrC homoloğu eptA'nın aşırı ekspresyonu kolistin direncine neden olabilmektedir. Bakteride eptA geninin varlığı tek başına bir anlam ifade etmese de *eptA* geninin yukarı akışında IS*Aba1'in* bulunması, *eptA* geninin ekspresyonunu arttırarak kolistin direncine neden olabilmektedir (Gerson vd. 2020; Novović ve Jovčić 2023).

LPS modifikasyonu dışında LPS yapısının tamamen kaybedilmesi de kolistin direncine neden olmaktadır. Lipid A biyosentezinde görevli genler üzerinde (*lpxA, lpxC,* or *lpxD*) amino asit ikameleri, delesyonlar veya insersiyon sekanslarının entegrasyonu yoluyla meydana gelen değişiklikler LPS kaybından sorumludur (Da Silva ve Domingues 2017). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, tek nokta mutasyonlarından büyük delesyonlara kadar değişmekle birlikte, tamamı LPS kaybıyla eşdeğerdir. *lpxC* (P30L, P30S, N287D) ve *lpxD* (E117K) tek nokta mutasyonları kolistin dirençli *A. baumannii*'de oldukça yaygındır. Bu aminoasit ikamelerinde N287D ve E117K hem kolistin duyarlı hem de kolistin dirençli suşlarda bulunabilmektedir. Ayrıca çeşitli insersiyon sekanslarının da genlere entegrasyonu sonucunda LPS kaybı yaşanmaktadır. Yapılan çalışmalarda IS*Aba11* entegrasyonunun *lpxC ve lpxA* genlerini etkisiz hale getirdiği gözlemlenmiş ve bu durumun *A. baumannii'*de yaygın bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir (Novović ve Jovčić 2023).

Kolistin direnci sadece kromozomal düzeyde değil, plazmit aracılı da oluşabilmektedir. PtEN transferazı kodlayan mobilize kolistin direnç genleri (*mcr*), plazmit aracılı kolistin direncine en iyi örnektir. mcr-1 geni ilk olarak 2015 yılında Çin'de *E. coli* izolatlarında tanımlanmıştır (Liu vd. 2016). Bugüne kadar çeşitli çevrelerden izole edilen ve yüzden fazla varyanta sahip on farklı mcr gen ailesi (*mcr-1* ila *mcr-10*) bulunmaktadır. Fakat *A. baumannii*'de bunlardan sadece dört tanesi (*mcr1* ila *mcr-4*) tanımlanmıştır (Ibrahim vd., 2021). *mcr-1* ve *mcr-4.3* varyantları *A. baumannii* izolatlarında en sık karşılaşılan *mcr* ailesidir. Bu izolatların büyük bir çoğunluğu tek bir mcr genini ya da farklı *mcr* ailelerinin kombinasyonlarını (*mcr-1, mcr-2* ve *mcr-3*) taşımaktadır. Ayrıca mcr taşıyan *A. baumannii* izolatlarının çoğunun ÇİD'e sahip olması da oldukça önemli bir durumdur (Novović ve Jovčić 2023).

Kolistin direncine sebep olan bir diğer unsur da efluks pompa sistemleridir. *A. baumannii*'de EmrAB efluks pompa sistemlerinin kolistin direncine katkı sağladığı belirlenmiştir (Lin vd. 2017). Ayrıca kolistin dirençli suşlarda MacAB ve AdeIJK efluks pompalarının bileşenlerini kodlayan genlerin (*adeI, adeC, emrB, mexB* ve *macAB*) yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Boinett vd. 2019). Yapılan bir başka çalışmada efluks pompası inhibitörü olarak kullanılan karbonil siyanür 3-klorofenilhidrazonun *A. baumannii*'de kolistin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Ni vd. 2016). Bu durum

efluks pompa sistemlerinin de kolistin direncine katkı sağladığını düşündürmektedir (Da Silva ve Domingues 2017).

2.14.4. *A. baumannii* biyofilminin oluşumu ve antibiyotik direncine katkısı

Biyofilmler, hücre dışı polimerik madde (EPS) matriksi ile kaplanmış biyotik ve/veya abiyotik yüzeye yapışan mikroorganizma topluluklarıdır (Asfaw 2019). *A. baumannii* biyofilminin temel bileşimleri; EPS, protein, hücre dışı nükleik asitler, su ve minerallerden oluşmaktadır. Bunlardan EPS, biyofilmin üç boyutlu yapısını şekillendiren ve çeşitli polisakkaritlerden oluşan önemli bir bileşendir (Rajangam ve Narasimhan 2024). Yapılan çalışmalarda *A. baumannii* EPS'lerinin %70-80 oranında mannoz, yaklaşık %8-10 oranında glikoz ve galaktoz içerdiği ve ayrıca eser miktarlarda arabinoz, galakturonik asit ve N-asetil-glukozaminden oluştuğu tespit edilmiştir (Bales vd. 2013).

Biyofilm yapısı; ilk temas, mikro koloni oluşumu, biyofilm olgunlaşması ve son olarak biyofilmin ayrılması/dağılması süreçleriyle oluşmakta ve bu süreçlerin tümü quorum algılama (QS) tarafından kontrol edilmektedir. Biyofilm oluşumu, biyotik ve/veya abiyotik yüzeye ilk temas/bağlanmayla başlamaktadır. Bu aşamada bakteri yüzeye gevşek ve geri dönüşümlü olarak bağlanır. Ardından mikroorganizmalar yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunur. Tutunmanın stabil hale gelmesinin ardından bakteri hücreleri çoğalmaya başlayarak yüzeyde mikro koloniler meydana getirirler (Rather vd. 2021). Mikro koloniler besin kaynağına bağlı olarak daha organize ve kompleks bir yapı geliştirdiğinde biyofilm olgunlaşması meydana gelmektedir. Matris içerisindeki bakteriler oto-indükleyiciler olarak bilinen sinyal moleküleriyle popülasyon yoğunluklarını kontrol etmektedir. Bu kontrol için bakteriler QS olarak bilinen hücre-hücre sinyal mekanizmasıyla iletişim kurmaktadır. QS sayesinde biyofilmin besin kaynaklarına ulaşımı ve antibiyotiklere karşı direnci artmaktadır (Gedefie vd. 2021).

A. baumannii'de QS sistemi, iki bileşenli sistem AbaI/AbaR tarafından düzenlenmektedir (Pakharukova vd. 2018). Bir QS molekülü olan ve oto-indükleyici sentaz *abaI* tarafından üretilen N-Açil Homoserin Lakton (AHL), homolog reseptör AbaR ile etkileşime girerek biyofilmin olgunlaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca AHL, bakterinin biyofilm oluşturması ve yüzeye yapışması için gerekli bir faktör olarak belirtilen Csu-pilus ekspresyonunu da teşvik etmektedir (Rajangam ve Narasimhan 2024).

Biyofilm oluşumunun son aşamasında ise sesil hücrelerin tekrar hareketli hücrelere dönüşmesiyle biyofilmin dağılması meydana gelmektedir. Doğal bir biçimde gerçekleşen biyofilm dağılması, EPS'nin sakkarolitik enzimler tarafından parçalanmasıyla devam etmektedir (Gedefie vd. 2021). Biyofilm oluşumu, biyofilm yapısından bakterilerin ayrılması ve başka yüzeylerde yeniden kolonize olarak biyofilm oluşturmasıyla bir sirkülasyon dahilinde devam etmektedir (Jamal vd. 2018).

A. baumannii'de biyofilm oluşumda ve korunumda görev alan önemli birkaç protein bulunmaktadır. Biyofilm ilişikli protein (Bap) bunlardan biridir ve abiyotik yüzeylere ilk yapışma, biyofilm olgunlaşması ve korunmasında görev alan önemli bir proteindir (Brossard ve Campagnari 2012). β-1,6- N asetil glukozamin ise *A. baumannii* biyofilminin hücre dışı matriksinde bulunan baskın polisakkarittir ve 3 boyutlu biyofilm

yapısının korunumunu sağlamaktadır (Pompilio vd. 2021). Csu pilusu ise *A. baumannii*'nin abiyotik yüzeylere bağlanmasına ve biyofilm oluşturmasına katkıda bulunan bir virülans faktörüdür. Bu faktör, enfeksiyon sırasında bakterinin insan epitel hücrelerine ve dokularına yapışma potansiyelini arttırmaktadır (Ahmad vd. 2023).

Önemli nozokomiyal patojenlerden biri olan *A. baumannii*, biyofilm oluşturma kabiliyeti sayesinde hastane ortamlarında ve tıbbi cihazlarda uzun süre hayatta kalabilmektedir (Pakharukova vd. 2018). Biyofilm, hastalar arasında enfeksiyonun yayılmasına yardımcı olmaktadır (Jamal vd., 2018). Ayrıca bakterilerin biyofilm oluşturmaları, antibiyotiklere karşı dirençli olmalarının bir başka yoludur (Qi vd. 2016).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteri Suşları ve Kimyasalların Hazırlanması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli hasta örneklerinden izole edilmiş 5 adet kolistin dirençli *A. baumannii* (KOLR-Ab) klinik izolatı ve kontrol olarak kullanılacak olan kolistin dirençli *E. coli* NCTC 13846 suşu stok kültürlerden açılarak Kanlı besiyerine (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ABD) ekilip 37 °C'lik etüvde çoğaltılmıştır. Bakteriler çalışma süresince 10 alt pasajı aşmayacak şekilde çoğaltılmış ve ihtiyaç halinde stoktan tekrar açılarak kullanılmıştır. Muhafaza amacıyla bakteriler -20 °C ve -80 °C'de gliserol stoklarında saklanmıştır.

Deneyler için kullanılacak kolistin antibiyotiği Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD), *p*-KA, FA ve *p*-MSA ise BostonChem (Boston, ABD) temin edilmiştir. Kolistin için 512 µg/mL stok solüsyonu hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır. *p*-KA *ve p*-MSA için 1024 µg/mL, FA için ise 4096 µg/mL'lik stok çözeltiler saf etanol kullanılarak hazırlanmış ve − 20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Saptaması

Sinnamik asit türevlerinin ve kolistinin MİK değerlerinin belirlenebilmesi için CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (CLSI 2020). Besiyeri olarak, katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB) kullanılmış ve testin uygulanması için çalışılacak tüm bakterilerin 0.5 McFarland (1x 10^8 hücre/ml) standart yoğunluğuna göre süspansiyonları hazırlanmıştır. Test edilen maddelerin uygun konsantrasyon aralıkları Şekil 3.1'deki gibi belirlenmiş ve stok solüsyonları hazırlanmıştır. Ardından bu stoklardan gerekli dilüsyonlar hazırlanarak test için kullanılmıştır. Öncelikle besiyerinden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu steril plakların her bir kuyucuğuna eklenmiştir. Daha sonra test edilecek ajanlardan 50 µl alınarak ilk kuyucuğa konulmuş ve ardından seri dilüsyonları yapılmıştır. Son olarak bakteri süspansiyonundan 50 µl her bir kuyucuğa eklenmiş ve böylece her kuyucuk 100 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca bir kuyucukta bakteri büyüme kontrolü (MHB+mikroorganizma), bir kuyucukta da besiyeri sterilite kontrolü (MHB) yapılmıştır. Mikrotitrasyon plakları 37°C'lik etüvde normal atmosferde bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

Bakteriyel büyüme, kuyucukların dip kısmında beyaz pelletin varlığı ile ortaya konulmaktadır. "MİK" bakteriyel büyümenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Her bir deney dört kez tekrar edilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	K-
B	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	K+	K-
C	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	K+	K-
D	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	K+	K-
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.1. Test edilecek maddeler için belirlenen konsantrasyon aralıkları (tüm değerler µg/mLcinsinden verilmiştir); A1-10 arası kolistin için, B1-10 arası *p*-KA için; C1-10 arası FA için; D1-10 arası ise *p*-MSA için belirlenen konsantrasyon aralıklarını belirtmektedir; K+, Bakteriyel büyüme kontrolü; K-, Sterilite kontrolü

3.3. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi

Antibiyotik ile sinnamik asit türevlerinin kombinasyonlarının test edilmesinde kullanılan standart yöntemlerden biri olan dama tahtası (checkerboard) yöntemi, mikrodilüsyon esasına dayanan sinerji testlerinden biridir. Test, Moody (2010) tarafından açıklanan yönteme göre çalışılmıştır. Besiyeri olarak, CAMHB kullanılmış ve her iki farklı madde kombinasyonunun etkinliği, her bir izolat için 96 kuyucuklu plak üzerinde test edilmiştir.

Konsantrasyon aralığı, daha önce tespit edilen MİK değerinin iki katı (2xMİK) MİK değeri ile başlanmış ve üç ila dört dilüsyon aşağısı MİK değerine (1/8xMİK, 1/16xMİK) inecek şekilde ayarlanmıştır. Plak üzerinde her iki ilacın MİK değerleri dama tahtası testi ile eş zamanlı olarak tekrar çalışılmıştır. Bu yüzden Şekil 3.2'de tasvir edildiği gibi, son iki sütun (A11-F11, A12-F12) ajanların MİK'lerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Diğer kuyucuklara ise her bir maddeden 50 µl, toplamda bir kuyucukta 100 µl konsantrasyon olacak şekilde konulmuştur. G11ve H11 kuyucukları bakteri üreme kontrolü, G12 ve H12 kuyucukları ise besiyeri sterilite kuyucuğu olarak kullanılmıştır.

Bakteri inokulumu ilk olarak 0.5 McFarland (1x 10^8 hücre/ml) standart yoğunluğuna göre hazırlanmış olup en son bakteri konsantrasyonu 5x10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Buradan da her kuyucuğa 10 µl bakteri inokulumu dağıtılmıştır. Mikrotitrasyon plakları 37°C'lik etüvde normal atmosferde bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Her bir deney dört kere tekrar edilmiştir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A_1B_1	A_2B_1	A_3B_1	A_4B_1	A_5B_1	A_6B_1	A_7B_1	A_8B_1	A_9B_1	$A_{10}B_1$	$MİK_A$	$MİK_B$
B	A_1B_2	A_2B_2	A_3B_2	A_4B_2	A_5B_2	A_6B_2	A_7B_2	A_8B_2	A_9B_2	$A_{10}B_2$		
C	A_1B_3	A_2B_3	A_3B_3	A_4B_3	A_5B_3	A_6B_3	A_7B_3	A_8B_3	A_9B_3	$A_{10}B_3$		
D	A_1B_4	A_2B_4	A_3B_4	A_4B_4	A_5B_4	A_6B_4	A_7B_4	A_8B_4	A_9B_4	$A_{10}B_4$		
E	A_1B_5	A_2B_5	A_3B_5	A_4B_5	A_5B_5	A_6B_5	A_7B_5	A_8B_5	A_9B_5	$A_{10}B_5$		
F	A_1B_6	A_2B_6	A_3B_6	A_4B_6	A_5B_6	A_6B_6	A_7B_6	A_8B_6	A_9B_6	$A_{10}B_6$		
G	A_1B_7	A_2B_7	A_3B_7	A_4B_7	A_5B_7	A_6B_7	A_7B_7	A_8B_7	A_9B_7	$A_{10}B_7$	K+	K-
H	A_1B_8	A_2B_8	A_3B_8	A_4B_8	A_5B_8	A_6B_8	A_7B_8	A_8B_8	A_9B_8	$A_{10}B_8$	K+	K-

Şekil 3.2. Dama tahtası sinerji testi; A ve B kombinasyonu çalışılacak iki farklı maddeyi temsil eder; MİK, Minimum inhibitör konsantrasyonu; K+, Bakteriyel büyüme kontrolü; K-, Sterilite kontrolü;

Sonuçların yorumlanması için aşağıdaki formüller kullanılarak, önce kullanılan her iki maddenin ayrı ayrı Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu (FİK) hesaplanmış, sonra da FİK indeks (FİKİ) bulunmuştur.

$FİK_a$= a maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/a maddesinin tek başına MİK değer,

$FİK_b$= b maddesinin kombinasyondaki MİK değeri/b maddesinin tek başına MİK değer,

$FİK_İ$= $FİK_a$ + $FİK_b$ olmak üzere çıkan değer;

FİKİ ≤ 0.5 ise sinerjistik etki,

0.5 < FİKİ ≤ 4 ise indiferan etki,

FİKİ > 4 ise antagonistik etki olarak yorumlanmıştır.

3.4. Biyofilm Üretiminin Tespiti

KOLR-Ab suşlarının biyofilm üretim kapasitesinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon plaka bazlı Kristal viyole (CV) testi, Kırmusaoğlu (2019) tarafından açıklanan yöntemde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bakteriler %0.2 glikoz içeren MHB besiyeri içerisine ekilerek 37 °C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir. Aynı besiyeri kullanılarak 0.5 McFarland'a ($1x10^8$ hücre/ml) göre ayarlanan bakteri süspansiyonu, son konsantrasyon $5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hazırlanarak, 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrotitrasyon plakalara inoküle edilmiştir. Sadece besiyeri içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ardından mikrotitrasyon plakları 37°C'lik etüvde normal atmosferde bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından mikrotitrasyon plakları PBS ile iki/üç kez nazikçe yıkanmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa 200 µl metanol (%99) ilave edilerek 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda metanol kuyucuklardan uzaklaştırılarak plaka tamamen kuruyana kadar (yaklaşık 30 dk) bekletilmiş ve böylece fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Ardından her kuyucuğa 200 µl % 0.1 CV solüsyonu eklenerek oda

sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak için kuyucuklar PBS ile üç defa yıkanmış ve ardından 150 µL %95 etanol kuyucuklara eklenerek 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. CV ile boyanmış biyofilmin optik yoğunluğu, 575 nm dalga boyunda, Thermo Labsystem Multiscan Spectrum mikrotitrasyon plaka okuyucu (Thermolabsystem, Chantilly, VA, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir deney dört kere tekrar edilmiştir.

İzolatların biyofilm üretimi eşik değerleri (OD_E) negatif kontrolle karşılaştırılarak yapılmış ve bu bağlamda sınıflandırılmıştır.

OD İzolat ($OD_İ$) = Ortalama OD izolat – Ortalama OD Negatif Kontrol (OD_N), buna göre;

$OD_İ < OD_N$, biyofilm üretimi yok

$OD_N < OD_İ < 2 \times OD_N$, zayıf biyofilm üretimi

$2 \times OD_N < OD_İ \leq 4 \times OD_N$, orta derecede biyofilm üretimi

$4 \times OD_N < OD_İ$, güçlü biyofilm üretimi olarak izolatlar sınıflandırılmıştır.

3.5. Antibiyofilm Aktivitenin Tayini

Antibiyofilm aktivitenin araştırılması için ise 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon plaka bazlı CV testi, Kırmusaoglu (2019) ve Haney vd. (2021) tarafından belirtilen yöntemlerde çeşitli değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bakteriler %0.2 glikoz içeren MHB besiyeri içerisine ekilerek 37 °C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir. Aynı besiyeri kullanılarak 0,5 McFarland'a ($1x10^8$ hücre/ml) göre ayarlanan bakteri süspansiyonu, son konsantrasyon $5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Belirlenen MİK ve FİK değerleri esas alınarak, 100 µl ajan ve 100 µl bakteri süspansiyonu 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrotitrasyon plakanın kuyucuklarına inoküle edilmiştir. Sadece besiyeri içeren kuyucuklar negatif kontrol, sadece besiyeri ve bakteri içeren kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikrotitrasyon plakları 37°C'lik etüvde normal atmosferde bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından mikrotitrasyon plakları PBS ile iki/üç kez nazikçe yıkanmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa 200 µl metanol (%99) ilave edilerek 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda metanol kuyucuklardan uzaklaştırılarak plaka tamamen kuruyana kadar (yaklaşık 30 dk) bekletilmiş ve böylece fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Ardından her kuyucuğa 200 µl %0.1 CV solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak için kuyucuklar PBS ile üç defa yıkanmış ve ardından 150 µL %95 etanol kuyucuklara eklenerek 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. CV ile boyanmış biyofilmin optik yoğunluğu, 575 nm dalga boyunda, Thermo Labsystem Multiscan Spectrum mikrotitrasyon plaka okuyucu (Thermolabsystem, Chantilly, VA, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir deney dört kere tekrar edilmiştir.

Antibiyofilm indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

% Biyofilm büyümesi = (100 × Örnek OD_{575}/Büyüme Kontrolü OD_{575})

3.6. Hücre Membran Hasarının Ölçülmesi

Hücre membran hasarı ölçümü, Köse (2022) tarafından açıklanan yönteme göre uygulanmıştır. Başlangıçta bakteriler MHB içerisinde 35 ±2 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri kültürü daha sonra 4000xg'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve pelet iki kez PBS ile yıkanmıştır. Bakteri süspansiyonlarına belirlenen konsantrasyonlarda ajanlar (1 × MİK, 1/2 × MİK ve 1/4 × MİK konsantrasyonları) eklenmiştir. Sadece PBS ve bakteri içeren süspansiyon ise kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm numuneler 3 saat boyunca 35 ±2 °C'de inkübe edildikten sonra 15 dakika boyunca 13400×g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Süpernatantın absorbansı $(A)_{260}$, sitoplazmadan salınan nükleik asit miktarını belirlemek için UV–Vis spektrofotometresi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir deney dört kere tekrar edilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Biyofilm ve hücre membran hasarı çalışmalarında elde edilen tüm değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. Analizler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) kullanılarak yapılmıştır. Dunnett'in çoklu karşılaştırma post-testi ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) deneylerin sonuçlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grafikler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) yazılımı kullanılarak çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Maddelerin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen hasta örneklerinden izole edilmiş ve kolistin dirençli olduğu tespit edilmiş 5 adet kolistin dirençli *A. baumannii* (KOLR-Ab) klinik izolatına karşı; KOL, *p*-KA, FA ve *p*-MSA MİK değerlerinin belirlenmesi için CLSI tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon testi uygulanmıştır. Elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sıvı mikrodilüsyon testleri sonucunda elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bakteri Suşları	MİK (µg/mL)			
	KOL	*p*-KA	FA	*p*-MSA
KOLR-Ab1	32	256	1024	512
KOLR-Ab2	64	256	1024	512
KOLR-Ab3	64	256	1024	256
KOLR-Ab4	128	256	512	256
KOLR-Ab5	64	128	1024	128

KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* suşları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, Ferulik asit; *p*-MSA, *p*-metoksisinnamik asit; MİK, minimum inhibitör konsantrasyonu

Elde edilen sonuçlara göre, öncelikle tüm KOLR-Ab izolatlarının kolistin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu, sıvı mikrodilüsyon testiyle doğrulanmıştır. CLSI (2020) standartlarına göre kolistinin sınır değerleri; ≤ 2 duyarlı, ≥ 4 ise dirençli olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kalite kontrol suşu olarak kullanılan *E. coli* NCTC 13846 suşu için kolistinin MİK değeri 4 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Kolistin, KOLR-Ab izolatlarına karşı 32-128 µg/mL aralığında değişen MİK değerleri ile etki göstermiştir. KOLR-Ab1 için 32 µg/mL, KOLR-Ab2, KOLR-Ab3, KOLR-Ab5 izolatları için 64 µg/mL, KOLR-Ab4 için ise 128 µg/mL MİK değeri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kolistine en yüksek direnç gösteren izolat KOLR-Ab4 olarak tespit edilirken en düşük direnci ise KOLR-Ab1 izolatı sergilemiştir.

KOLR-Ab suşlarına karşı diğer üç ajanın MİK değerlerine bakıldığında, *p*-KA için KOLR-Ab5 (128 µg/ml) izolatı dışındaki diğer tüm izolatlara karşı 256 µg/mL MİK değeri elde edilmiştir. FA, KOLR-Ab4 izolatı (512µg/ml) hariç, diğer tüm izolatlara karşı 1024 µg/mL MİK değeri ile etki göstermiştir. Son olarak *p*-MSA için ise KOLR-Ab1, KOLR-Ab2 izolatlarında 512 µg/ml, KOLR-Ab3 ve KOLR-Ab4 izolatlarında 256 µg/mL ve KOLR-Ab3 izolatında 128 µg/mL MİK değeri tespit edilmiştir.

4.2. Dama Tahtası (Checkerboard) Sinerji Testi

KOL + *p*-KA, KOL + FA ve KOL + *p*-MSA kombinasyonlarının beş *A. baumannii* izolatına karşı aktivitesi dama tahtası sinerji testi ile değerlendirildi. Seçilen izolatlar arasında çalışılan tüm kombinasyonlar için gözlemlenen ortalama FICI değerleri; KOL + *p*-KA için Çizelge 4.2'de, KOL + FA için Çizelge 4.3'te, KOL + *p*-MSA için Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. KOL + *p*-KA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları

Bakteri Suşları	KOL			*p*-KA			Kombinasyon	
	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{KOL}$	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{p\text{-}KA}$	FİKİ	Sonuç
KOLR-Ab1	32	1	0.03	256	32	0.13	0.16	Sinerji
KOLR-Ab2	64	4	0.06	256	32	0.13	0.19	Sinerji
KOLR-Ab3	64	2	0.03	256	32	0.13	0.16	Sinerji
KOLR-Ab4	128	2	0.02	256	32	0.13	0.15	Sinerji
KOLR-Ab5	64	2	0.03	128	32	0.25	0.28	Sinerji

KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; $MİK_T$, ajanın tek başına MİK değeri; $MİK_K$, ajanın kombinasyonda aldığı MİK değeri; FİK, Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu; FİKİ, FİK indeksi

Çizelge 4.2'ye bakıldığında KOLR-Ab izolatlarına karşı tüm KOL + *p*-KA kombinasyonlarının, ≤ 0.5 FİKİ değerleriyle sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca tüm KOLR-Ab izolatlarının FİKİ değerleri 0.15-0.28 arlığında yer almaktadır. Bu suşlar üzerinde herhangi bir indiferan veya antagonistik etki tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.3. KOL + FA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları

Bakteri Suşları	KOL			FA			Kombinasyon	
	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{KOL}$	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{FA}$	FİKİ	Sonuç
KOLR-Ab1	32	1	0.03	1024	128	0.125	0.15	Sinerji
KOLR-Ab2	64	2	0.03	1024	128	0.125	0.15	Sinerji
KOLR-Ab3	64	2	0.03	1024	128	0.125	0.15	Sinerji
KOLR-Ab4	128	1	0.01	512	256	0.50	0.51	İndiferan
KOLR-Ab5	64	4	0.06	1024	64	0.06	0.12	Sinerji

KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; FA, Ferulik asit; $MİK_T$, ajanın tek başına MİK değeri; $MİK_K$, ajanın kombinasyonda aldığı MİK değeri; FİK, Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu; FİKİ, FİK indeksi

KOLR-Ab izolatlarına karşı KOL + FA kombinasyonunun etkisi incelendiğinde, kombinasyonun dört izolata karşı sinerjistik etki gösterdiği ve sadece KOLR-Ab4 izolatına karşı indiferan (0.51 ≥ 0.5) etki gösterdiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Sinerjistik etki gösteren izolatklar için FİKİ değerleri bir izolata karşı (KOLR-Ab5) 0.12, üç izolata karşı da (KOLR-Ab1, KOLR-Ab2, KOLR-Ab3) 0.15 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. KOL + *p*-MSA kombinasyonlarının dama tahtası sinerji testi sonuçları

Bakteri Suşları	KOL			*p*-MSA			Kombinasyon	
	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{KOL}$	$MİK_T$	$MİK_K$	$FİK_{p\text{-MSA}}$	FİKİ	Sonuç
KOLR-Ab1	32	1	0.03	512	32	0.06	0.09	Sinerji
KOLR-Ab2	64	2	0.03	512	32	0.06	0.09	Sinerji
KOLR-Ab3	64	1	0.02	256	64	0.25	0.27	Sinerji
KOLR-Ab4	128	2	0.02	256	32	0.13	0.14	Sinerji
KOLR-Ab5	64	1	0.02	128	32	0.25	0.27	Sinerji

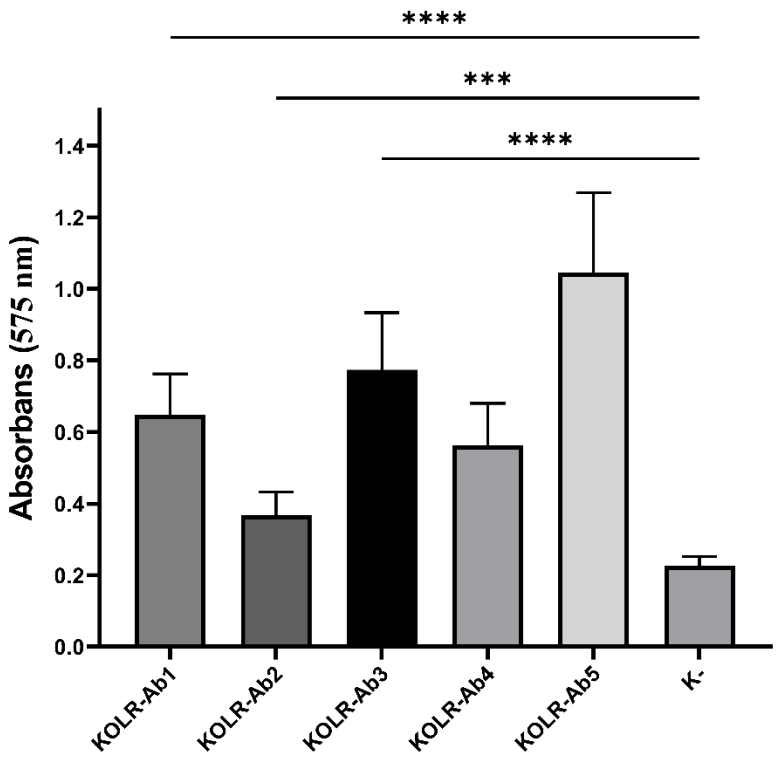
KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; $MİK_T$, ajanın tek başına MİK değeri; $MİK_K$, ajanın kombinasyonda aldığı MİK değeri; FİK, Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu; FİKİ, FİK indeksi

KOL + *p*-MSA kombinasyonun KOLR-Ab izolatları üzerindeki etkileri ve hesaplanan FİKİ değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Sonuçlara tüm KOLR-Ab izolatlarına karşı KOL + *p*-MSA sinerjistik etki göstermiş, herhangi bir indiferan veya antagonistik etki gözlemlenmemiştir. Kombinasyon sonucunda KOLR-Ab1 ve KOLR-Ab2 suşları için 0.09, KOLR-Ab3 ve KOLR-Ab5 suşları için 0.27, KOLR-Ab3 ve KOLR-Ab5 suşları için ise 0.14 FİKİ değerleri elde edilmiştir.

4.3. Biyofilm Üretiminin Tespiti

KOLR-Ab izolatlarının biyofilm üretim kapasiteleri mikrotitrasyon plaka bazlı CV tekniğiyle belirlenmiş ve sonuçlar negatif kontrol ile karşılaştırılarak Şekil 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre izolatlar sınıflandırıldığında, KOLR-Ab5'in güçlü biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Diğer izolatlardan üçü (KOLR-Ab1, KOLR-Ab3, KOLR-Ab4) orta derecede biyofilm üreticisi, KOLR-Ab2 izolatının zayıf biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.1'e bakıldığında en yüksek biyofilm üretiminin KOLR-Ab5 izolatında, en düşük biyofilm üretiminin ise KOLR-Ab2 izolatında olduğu görülmektedir. Biyofilm üretimi açısından diğer izolatlar ise yüksekten düşüğe doğru sırasıyla KOLR-Ab3, KOLR-Ab1, KOLR-Ab4 olarak sıralanmaktadır.



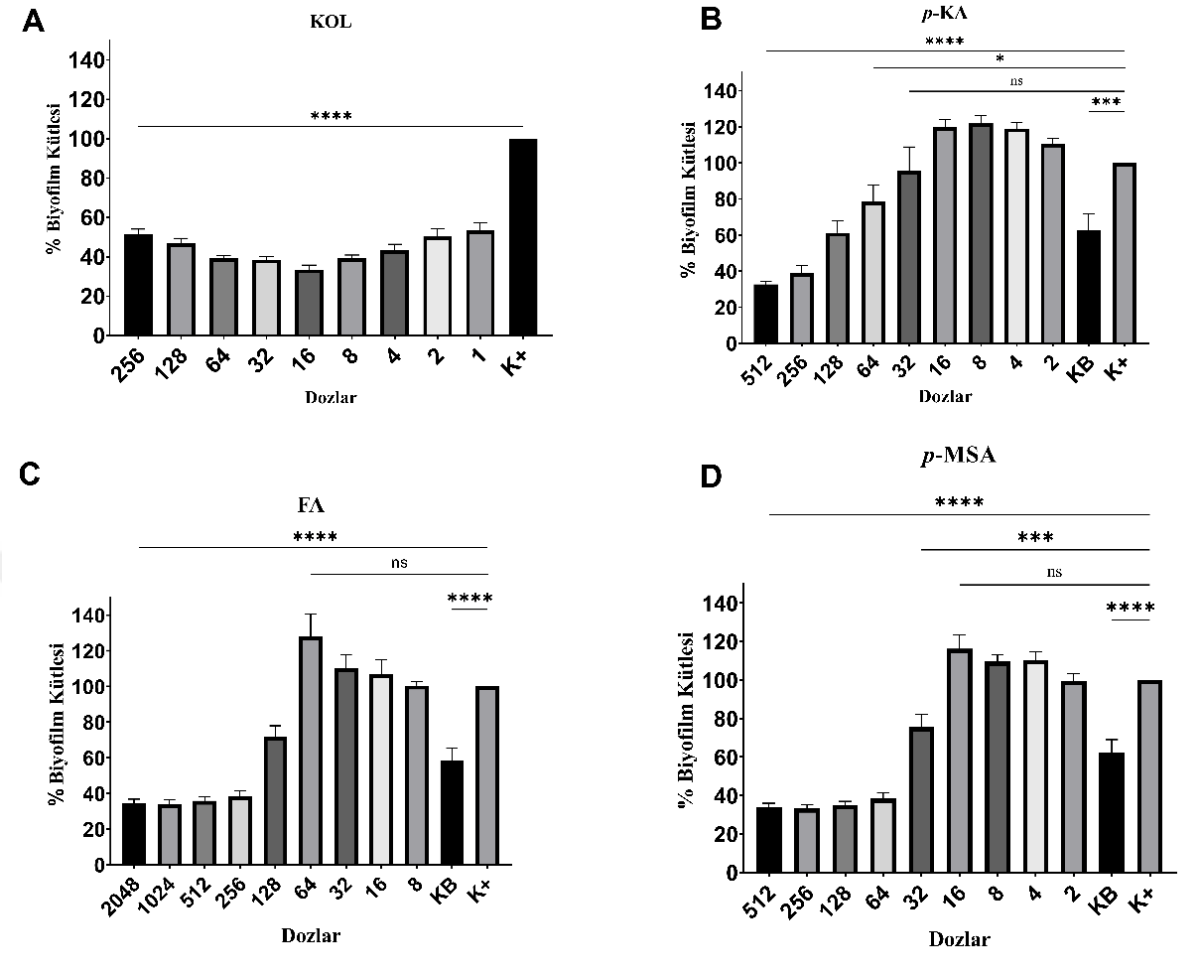
Şekil 4.1. KOLR-Ab izolatlarının biyofilm üretim kapasiteleri; KOLR-Ab, Kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; K-, negatif kontrol (***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$)

4.4. Antibiyofilm Aktivite

Kolistinin ve diğer ajanların (*p*-KA, FA, *p*-MSA) KOLR-Ab izolatlarına karşı antibiyofilm aktiviteleri mikrotitrasyon plaka bazlı CV tekniğiyle belirlenmiştir. KOLR-Ab2 suşu zayıf biyofilm aktivitesi gösterdiğinden dolayı bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmadan elde edilen tüm sonuç grafikleri Şekil 4.2- 4.5'te verilmiştir.

Şekil 4.2'de tüm ajanların KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri verilmiştir. Buna göre uygulanan tüm kolistin dozları, KOLR-Ab1 izolatı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki göstermiştir ($p \leq 0.0001$). Ayrıca kolistinin tüm dozlarının yaklaşık %46.6 ila %66.5 oranında KOLR-Ab1 izolatının biyofilm oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2a).

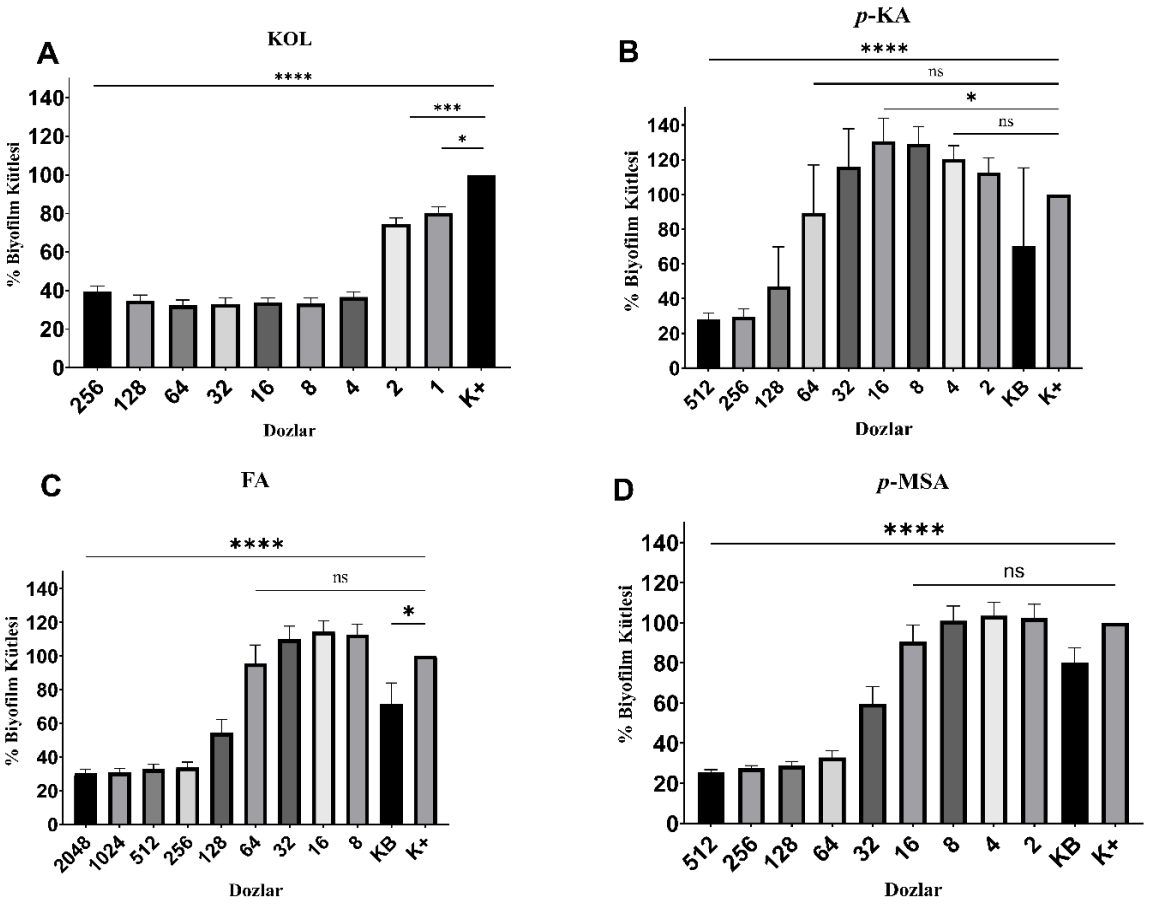
Şekil 4.2b'de ise *p*-KA'nın KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri görülmektedir. *p*-KA'nın, 512-128 µg/ml doz aralığında yaklaşık %38.7 ila %67.34 ($p \leq 0.0001$), 64 µg/ml'de ise %21.4 oranında ($p \leq 0.001$) biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. 32-2 µg/ml doz aralığında istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki tespit edilememiştir ($p > 0.05$). Ayrıca kolistin ve *p*-KA kombinasyonunun, biyofilm oluşumunu %37.3 oranında inhibe ettiği saptanmıştır ($p \leq 0.001$).



Şekil 4.2. Maddelerin KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi; **a)** Kolistinin antibiyofilm aktivitesi; **b)** *p*-KA'nın antibiyofilm aktivitesi; **c)** FA'nın antibiyofilm aktivitesi; **d)** *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi; KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, ferulik asit; *p*-MSA, *p*-metoksisinnamik asit; KB, kombinasyon; K+, pozitif kontrol (ns, $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$)

Şekil 4.2c incelendiğinde FA'nın KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri görülmektedir. FA'nın 2048-128 µg/mL doz aralığında %28.1 ila %68.5 oranında ($p \leq 0.0001$) biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. 64-8 µg/ml doz aralığında istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki göstermemiştir ($p > 0.05$). Kolistin ve FA kombinasyonunun ise biyofilm oluşumunu %41.7 oranında önlediği görülmektedir ($p \leq 0.001$).

Son olarak Şekil 4.2d'de ise *p*-MSA'nın KOLR-Ab1 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri verilmiştir. *p*-MSA'nın 512-64 µg/mL doz aralığında %61.7 ila %65.9, 32 µg/ml'de % 24.5 oranında antibiyofilm aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. 16-2 µg/mL doz aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir antibiyofilm aktivite göstermediği saptanmıştır. Kolistin ve *p*-MSA kombinasyonunun ise biyofilm oluşumunu %41.7 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir ($p \leq 0.001$).



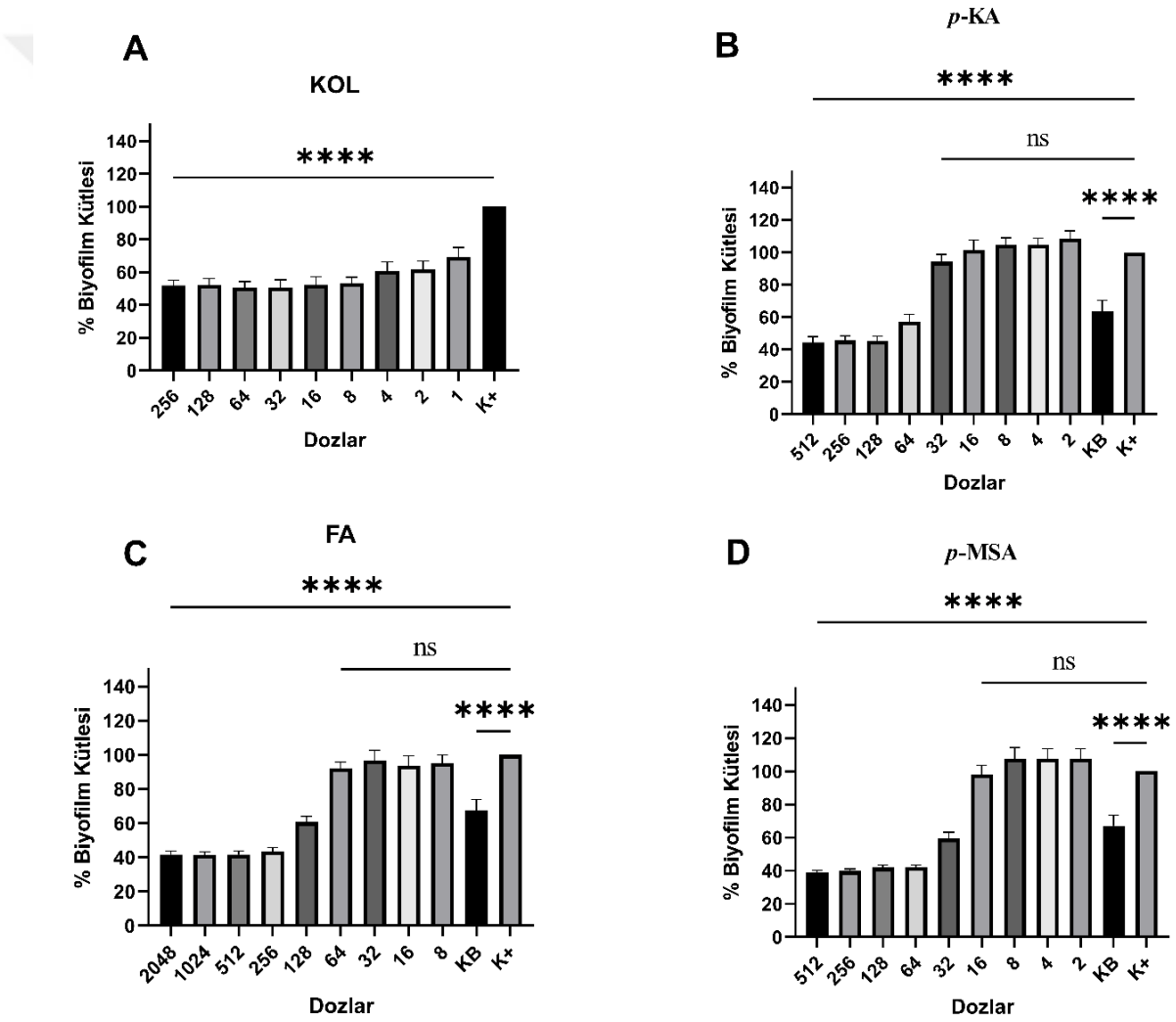
Şekil 4.3. Maddelerin KOLR-Ab3 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi; **a)** Kolistinin antibiyofilm aktivitesi; **b)** *p*-KA'nın antibiyofilm aktivitesi; **c)** FA'nın antibiyofilm aktivitesi; **d)** *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi; KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, ferulik asit; *p*-MSA, *p*-metoksisinnamik asit; KB, kombinasyon; K+, pozitif kontrol (ns, $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$; ****, $p \leq 0.0001$)

Şekil 4.3'te tüm ajanların KOLR-Ab3 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri verilmiştir. Buna göre uygulanan tüm kolistin dozları KOLR-Ab3 izolatı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki göstermiştir ($p \leq 0.05$). Ayrıca kolistinin tüm dozları yaklaşık %20 ila %60.5 oranında KOLR-Ab3 izolatının biyofilm oluşumunu baskılamıştır (Şekil 4.3a).

Şekil 4.3b incelendiğinde *p*-KA'nın KOLR-Ab3 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri görülmektedir. *p*-KA, 512-128 µg/ml doz aralığında yaklaşık %52.8 ila %71.8 ($p \leq 0.0001$), 64 µg/ml'de ise %21.4 oranında ($p \leq 0.001$) biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. 32-2 µg/ml doz aralığında istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca kolistin ve *p*-KA kombinasyonu biyofilm oluşumunu %29.7 oranında inhibe etmiştir ($p \leq 0.001$). Öte yandan *p*-KA 16 µg/ml ve 8 µg/ml'de istatistiksel olarak biyofilm oluşumunu yaklaşık %20 oranında arttırmıştır ($p \leq 0.05$).

FA'nın KOLR-Ab3 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi Şekil 4.3c'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde FA'nın 2048-128 µg/ml doz aralığında güçlü bir antibiyofilm etki gösterdiği görülmektedir ($p \leq 0.0001$). FA bu doz aralığında KOLR-Ab3 izolatının biyofilm üretimini %45.7 ila %69.7 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Fakat FA, 64-8 µg/ml doz aralığında ise KOLR-Ab3 izolatına karşı istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm aktivite göstermemiştir ($p> 0.05$). FA'nın kolistin ile kombinasyonu biyofilm oluşumunu %28.6 oranında inhibe etmiştir ($p \leq 0.05$).

Son olarak *p*-MSA'nın antibiyofilm etkisine bakıldığında Şekil 4.3d'de görüldüğü üzere 512-32 µg/ml doz aralığında, %40.3 ila % 74.5 seviyesinde güçlü bir antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu ($p \leq 0.0001$) tespit edilmiştir. Fakat uygulanan diğer dozlarda ve kolistin ile kombinasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir antibiyofilm aktivite tespit edilememiştir ($p> 0.05$).



Şekil 4.4. Maddelerin KOLR-Ab4 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi; **a)** Kolistinin antibiyofilm aktivitesi; **b)** *p*-KA'nın antibiyofilm aktivitesi; **c)** FA'nın antibiyofilm aktivitesi; **d)** *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi; KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* izolatları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, ferulik asit; *p*-MSA, *p*-

metoksisinnamik asit; KB, kombinasyon; K+, pozitif kontrol (ns, $p > 0.05$; ****, $p \leq 0.0001$)

Şekil 4.4'te tüm ajanların KOLR-Ab4 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri verilmiştir. Buna göre uygulanan tüm kolistin dozları, KOLR-Ab4 izolatı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki göstermiştir ($p \leq 0.0001$). Ayrıca kolistinin tüm dozlarının yaklaşık %30.6 ila %48 oranında KOLR-Ab4 izolatının biyofilm oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4a).

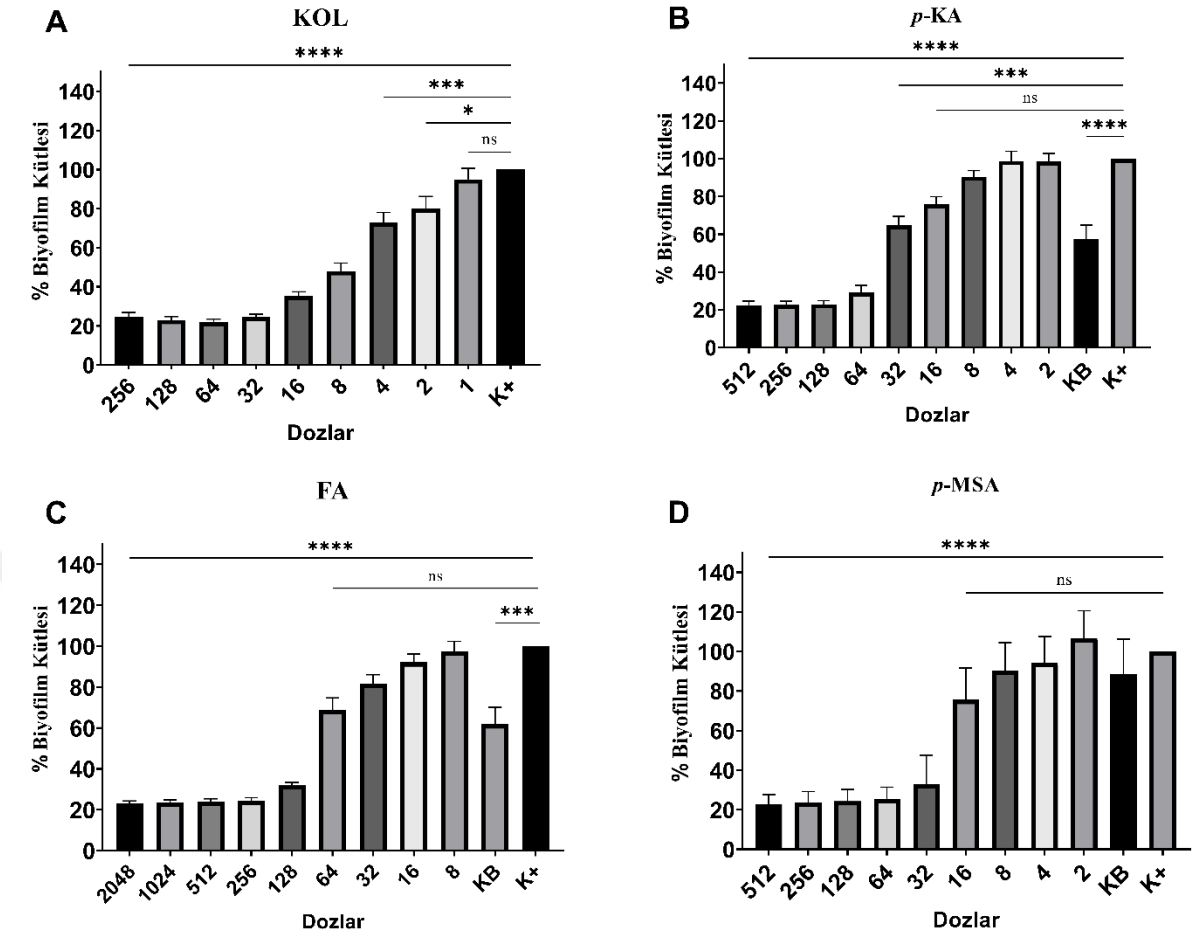
Şekil 4.4b'da KOLR-Ab4 izolatına karşı *p*-KA'nın antibiyofilm aktivitesi görülmektedir. *p*-KA, KOLR-Ab4 izolatına karşı 512-64 µg/ml doz aralığında yaklaşık % 42.9 ila % 55.5 oranında biyofilm inhibisyonu gösterirken, *p*-KA'nın kolistin ile kombinasyonu ise %36.1'lik biyofilm inhibisyonu göstermiştir ($p \leq 0.0001$). Öte yandan 32-2 µg/ml doz aralığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir antibiyofilm aktivite gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). FA'nın KOLR-Ab4 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi incelendiğinde ise, Şekil 4c'de de görüldüğü üzere, 2048-128 µg/ml doz aralığında ve FA-kolistin kombinasyonlarında güçlü bir antibiyofilm aktivite gözlemlenmiştir ($p \leq 0.0001$). FA, 2048-128 µg/ml doz aralığında biyofilm oluşumunu %39.3 ila %58.3, kolistin ile kombine kullanımında ise %32.4 oranında biyofilm oluşumunu azaltmıştır.

Şekil 4.4d'de verilen *p*-MSA'nın antibiyofilm etkisi incelendiğinde 512-32 µg/ml doz aralığında ve kolistin ile kombinasyonunda güçlü bir antibiyofilm aktivite gözlemlenmiştir ($p \leq 0.0001$). *p*-MSA, 512-32 µg/ml doz aralığında %40.5 ila %61 oranında biyofilm oluşumunu inhibe ederken, kolistin ile kombine edildiğinde biyofilm oluşumunu %32.8 oranında inhibe etmiştir. Fakat *p*-MSA'nın 16-2 µg/ml doz aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir antibiyofilm aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Şekil 4.5'te tüm ajanların KOLR-Ab5 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri verilmiştir. Buna göre uygulanan 1 µg/ml kolistin dozu hariç, diğer tüm kolistin dozları KOLR-Ab5 izolatı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki göstermiştir ($p \leq 0.05$). Bu dozlarda kolistin yaklaşık %19.7 ila %75.2 arası değişen oranlarda KOLR-Ab5 izolatının biyofilm oluşumunu baskılamıştır (Şekil 4.5a).

Şekil 4.5b incelendiğinde *p*-KA'nın KOLR-Ab5 izolatına karşı antibiyofilm aktiviteleri görülmektedir. *p*-KA, 512-64 µg/ml doz aralığında yaklaşık %77.5 ila %70.7 ($p \leq 0.0001$), 32 µg/ml'de ise %37.3 oranında ($p \leq 0.001$) biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. 16-2 µg/ml doz aralığında istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm etki gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca kolistin ve *p*-KA kombinasyonu biyofilm oluşumunu %42.7 oranında inhibe etmiştir ($p \leq 0.0001$).

FA'nın KOLR-Ab5 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi Şekil 4.4c'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde FA'nın 2048-128 µg/ml doz aralığında güçlü bir antibiyofilm etki gösterdiği görülmektedir ($p \leq 0.0001$). FA bu doz aralığında KOLR-Ab5 izolatının biyofilm üretimini %68.1 ila %77 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Fakat FA, 64-8 µg/ml doz aralığında ise KOLR-Ab3 izolatına karşı istatistiksel açıdan anlamlı bir antibiyofilm aktivite göstermemiştir ($p > 0.05$). FA'nın kolistin ile kombinasyonu biyofilm oluşumunu %38.2 oranında inhibe etmiştir ($p \leq 0.05$).



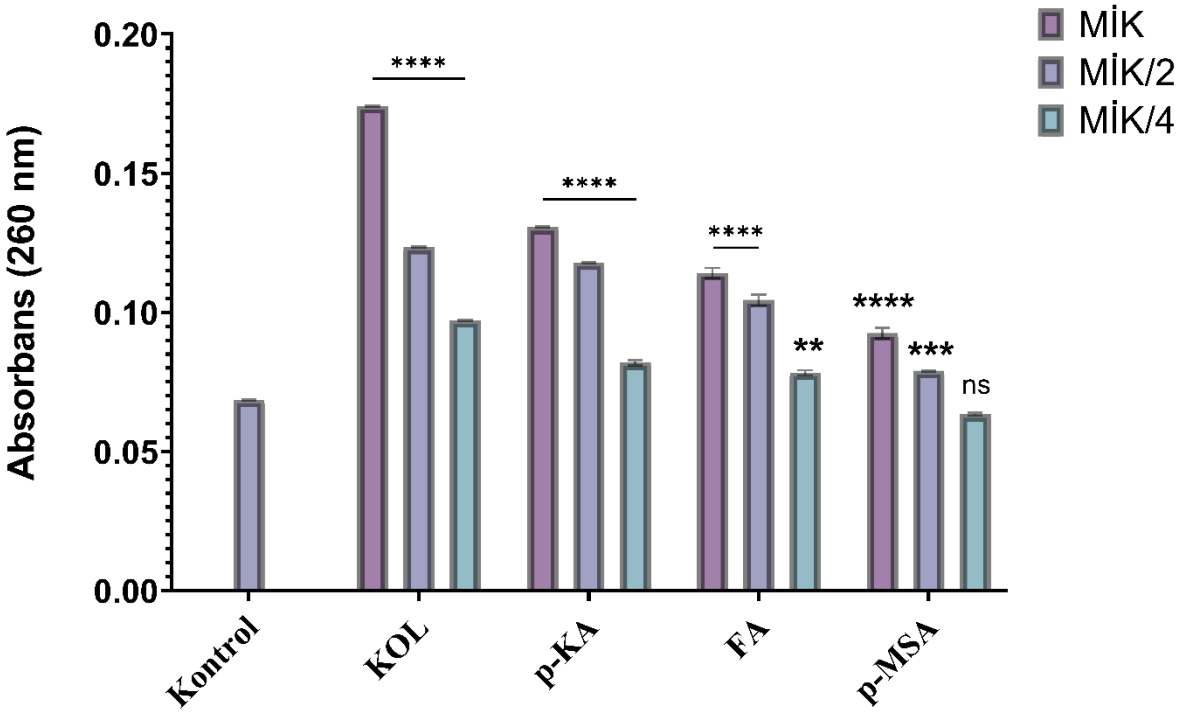
Şekil 4.5. Maddelerin KOLR-Ab5 izolatına karşı antibiyofilm aktivitesi; **a)** Kolistinin antibiyofilm aktivitesi; **b)** *p*-KA'nın antibiyofilm aktivitesi; **c)** FA'nın antibiyofilm aktivitesi; **d)** *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi; KOLR-Ab, kolistin dirençli *A. baumannii* suşları; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, ferulik asit; *p*-MSA, *p*-metoksisinnamik asit; KB, kombinasyon; K+, pozitif kontrol (ns, $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$)

Son olarak *p*-MSA'nın antibiyofilm etkisine bakıldığında Şekil 4.3d'de görüldüğü üzere 512-32 µg/ml doz aralığında, *p*-MSA % 67.2 ila % 77.2 seviyesinde güçlü bir antibiyofilm aktivite göstermiştir ($p \leq 0.0001$). Fakat uygulanan diğer dozlarda ve kolistin ile kombinasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir antibiyofilm aktivite sahip olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

4.5. Hücre Membran Hasarının Tespiti

Ajanların (KOL, *p*-KA, FA, *p*-MSA) hücre membranında oluşturduğu hasarın tespiti amacıyla, süpernatantın 260 nm'de absorbansı (sitoplazmadan salınan nükleik asit miktarı) ölçülmüştür. Şekil 4.6'da, KOLR-Ab4 suşuna karşı tüm ajanların MİK, MİK/2 ve MİK/4 değerlerindeki konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerleri verilmiştir. Herhangi bir ajana maruz bırakılmadan test edilen bakteri ise kontrol olarak kullanılmıştır. MİK/4 konsantrasyondaki *p*-MSA'nın

uygulanması ile elde edilen absorbans değeri hariç, diğer tüm absorbans değerleri ile kontrol karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p \geq 0.05$). Bulgular, bu ajanların, KOLR-Ab4 suşunun membran bütünlüğünü etkilediğini ve 260 nm'de absorbe edilen hücre içi bileşenlerin salınmasına neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca ajanların MİK değerlerinde elde edilen sonuçlar en yüksek absorbans değerini vermiştir. Kolistinin MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarıyla muamele edilen KOLR-Ab4 suşunda, kontrole kıyasla absorbans değerlerinde sırasıyla 2.54, 1.8 ve 1.42 katlık artış gözlemlenmiştir ($p \leq 0.0001$). *p*-KA'nın MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarında ise kontrole kıyasla absorbans değerlerinde sırasıyla 1.9, 1.71, 1.19 katlık bir artış tespit edilmiştir ($p \leq 0.0001$). FA'nın MİK ve MİK/2 konsantrasyonlarında kontrole kıyasla absorbans değerlerinde 1.66 ve 1.52 katlık bir artış olurken ($p \leq 0.0001$) MİK/4 konsantrasyonlarında ise 1.14 katlık bir artış gözlenmiştir. Son olarak *p*-MSA'nın MİK, konsantrasyonunda kontrole kıyasla absorbans değerlerinde 1.34 katlık bir artış elde edilirken ($p \leq 0.0001$), MİK/2 konsantrasyonunda 1.15 katlık bir artış elde edilmiştir ($p \leq 0.001$). *p*-MSA'nın MİK/4 konsantrasyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).



Şekil 4.6. KOLR-Ab4 suşuna karşı tüm ajanların MİK, MİK/2 ve MİK/4 değerlerindeki konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerleri; MİK, minimum inhibitör konsantrasyonu; KOL, kolistin; *p*-KA, *p*-kumarik asit; FA, ferulik asit; *p*-MSA, *p*-metoksisinnamik asit (ns, $p > 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$)

5. TARTIŞMA

Enfeksiyon hastalıkları yüzyıllar boyunca toplum sağlığına yönelik en önemli tehditlerden birisi olmuştur (Lindahl ve Grace 2015). Yirminci yüzyılda antibiyotiklerin keşfi ve bu alanda yapılan çalışmaların önem kazanmasıyla birlikte enfeksiyon hastalıkları büyük ölçüde kontrol altına alınmıştır. Fakat son yıllarda, gereksiz ve aşırı antibiyotik kullanımı nedeniyle artan ve hızla patojenler arasında yayılan antimikrobiyal direnç, enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan morbidite ve mortalite oranlarının tekrar yükselmesine neden olmuştur (Aminov 2009; Bbosa vd. 2014; Khardori 2006). Bu durum bilim insanlarını dirençli patojenlere karşı yeni antimikrobiyal ajanlar ve/veya yaklaşımlar geliştirmeye yönlendirmiştir (Allen vd. 2014; M. Kumar vd. 2021; Savoia 2012). Antibiyotiklerin, mevcut diğer antibiyotiklerle ya da farklı kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal ajanlarla kombine edilmesi en çok tercih edilen yaklaşımlardan birisi olmuştur (Vaou vd. 2021). Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitler, yüksek antimikrobiyal aktiviteleri ve düşük toksik etkileri sayesinde bu amaca hizmet eden kaynaklardır (Savoia 2012).

A. baumannii, özellikle yoğum bakım ünitelerindeki hastalarda bakteriyemi, menenjit ve ventilatör ilişkili pnömoni gibi ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir (Almasaudi 2018). Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ve kazanımı açısından muazzam özelliklere sahip olan *A. baumannii,* klinik açıdan yüksek öneme sahip ESKAPE patojenlerinden biridir (De Oliveira vd. 2020). Artan antibiyotik kullanımı ve hastane ortamlarındaki yoğun antibiyotik stresi bu bakterinin ÇİD'li bir patojene dönüşmesine neden olmuştur (Vázquez-López vd. 2020). ÇİD *A. baumannii*'nin tedavisi için sıklıkla tercih edilen antibiyotik grubu karbapenemlerdir. Klinikte karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının artmasıyla birlikte son çare olarak polimiksin grubu bir antibiyotik olan kolistin tedavi için kullanılmaya başlanmıştır (Qureshi vd., 2015). Fakat son yıllarda kolistin dirençli suşların rapor edilmeye başlanması, *A. baumannii* için yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesi ve yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliği açısından ciddi önem arz etmektedir (Bialvaei ve Samadi Kafil 2015; Trebosc vd. 2019).

Sinnamik asitler çeşitli bitki kaynaklarından doğal olarak elde edilen ve bu kaynaklarda bolca bulunan bir fenolik bileşiklerdir (Sova 2012). Düşük toksisitelerinin yanı sıra antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivite gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiplerdir (Letsididi vd. 2018). *p*-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitler, sinnamik asit türevleri içerisinde en yaygın bulunan bileşiklerdir (Sova 2012). Sinnamik asitlerin yapısında bulunan aromatik halka ve karboksilik asit grubun varlığı, bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerine katkı sağlamaktadır (de Morais vd. 2023; Godlewska-Zylkiewicz vd. 2020). Ayrıca sinnamik asidin aromatik halkası üzerinde oluşan farklı ikameler (*m*-hidroksi veya *p*-metoksi) çeşitli farmakolojik aktivitelere neden olabilmektedir (Sharma 2011).

Çalışmamızda, yüksek antimikrobiyal kapasiteleri ve düşük toksik etkileri göz önünde bulundurularak, çeşitli sinnamik asit türevlerinin kolistin dirençli *A. baumannii*'lere karşı antimikrobiyal, antibiyofilm ve kolistin ile sinerjistik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin bakteriyel membran hasar potansiyelleri de değerlendirilmiştir. Sinnamik asit türevleri arasında yaygın olarak bulunan ve güçlü antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bilinen *p*-KA ve FA çalışma için seçilmiştir.

Ayrıca aromatik halka ikamelerinin antimikrobiyal etkiyi nasıl değiştireceğini gözlemlemek amacıyla *p*-MSA çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda, öncelikle hastane örneklerinden izole edilen *A. baumannii*'lerin kolistine direnç seviyelerinin belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon testi yapılmıştır. CLSI (2020) standartlarına göre *A. baumannii* için kolistin sınır değerleri; ≤ 2 duyarlı, ≥ 4 ise dirençli olarak kabul edilmektedir. Çalıştığımızda tüm örneklerin kolistin MİK değerleri 32-128 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. Bu değerler izole edilen tüm *A. baumannii* izolatlarının kolistin direncine sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmada kolistin için elde edilen en yüksek direnç KOLR-Ab4 izolatında, en düşük direnç ise KOLR-Ab1 izolatında tespit edilmiştir.

p-KA, FA ve *p*-MSA'nın KOLR-Ab izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, KOLR-Ab izolatlarına karşı bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri *p*-KA> *p*-MSA> FA olarak sıralanabilir. Literatürde *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın *A. baumannii*'ye karşı direkt etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda bizim çalışmamız bu maddelerin *A. baumannii*'ye karşı etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. İçerisinde *p*-KA bulunan çeşitli bitki ekstraktlarının ÇİD *A. baumannii*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Aleks Sabo vd. tarafından yapılan bir çalışmada (2020) *Rumex crispus* L. and *Rumex sanguineus* L. ekstraktlarının *A. baumannii* izolatlarına karşı 1 ila 4 mg/mL konsantrasyon aralığında MİK değerleri verdiği tespit edilmiştir. *Cinnamomum verum* ve Brezilya yeşil propolis ekstraktlarıyla yapılan bir diğer çalışmada ise ekstrakttın renk yoğunluğundan dolayı MİK değeri belirlenememiştir (Meccatti vd. 2023).

p-KA, FA ve *p*-MSA'nın, *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis, Lactobacillus* spp., *S. pneumonia, B. subtilis,* gibi birçok gram-negatif ve gram-pozitif patojene karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları ise çeşitli araştırıcılar tarafından tespit edilmiştir. (Cueva vd. 2010; Liu vd. 2020; Lou vd. 2012; Sánchez-Maldonado vd. 2011). Lou vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada *p*-KA'nın çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış ve MİK değerleri gram-pozitif bakterilerden *S.aureus,* S. *pneumoniae, B. subtilis* için 20 µg/mL olarak, gram-negatif bakterilerden *E. coli, S. dysenteriae* ve *S. typhimurium* içinse sırasıyla 80 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. *p*-MSA'nın antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için Nakazono vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *p*-MSA'nın *M. luteus, S. aureus, E. coli* ve *S. enteritidis*'e karşı MİK değeri sırasıyla 80 µg/mL, 60 µg/mL, 50 µg/mL ve 60 µg/mL olarak tespit edilmiştir. *p*-MSA ile yapılan bir diğer çalışmada ise MİK değerleri *E. coli*'ye karşı 30 µg/mL, *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı ise 40 µg/mL olarak belirlenmiştir (Narasimhan vd. 2004). Borges vd. (2013) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise FA'nın çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve *E. coli* ile *P. aeruginosa* için 100 µg/mL, *S. aureus* ile *L. monocytogenes* için sırasıyla 1100 µg/mL ve 1250 µg/mL MİK değerleri elde edilmiştir. Sanchez-Maldonado vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, *p*-KA ve FA da dahil olmak üzere çeşitli fenolik asitlerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin antibakteriyel aktiviteye etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara göre yapıda azalan hidroksil gruplarının hidroksibenzoik asidin antimikrobiyal etkisini arttırdığı fakat hidroksinnamik asitler açısından etkinin çok fazla değişmediği ortaya konmuştur. Ayrıca hidroksi ile metoksi gruplarının ikamesinin hidroksisinnamik asitlerin aktivitesini etkilemediği gözlemlenmiştir. Bizim

çalışmamızda da sinnamik asitlerin antimikrobiyal aktiviteleri *p*-KA> *p*-MSA> FA olarak sıralandığı göz önünde bulundurularak, sinnamik asitlerin ana yapısında yer alan aromatik halkadaki hidroksi (*p*-KA) ve metoksi (*p*-MSA) ikamelerinin antimikrobiyal aktiviteyi çok fazla etkilemediği fakat hidroksisinnamik asit yapısına eklenen metoksi grubunun antimikrobiyal aktiviteyi azalttığı söylenebilir.

Başta FA ve kafeik asit olmak üzere hidroksisinnamik asit türleri hem antioksidan hem de prooksidan özelliklere sahiptir (Maurya ve Devasagayam 2010). Ibitoye ve Ajiboye (2019) tarafından yapılan çalışmada FA çeşitli *A. baumannii* izolatlarına karşı 64 µg/mL ila 256 µg/mL arasında MİK değerleri vermiş ve FA ile kombine edilen kinolon bazlı antibiyotikler sinerjistik etki göstermiştir. Araştırmacılar, FA'nın ROS üretimini arttırarak ve glutatyon seviyelerini azaltarak kinolon bazlı antibiyotiklerin antimikrobiyal etkisini güçlendirdiği sonucuna varmışlardır. Diğer bir çalışmada, geleneksel Çin tıbbı monomerleri olarak belirtilen ve içerisinde FA'nın da yer aldığı 35 bileşiğin 12 klinik ÇİD *A. baumannii* izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi ve biyofilm inhibisyon yeteneği araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, FA'nın MİK değeri 1024 µg/mL olarak tespit edilmiş olup bu suşlara karşı FA, QS inhibisyon etkisi göstermemiştir (Ou ve Kwok, 2004). Hemaiswarya ve Doble (2010) tarafından yapılan bir çalışmada yedi fenilpropanoid ile beş antibiyotiğin kombinasyonunun çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışmaya göre antibiyotiklerin çoğu bileşiklerle birlikte sinerjistik etki göstermiş ve tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitede artış yaşanmıştır. Dama tahtası ve zamana bağlı öldürme testlerine göre en etkili bileşiklerin sinnamik asit, *p*-KA ve FA olduğu belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda da kolistin ile bileşiklerin tüm kombinasyonları neredeyse tüm bakteri izolatlarına karşı sinerjistik etki göstermiştir. Sadece KOLR-Ab4 izolatına karşı kolistin ve FA kombinasyonu indiferan etki göstermiştir (FİKİ = 0.51). Bu çalışma ile elde ettiğimiz en önemli sonuçlardan biri, bileşiklerle kombinasyonu sonucunda kolistin MİK değerlerindeki gözlemlenen düşmedir. Kombinasyon testi sonuçlarına göre, kolistin MİK'leri 1 µg/mL ila 4 µg/mL seviyesine düştüğü tespit edilmiştir. En yüksek kolistin direncine sahip KOLR-Ab4 izolatında bile MİK değeri 1 µg/mL ila 2 µg/mL seviyelerine inerek yaklaşık 64 kat düşmüştür. Bu sonuçlar oldukça önemlidir çünkü kolistin, uzun yıllar önce piyasaya sürülen ve önemli nefrotoksisite ve nörotoksisite raporları nedeniyle geri çekilen bir antibiyotiktir (Lim vd. 2010; Ordooei Javan vd. 2015). ÇİD ve pandrag *A. baumannii*'den kaynaklanan enfeksiyonların büyük çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören kritik hastalarda rapor edilmektedir (Wong vd. 2017). Bu enfeksiyonların tedavisi için uzun süreli kolistin kullanımı, nefrotoksik ve nörotoksik yan etkilere neden olabilmektedir (Rychlíčková vd. 2023). Bu nedenle *p*-KA, FA ve *p*-MSA ile kombin edildiğinde kolistin MİK değerlerinde önemli derecede düşüşün ortaya konulmuş olması, bu antibiyotiğin tedavide güvenli kullanımı için umut vadedici bir sonuçtur.

A. baumannii izolatlarına karşı farklı fenolik bileşiklerin, kolistin ile kombinasyonunun antimikrobiyal etkinliği birçok çalışmada değerlendirilmiştir. Ajiboye vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada fenolik asitlerden kafeik asit, gallik asit ve protokateşik asidin ROS üretimini indükleyerek kolistin aracılı bakteri ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca dama tahtası testine göre, kolistin ve çalışılan tüm fenolik bileşikler arasında sinerjistik etkileşimler gözlemlenmiştir. Köse vd. (2023)

tarafından yapılan çalışmada ise kolistin dirençli *A. baumannii* izolatlarına karşı kuersetinin; kolistin, meropenem ve amikasin antibiyotikleriyle kombinasyonu çalışılmıştır. Çalışma sonucuna göre kolistin ile kuersetin kombinasyonunda sinerjistik etki gözlenmiş olup kolistin MİK değerlerinde 4 ila 16 kat azalma tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise ÇİD *A. baumannii* izolatlarına karşı sinnamik ve gallik asidin; imipenem, amikasin, doksasiklin kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitesi ve biyofilm ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sinnamik asidin kolistin, imipenem, amikasin veya doksisiklin ile kombine edilmesi dirençte önemli bir azalmaya yol açmıştır. Ayrıca test edilen izolatların beşinde kolistin ve sinnamik asit kombinasyonlarının, bu izolatların kolistin MİK değerlerini 4 ila 32 kat azalttığı gözlemlenmiştir (Abdelaziz vd. 2022).

A. baumannii'nin biyofilm oluşturma becerisi, bu bakterilerin hastane ortamlarındaki abiyotik yüzeylerde, yüksek oranda kuru koşullar altında hayatta kalmalarına, bu ortamlarda kolayca yayılmalarına ve antibiyotik direncine katkı sağlamaktadır (Gaddy ve Actis 2009; Gedefie vd. 2021). Yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitesinde kalan hastalardan izole edilen 100 *A. baumannii* klinik izolatının %58'inin yüksek biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturma özelliğine sahip izolatların hepsinde yaygın ilaç direnci tespit edilmiştir (Zeighami vd. 2019). Bala vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, 75 klinik izolatın %40'ının güçlü, %12'sinin orta derece ve %16'sının zayıf biyofilm üreticisi olduğu ve klinik izolatların yalnızca %32'sinin biyofilm üretmediği belirlenmiştir. Ayrıca tüm bu izolatların %63'ünde ÇİD gözlemlenmiştir. Qi vd. (2016) tarafından Çin'deki çeşitli hastanelerden toplanılan 272 klinik izolat ile yapılan bir çalışmada, *A. baumannii'*nin klinik izolatları arasında ilaç direnç paternleri ile biyofilm oluşturma yetenekleri arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Çalışmada, izolatların 249'unda biyofilm oluşumu gözlemlenmiş ve bunların %63'ünün kalite kontrol suşu ATCC 19606'dan daha güçlü biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yüksek direnç düzeyine sahip *A. baumannii* izolatlarının zayıf, daha az dirençli *A. baumannii* izolatların ise daha güçlü biyofilm oluşturma eğilimine sahip olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda, KOLR-Ab izolatlarının biyofilm üretim kapasiteleri mikrotitrasyon plaka bazlı CV tekniğiyle belirlenmiş ve sonuçlara göre izolatlardan biri güçlü, üçü orta derecede ve diğer biri de zayıf biyofilm üretimi göstermiştir. İzolatlar arasında yüksek ya da düşük kolistin direnci ile biyofilm üretim kapasitesi arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Ardından güçlü ve orta derece biyofilm üretim kapasitesine sahip izolatlara karşı kolistin, *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm klinik izolatlara karşı kolistinin nerdeyse tüm dozlarının (KOLR-Ab4 suşunda, kolistinin 1 µg/ml dozunda herhangi bir etki tespit edilmemiştir.) biyofilm oluşumunu yaklaşık %20 ila %70 oranında inhibe ettiği ortaya konmuştur. Farklı olarak, literatürde yapılan birkaç çalışmada tek başına kolistinin *A. baumannii*'de biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmadığı ve düşük antibiyotik seviyelerinde daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir (Eales vd., 2018; Song vd., 2015). Çalışmamızda, test ettiğimiz *p*-KA'nın ise genellikle 512-128 µg/mL doz aralığında klinik *A.baumannii* izolatlarında biyofilm oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Fakat, KOLR-Ab3 izolatına uygulanan 8-16 µg/ml dozlarda biyofilm oluşumunu %20 arttırmıştır. FA da 2048-128 µg/mL doz aralığında güçlü bir antibiyofilm aktivite göstermiştir. FA bu doz aralığında yaklaşık %30 ila %70 oranında

biyofilm oluşumunu baskılamıştır. Çalışılan bir diğer bileşik olan *p*-MSA ise 512-32 µg/mL doz aralığında izolatlarda biyofilm oluşumunu yaklaşık %40 ila %70 oranında azaltmıştır. Ayrıca bileşiklerin en güçlü antibiyofilm aktivite gösterdiği doz aralıklarının MİK ve FİK değerlerini kapsaması oldukça değerlidir. Kombinasyonların antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde, *p*-KA ve kolistin kombinasyonunun, KOLR-Ab3 izolatı dışındaki tüm izolatlarda yaklaşık %36 ila %42 oranında biyofilm inhibisyon yeteneği mevcuttur. FA ile kolistin kombinasyonu tüm izolatlarda %28 ila %41 oranında başarılı bir biyofilm inhibisyonu göstermiştir. Son olarak *p*-MSA ile kolistin kombinasyonu ise sadece iki izolatta (KOLR-Ab1 ve KOLR-Ab3) etkili bir şekilde biyofilm inhibisyonu sergilemiştir.

p-KA, FA ve *p*-MSA'nın birçok patojene karşı antibiyofilm aktivitesi araştırılsa da *A. baumannii* ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mumtaz vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada klinik *A. baumannii* izolatlarına karşı içerisinde FA'nın da yer aldığı çeşitli fitokimyasalların antimikrobiyal, antibiyofilm ve anti-QS aktiviteleri değerlendirilmiştir. Üç *A. baumannii* izolatına karşı FA'nın MİK değeri 12.5 µg/mL olarak tespit edilirken, bu izolatlarda biyofilm oluşumu %49 ila %69 oranında önlenmiştir (Mumtaz vd., 2023). Yapılan bir başka çalışmada ise içeriğinde *p*-KA ve çeşitli sinnamik asit türevleri bulunan *C. verum* ve Brezilya Yeşil Propolis ekstraktlarının, ÇİD *A. baumanii* ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antibiyofilm aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu ekstraktların kombine halinde kullanılmasının biyofilm oluşumunu önlemede etkili olduğu gözlemlenmiştir (Meccatti vd., 2023).

Ayrıca *p*-KA, FA, *p*-MSA'nın farklı patojenler üzerinde antibiyofilm aktivitesinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Cheng vd. (2020) yılında yapılan bir çalışmada *p*-MSA ve 4-dimetilaminosinnamik asidin, güçlü bir biyofilm üreticisi olan *Chromobacterium violaceum* için potansiyel QS ve biyofilm inhibitörleri olarak işlev görebileceği bildirilmiştir. Çalışmaya göre 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarındaki *p*-MSA, *C. violaceum*'da biyofilm üretimini %42, %48 ve %64 oranında belirgin şekilde azaltmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise idrar yolu enfeksiyonlu kadın hastalardan izole edilen *E. coli* ile inoküle edilmiş kateter parçalarında trans sinnamaldehit, *p*-KA ve FA'nın antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *p*-KA (%0.25 ve %0.5 konsantrasyonlarda) ve FA'nın (%0.5 konsantrasyonda) 5 günlük inkübasyonun ardından idrar sondası parçalarında, *E. coli* biyofilm oluşumunu önlediği belirtilmiştir (Kot vd. 2015). Xu vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, *p*-KA ve FA'nın *Salmonella enteritidis* biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada *p*-KA ve FA'nın MİK değerleri 0.5 ve 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. FA'nın *S. enteritidis*'e karşı minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyon (MBİK) değeri 1.0 mg/mL iken, *p*-KA'nın MBİK değeri 0.25 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu iki fenolik asidin 8.0 mg/mL dozlarının olgun biyofilm hücreleri üzerinde inhibitör etkisi tespit edilememiştir.

Sinnamik asitler hidrofobik karakterleri sebebiyle hücre membranında lokal gözenekler ya da yırtıklar oluşturarak hücre içi bileşenlerin dışarıya sızması yoluyla bakteriyel ölüme neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada *p*-KA ve FA'nın membran hasarı yoluyla bakteriyel ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Borges vd. 2012; Ibitoye ve Ajiboye 2019; Lou vd. 2012; Sánchez-Maldonado vd. 2011). Borges vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada gallik asit ve *p*-KA'ya maruz kalan hücrelerin

hücre yüzeyinin negativitesinde bir azalma olduğu ve 500 mg/mL'lik gallik asit ve *p*-KA konsantrasyonunun birçok bakteri için membran hasarını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Lou vd. (2012) tarafından yapılan çalışma da benzer şekilde gram-negatif bakterilerde *p*-KA'nın plazma membran permeabilitesini önemli ölçüde artırdığını ve negatif yüzey yükü nedeniyle, elektrostatik etkileşimlerle dış membrana bağlanabildiği gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada *p*-KA'nın, DNA çift sarmalındaki fosfat anyonuna bağlanabildiği ve baz çiftlerine interkalasyon yaparak replikasyon, transkripsiyon ve ekspresyonu etkileyebileceği bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise hidroksisinnamik asitlerin, hidroksibenzoik asitlerden daha fazla iyon sızıntısına ve daha yüksek proton akışına neden olduğu gösterilmiştir. Hidroksisinamik asitler arasında en güçlü etkiyi *p*-KA'nın gösterdiği ve bu etki farklılıklarının bileşiklerin yapılarındaki ve lipofilik karakterlerindeki farklılıklarla ilişkili olabileceği söylenmiştir (Campos vd., 2009). Kang vd. (2020) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, planktonik büyüme modundaki *Shigella flexneri*'nin hücre membranının, FA'ya maruz kaldıktan sonra, sitoplazmik bileşenlerin sızması, hızlandırılmış adenozin trifosfat tüketimi, hücre membran depolarizasyonu ve hücresel morfolojik değişiklikler ile karakterize edilen geri dönüşü olmayan bir yıkım sergilediği gösterilmiştir (Kang vd., 2020). Hemaiswarya ve Doble (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı antibiyotiklerle kombine edilen sinnamik asit, *p*-KA ve FA'nın bakteriyel membran hasarına neden olduğu ve bileşiklerde bulunan hidrofilik grupların bu aktiviteyi arttırdığını gösterilmiştir.

Çalışmamızda ise test edilen bileşiklerin (KOL, *p*-KA, FA, *p*-MSA) bakteri hücre membranında hasar oluşturup oluşturmadıklarını tespit etmek amacıyla, bileşikler ile bakterinin muamele edilmesi sonucu elde edilen, süpernatantın 260 nm'de absorbansı (sitoplazmadan salınan nükleik asit miktarı) ölçülmüştür. *p*-MSA'nın MİK/4 konsantrasyonu dışındaki diğer tüm ajanların memran hasarına katkı sağladığı belirlenmiştir. Sonuçlar, bu ajanların, KOLR-Ab4 suşunun membran bütünlüğüne zarar verdiğini ve dolayısıyla hücre içi bileşenlerin hücre dışına salınmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın antimikrobiyal ve sinerjistik etkilerinin; bakteriyal membranın hasarı, artan membran permeabilitesi ve hücresel içeriğin hücre dışına sızıntısıyla ilişkili olduğu, buna bağlı olarak da bileşiklerin bakteriyel ölüme neden olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Antibiyotik dirençli patojenlerin artmasıyla beraber yeni çözümler ve yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesi oldukça önemlidir. Özellikle *A. baumannii* gibi, fırsatçı ESKAPE patojenlerine karşı geliştirilen yeni stratejiler hem antimikrobiyal direncin yayılımının kırılmasında hem de bu patojenlerle ilgili enfeksiyonlarla savaşta kullanılan/kullanılacak olan en güçlü silahlardan biridir.

Çalışmamızda *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın kolistin dirençli *A. baumannii* klinik izolatlarına karşı tek başlarına ve kolistin ile kombinasyonda antimikrobiyal, antibiyofilm aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca bu ajanların bakteriyel membran hasar potansiyelleri de araştırılmıştır. Sonuçlara göre kolistin dirençli *A. baumannii* izolatlarına karşı *p*-KA (128-256 μg/mL), FA (512-1024 μg/ml) ve *p*-MSA'nın (128-512 μg/ml) güçlü antimikrobiyal etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşiklerin kolistin ile kombinasyonu sonucunda ise KOLR-Ab4 izolatına karşı kolistin ve FA kombinasyonu dışında, tüm bileşik-kolistin kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği ve kolistinin MİK değerlerini, duyarlı aralıklara çektiği belirlenmiştir. Ciddi toksik etkilere sahip bir antibiyotik olan kolistinin MİK değerlerindeki dramatik düşüş, bu antibiyotiğin güvenli kullanımı için oldukça önemlidir. Öte yandan çalışılan tüm izolatların belirli düzeyde biyofilm üretimine sahip olduğu bunlardan birinin güçlü, üçünün orta dereceli, kalan bir tanesinin de zayıf biyofilm üreticisi olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tüm bileşiklerin bu izolatların biyofilm oluşumunu oldukça başarılı bir şekilde inhibe etme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Kolistin ile kombinasyonlarının ise bazı izolatlar haricinde biyofilm oluşumunu yüksek oranlarda azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda *p*-KA, FA ve *p*-MSA'nın KOLR-Ab4 suşunun membran bütünlüğünü bozarak sitoplazmik içeriğin hücre dışına sızmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bileşiklerin antimikrobiyal ve sinerjistik etkilerinin, bakteriyal membran hasarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Son olarak elde edilen sonuçların halk sağlığı açısından büyük tehdit oluşturan enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için çalışan tüm araştırmacılara değerli katkılar sağlayacağı ve yapılacak ileri çalışmalara bir basamak oluşturacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abdelaziz, N. A., Elkhatib, W. F., Sherif, M. M., Abourehab, M. A. S., Al-Rashood, S. T., Eldehna, W. M., … Elleboudy, N. S. 2022. In Silico Docking, Resistance Modulation and Biofilm Gene Expression in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* via Cinnamic and Gallic Acids. *Antibiotics*, 11(7): 870.

Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Kafil, H. S. 2020. *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infection and Drug Resistance*, *13*: 423-434.

Actor, J. K. 2012. 12- Clinical Bacteriology. In: Actor, J. K. (Ed.), Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 105-120

Ahmad, I., Nadeem, A., Mushtaq, F., Zlatkov, N., Shahzad, M., Zavialov, A. V., Uhlin, B. E. 2023. Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1): 101.

Ahmed, M. O. ve Baptiste, K. E. 2018. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance*, 24(5): 590-606.

Ajiboye, T. O., Skiebe, E., Wilharm, G. 2018. Phenolic acids potentiate colistin-mediated killing of *Acinetobacter baumannii* by inducing redox imbalance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101: 737-744.

Aksu, N., Kuştimur, S., Karahan, Z. C., Sakar, H., Mumcuoğlu, İ., Tekeli, A. 2012. Distribution of erm and msr Genes Encoding Resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Antibiotics in Clinical *Staphylococcus* Isolates. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 32(6): 1530-1535.

Alcala, A., Ramirez, G., Solis, A., Kim, Y., Tan, K., Luna, O., … Kuhn, M. L. 2020. Structural and functional characterization of three Type B and C chloramphenicol acetyltransferases from Vibrio species. *Protein Science*, 29(3): 695-710.

Aldred, K. J., Kerns, R. J., Osheroff, N. 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10): 1565-1574.

Aleksic Sabo, V., Svircev, E., Mimica-Dukic, N., Orcic, D., Narancic, J., Knezevic, P. 2020. Anti-*Acinetobacter baumannii* activity of Rumex crispus L. and Rumex sanguineus L. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10(4): 172.

Alfei, S., Schito, A. M. 2022. β-Lactam Antibiotics and β-Lactamase Enzymes Inhibitors, Part 2: Our Limited Resources. Pharmaceuticals, *15*(4): 476.

Alibi, S., Crespo, D., Navas, J. 2021. Plant-Derivatives Small Molecules with Antibacterial Activity. *Antibiotics*, 10(3): 231.

Allen, H. K., Trachsel, J., Looft, T., Casey, T. A. 2014. Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1): 91-100.

Almasaudi, S. B. 2018. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3): 586-596.

Alrahmany, D., Omar, A. F., Alreesi, A., Harb, G., Ghazi, I. M. 2022. *Acinetobacter baumannii* Infection-Related Mortality in Hospitalized Patients: Risk Factors and

Potential Targets for Clinical and Antimicrobial Stewardship Interventions. *Antibiotics*, 11(8): 1086.

Aminov, R. I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11(12): 2970-2988.

Aminov, R. I. 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 1(134).

Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A., Pina-Vaz, C. 2020. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms*, 8(11): 1716.

Apaydın, S., Török, M. 2019. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(16): 2042-2050.

Arenz, S., Wilson, D. N. 2016. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9): a025361.

Asfaw, T. 2019. Biofilm Formation by *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium*: Review. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 7(4).

Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., … Pace, M. C. 2022. Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*, 11(3): 421.

Aygül, A. 2015. The Importance of Efflux Systems in Antibiotic Resistance and Efflux Pump Inhibitors in the Management of Resistance. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 49(2): 278-291.

Ayoub Moubareck, C., Hammoudi Halat, D. 2020. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, 9(3): 119.

Bag, A., Chattopadhyay, R. R. 2017. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with *p*-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium. Letters in Applied Microbiology*, 65(5): 366-372.

Bala, M., Gupte, S., Aggarwal, P., Kaur, M., Manhas, A. 2016. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter* species from a tertiary care hospital: a therapeutic challenge. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 3024-3026.

Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y., Nelson, D. C. 2013. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS ONE*, 8(6): e67950.

Barzic, A. I., Ioan, S. 2015. Antibacterial Drugs — From Basic Concepts to Complex Therapeutic Mechanisms of Polymer Systems. In: Bobbarala V. (Ed.), Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials. InTech.

Başustaoğlu, A. C., Yıldırım, R. V., İnce, G. 2020. Antibiotic Susceptibility Tests from Past to Present. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 50(1):1-9

Baym, M., Stone, L. K., Kishony, R. 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*, 351(6268): aad3292.

Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., Ntale, M. 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-

antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 06(5): 410-425.

Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, J. A., Aranda, J., Adler, B., … Bou, G. 2014. Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1): 518-526.

Berton, S. B. R., Cabral, M. R. P., de Jesus, G. A. M., Sarragiotto, M. H., Pilau, E. J., Martins, A. F., … Matsushita, M. 2020. Ultra-high-performance liquid chromatography supports a new reaction mechanism between free radicals and ferulic acid with antimicrobial and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 154: 112701.

Bialvaei, A. Z., Samadi Kafil, H. 2015. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*, 31(4): 707-721.

Binda, E., Marinelli, F., Marcone, G. 2014. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*, 3(4): 572-594.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. V. 2014. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2014 13:1, 13(1): 42-51.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., … Martinez, J. 2016. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1): 14.

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, M. 2013. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4): 256-265.

Borges, A., Saavedra, M. J., Simões, M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, 28(7): 755-767.

Brisou, J., Prevot, A. R. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. *Annales de l'Institut Pasteur*, 86(6): 722-728.

Brossard, K. A., Campagnari, A. A. 2012. The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 80(1): 228-233.

Buckle, J. 2015. Chapter 7- Infection. In: Buckle, J. (Ed.) Clinical Aromatherapy. St. Louis: Churchill Livingstone, pp. 130-167

Bush, K., Bradford, P. A. 2016. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8): a025247.

Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N. 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii:* clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7): 1607-1615.

Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S. A. 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, 104(6): 901-912.

Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., Hogg, T. A. 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2): 144-151.

Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V., Intra, J. 2021. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics*, 10(8): 995.

Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., … Peltier, L. F. 2005. THE CLASSIC: Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 439: 23-26.

Cheng, W.-J., Zhou, J.-W., Zhang, P.-P., Luo, H.-Z., Tang, S., Li, J.-J., … Jia, A.-Q. 2020. Quorum sensing inhibition and tobramycin acceleration in Chromobacterium violaceum by two natural cinnamic acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11): 5025-5037.

Choudhury, D., Talukdar, A., Chetia, P., Bhattacharjee, A., Choudhury, M. 2016. Screening of Natural Products and Derivatives for the Identification of RND Efflux Pump Inhibitors. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(9): 705-713.

Christensen, S. B. 2021. Drugs That Changed Society: History and Current Status of the Early Antibiotics: Salvarsan, Sulfonamides, and β-Lactams. *Molecules*, 26(19): 6057.

Cisneros, J. M., Rodríguez-Baño, J. 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(11): 687-693.

CLSI. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cohen, M. L. 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 406(6797): 762-767.

Cook, M. A., Wright, G. D. 2022. The past, present, and future of antibiotics. *Science* Translational Medicine, 14(657).

Cox, G., Wright, G. D. 2013. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7): 287-292.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., … Bartolomé, B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5): 372-382.

Dadgostar, P. 2019. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12: 3903-3910.

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., Blair, J. M. A. 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5): 280-295.

Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3): 417-433.

De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Tumbarello, M. 2020. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β-Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14): 5090.

de Morais, M. C., de Oliveira Lima, E., Perez-Castillo, Y., de Sousa, D. P. 2023. Synthetic Cinnamides and Cinnamates: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action, and In Silico Study. Molecules, 28(4): 1918.

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., … Walker, M. J. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3).

Domagk, G. 1935. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 61(07): 250-253.

Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Wilson, D. N. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42): 16900-16905.

Dörr, T., Moynihan, P. J., Mayer, C. 2019. Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. *Frontiers in Microbiology*, *10*.

Durante-Mangoni, E., Zarrilli, R. 2011. Global Spread of Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Molecular Epidemiology And Management Of Antimicrobial Resistance. *Future Microbiology*, 6(4): 407-422.

Dzyubak, E., Yap, M.-N. F. 2016. The Expression of Antibiotic Resistance Methyltransferase Correlates with mRNA Stability Independently of Ribosome Stalling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12): 7178-7188.

Eales, M. G., Ferrari, E., Goddard, A. D., Lancaster, L., Sanderson, P., Miller, C. 2018. Mechanistic and phenotypic studies of bicarinalin, BP100 and colistin action on *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*, 169(6): 296-302.

Eliopoulos, G. M., Maragakis, L. L., Perl, T. M. 2008. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clinical Infectious Diseases*, 46(8): 1254-1263.

El-Sayed Ahmed, M. A. E.-G., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.-B. 2020. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1): 868-885.

Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., Magarvey, N. A. 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *BBA-Biomembranes*, 1858(5): 980-987.

Ergün, B. Ç., Çoban, T., Onurdag, F. K., Banoglu, E. 2011. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 34(8): 1251-1261.

Eze, E. C., Chenia, H. Y., El Zowalaty, M. E. 2018. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and Drug Resistance*, 11: 2277.

Fernández, L., Hancock, R. E. W. 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4): 661-681.

Fleming, A. 1980. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenzae. *Clinical Infectious Diseases*, 2(1): 129-139.

Gaddy, J. A., Actis, L. A. 2009. Regulation of *Acinetobacter Baumannii* Biofilm Formation. *Future Microbiology*, 4(3): 273-278.

Gedefie, A., Demsiss, W., Belete, M. A., Kassa, Y., Tesfaye, M., Tilahun, M., … Sahle, Z. 2021. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infection and Drug Resistance*, 14: 3711-3719.

Gerson, S., Lucaßen, K., Wille, J., Nodari, C. S., Stefanik, D., Nowak, J., … Higgins, P. G. 2020. Diversity of amino acid substitutions in PmrCAB associated with colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(3): 105862.

Ghai, I., Ghai, S. 2018. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 11: 523-530.

Godlewska-Zylkiewicz, B., Swislocka, R., Kalinowska, M., Golonko, A., Swiderski, G., Arciszewska, Z., … Lewandowski, W. 2020. Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. *Materials*, 13(19): 4454.

Goldstein, B. P. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*, 67(9): 625-630.

Goodale, A., Michailidis, F., Watts, R., Chok, S. C., Hayes, F. 2020. Characterization of permissive and non-permissive peptide insertion sites in chloramphenicol acetyltransferase. *Microbial Pathogenesis*, 149: 104395.

Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1): 241-272.

Graber, E. M. 2021. Treating acne with the tetracycline class of antibiotics: A review. *Dermatological Reviews*, 2(6): 321-330.

Hamel, M., Rolain, J. M., Baron, S. A. 2021. The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. *Microorganisms*, 9(2): 442.

Hamouche, L., Poljak, L., Carpousis, A. J. 2021. Ribosomal RNA degradation induced by the bacterial RNA polymerase inhibitor rifampicin. *RNA*, 27(8): 946-958.

Hazhirkamal, M., Zarei, O., Movahedi, M., Karami, P., Shokoohizadeh, L., Taheri, M. 2021. Molecular typing, biofilm production, and detection of carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from different infection sites using ERIC-PCR in Hamadan, west of Iran. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22(1): 32.

Hemaiswarya, S. ve Doble, M. (2010). Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *Journal of medical microbiology*, 59(Pt 12), 1469–1476.

Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., … Piddock, L. J. V. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014): 176-187.

Hussain, H. I., Aqib, A. I., Seleem, M. N., Shabbir, M. A., Hao, H., Iqbal, Z., … Li, K. 2021. Genetic basis of molecular mechanisms in β-lactam resistant gram-negative bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 158: 105040.

Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.

Ibitoye, O. B., Ajiboye, T. O. 2019. Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Pathogenesis*, 126: 393-398.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., … Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1): 7-11.

Kang, J., Liu, L., Liu, Y., Wang, X. 2020. Ferulic Acid Inactivates Shigella flexneri through Cell Membrane Destruction, Biofilm Retardation, and Altered Gene Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(27): 7121-7131.

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3): 300.

Keita, K., Darkoh, C., Okafor, F. 2022. Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *SN Applied Sciences*, 4(8): 209.

Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Fazly Bazzaz, B. S. 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1): 118.

Khardori, N. 2006. Antibiotics--past, present, and future. *The Medical clinics of North America*, 90(6): 1049-1076.

Kheiry, M., Dianat, M., Badavi, M., Mard, S. A., Bayati, V. 2019. *p*-Coumaric Acid Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation in Rats by Scavenging ROS Production: an In Vivo and In Vitro Study. *Inflammation*, 42(6): 1939-1950.

Kırmusaoğlu, S., Gareayaghi, N., S. Kocazeybek, B. 2019. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods. IntechOpen.

Kishk, R., Soliman, N., Nemr, N., Eldesouki, R., Mahrous, N., Gobouri, A., … Anani, M. 2021. Prevalence of Aminoglycoside Resistance and Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Acinetobacter baumannii* Among Intensive Care Unit Patients, Ismailia, Egypt. *Infection and Drug Resistance*, 14: 143-150.

Ko, K. S., Choi, Y., Lee, J.-Y. 2017. Old drug, new findings: colistin resistance and dependence of *Acinetobacter baumannii*. *Precision and Future Medicine*, 1(4): 159-167.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6): 423-435.

Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., Gruzewska, A. 2015. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, *p*-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45: 919-924.

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., Connolly, L. E. 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6): a027029.

Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Nina, P. B., … Tiwari, R. R. 2021. Futuristic Non-antibiotic Therapies to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 12: 16.

Kumar, P. 2020. A review on quinoline derivatives as anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) agents. *BMC Chemistry*, 14(1): 17.

Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., Tragiannidis, A. 2021. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, 10(3): 373.

Labby, K. J., Garneau-Tsodikova, S. 2013. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections. *Future Medicinal Chemistry*, 5(11): 1285-1309.

Lade, H., Kim, J.-S. 2023. Molecular Determinants of β-Lactam Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics*, 12(9): 1362.

Lambert, P. A. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10): 1471-1485.

Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., … Lee, S. H. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(55).

Lessel, E. F. 1971. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. International *Journal of Systematic Bacteriology*, 21(2): 213-214.

Letsididi, K. S., Lou, Z., Letsididi, R., Mohammed, K., Maguy, B. L. 2018. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. *LWT*, *94*, 25-32.

Lewis, K. 2012. Recover the lost art of drug discovery. *Nature*, 485(7399): 439-440.

Li, J., Zhao, N., Xu, R., Li, G., Dong, H., Wang, B., … Wei, X. 2022. Deciphering the antibacterial activity and mechanism of *p*-coumaric acid against Alicyclobacillus acidoterrestris and its application in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 378: 109822.

Lim, L. M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J. C., Macander, L., Jarkowski, A., … Tsuji, B. T. 2010. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. Pharmacotherapy: *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 30(12): 1279-1291.

Lin, M.-F., Lan, C.-Y. 2014. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*, 2(12): 787.

Lindahl, J. F., Grace, D. 2015. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1): 30048.

Liu, J., Du, C., Beaman, H. T., Monroe, M. B. B. 2020. Characterization of Phenolic Acid Antimicrobial and Antioxidant Structure–Property Relationships. *Pharmaceutics*, 12(5): 419.

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., … Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2): 161-168.

Lo, H. H., Chung, J. G. 1999. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer research*, 19(1A): 133-139.

Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J. 2012. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2): 550-554.

Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., Mohr, J. F. 2017. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. Pharmacotherapy: *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 37(1): 71-84.

Madigan, M., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. 2014. *Brock Biology of Microorganisms*. Boston: Pearson.

Malheiro, J. F., Maillard, J. Y., Borges, F., Simões, M. 2019. Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141: 71-78.

Marcato, D. C., Spagnol, C. M., Salgado, H. R. N., Isaac, V. L. B., Corrêa, M. A. 2022. New and potential properties, characteristics, and analytical methods of ferulic acid: A review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58.

Masi, M., Réfregiers, M., Pos, K. M., Pagès, J.-M. 2017. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nature Microbiology*, 2(3): 17001.

Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. A. 2010. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3369-3373.

McCoy, L. S., Xie, Y., Tor, Y. 2011. Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(2): 209-232.

McMichael, A. J. 2004. Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: *Biological Sciences*, 359(1447): 1049-1058.

Meccatti, V. M., Martins, K. M. C., Ramos, L. de P., Pereira, T. C., de Menezes, R. T., Marcucci, M. C., … de Oliveira, L. D. 2023. Synergistic Antibiofilm Action of *Cinnamomum verum* and Brazilian Green Propolis Hydroethanolic Extracts against Multidrug-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Biocompatibility on Human Keratinocytes. *Molecules*, 28(19): 6904.

Miller, W. R., Munita, J. M., Arias, C. A. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(10): 1221-1236.

Miyachiro, M. M., Contreras-Martel, C., Dessen, A. 2019. Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Bacterial Cell Wall Elongation Complexes. *Subcellular Biochemistry*, 93:273-289

Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., Padhy, I. 2021. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. Journal of Biosciences, 46(3): 85.

Moody J, Knapp C. 2010. Tests to assess Bactericidal activity. In Garcia LS (ed): *Clinical Microbiology procedures Handbook,*. ASM Press, Washington D.C.

Mosaei, H., Zenkin, N. 2020. Inhibition of RNA Polymerase by Rifampicin and Rifamycin-Like Molecules. *EcoSal* Plus, 9(1).

Mukhtar, T. A., Wright, G. D. 2005. Streptogramins, Oxazolidinones, and Other Inhibitors of Bacterial Protein Synthesis. *Chemical Reviews*, 105(2): 529-542.

Mumtaz, L., Farid, A., Yousef Alomar, S., Ahmad, N., Nawaz, A., Andleeb, S., Amin, A. 2023. Assesment of polyphenolic compounds against biofilms produced by clinical *Acinetobacter baumannii* strains using in silico and in vitro models. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(9): 103743.

Munita, J. M., Arias, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2): 1317-1325.

Nakazono, Y., Watanabe, Y., Hashinaga, F., Tadera, K. 2005. Studies on Antimicrobial and Antioxidative Substance of Yuzu (*Citrus junos* hort. ex Tanaka) Seed. *Journal of Biological Sciences*, *6*(1): 135-139.

Narasimhan, B., Belsare, D., Pharande, D., Mourya, V., Dhake, A. 2004. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(10): 827-834.

Nasr, P. 2020. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Hospital Infection*, 104(1): 4-11.

Nelson, M. L., Dinardo, A., Hochberg, J., Armelagos, G. J. 2010. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American Journal of Physical Anthropology*, 143(1): 151-154.

Ni, W., Li, Y., Guan, J., Zhao, J., Cui, J., Wang, R., Liu, Y. 2016. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5): 3215-3218.

Nicolaou, K. C., Rigol, S. 2018. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 71(2): 153-184.

Novović, K., Jovčić, B. 2023. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. Antibiotics, 12(3): 516.

Odabaş Köse, E., Koyuncu Özyurt, Ö., Bilmen, S., Er, H., Kilit, C., Aydemir, E. 2023. Quercetin: Synergistic Interaction with Antibiotics against Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 12(4): 739.

Olsufyeva, E. N., Yankovskaya, V. S. 2020. Main trends in the design of semi-synthetic antibiotics of a new generation. *Russian Chemical Reviews*, 89(3): 339-378.

O'Neill, J. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. https://amr-review.org/Publications.html [Son erişim tarihi: 12.02.2024].

Ordooei Javan, A., Shokouhi, S., Sahraei, Z. 2015. A review on colistin nephrotoxicity. European Journal of Clinical Pharmacology, 71(7): 801-810.

Orelle, C., Carlson, S., Kaushal, B., Almutairi, M. M., Liu, H., Ochabowicz, A., … Mankin, A. S. 2013. Tools for Characterizing Bacterial Protein Synthesis Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12): 5994-6004.

Othman, L., Sleiman, A., Abdel-Massih, R. M. 2019. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Ou, S., Kwok, K. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11): 1261-1269.

Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S., … Zavialov, A. V. 2018. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21): 5558-5563.

Peacock, S. J., Paterson, G. K. 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1): 577-601.

Pei, K., Ou, J., Huang, J., Ou, S. 2016. *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9): 2952-2962.

Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3): 538-582.

Pendleton, J. N., Gorman, S. P., Gilmore, B. F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3): 297-308.

Płowuszyńska, A., Gliszczyńska, A. 2021. Recent Developments in Therapeutic and Nutraceutical Applications of *p*-Methoxycinnamic Acid from Plant Origin. *Molecules*, 26(13): 3827.

Pompilio, A., Scribano, D., Sarshar, M., Di Bonaventura, G., Palamara, A. T., Ambrosi, C. 2021. Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm: The *Acinetobacter baumannii* Way. *Microorganisms*, 9(7): 1353.

Pragasam, S. J., Venkatesan, V., Rasool, M. 2013. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of p-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats. *Inflammation*, 36(1): 169-176.

Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., … Song, H. 2016. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Qureshi, Z. A., Hittle, L. E., O'Hara, J. A., Rivera, J. I., Syed, A., Shields, R. K., … Doi, Y. 2015. Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Beyond Carbapenem Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 60(9): 1295-1303.

Rajangam, S. L., Narasimhan, M. K. 2024. Current treatment strategies for targeting virulence factors and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiology*, 1-21.

Rather, M. A., Gupta, K., Mandal, M. 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4): 1701-1718.

Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., Piddock, L. J. V. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8): 438-445.

Ribeiro da Cunha, Fonseca, Calado. 2019. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. *Antibiotics*, 8(2): 45.

Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J.-M., Bechinger, B., Naas, T. 2021. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics*, 10(9): 1095.

Rychlíčková, J., Kubíčková, V., Suk, P., Urbánek, K. 2023. Challenges of Colistin Use in ICU and Therapeutic Drug Monitoring: A Literature Review. *Antibiotics*, 12(3): 437.

Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., Gänzle, M. G. 2011. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5): 1176-1184.

Santajit, S., Indrawattana, N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 1-8.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 234-258.

Savoia, D. 2012. Plant-Derived Antimicrobial Compounds: Alternatives to Antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8): 979-990.

Schaenzer, A. J., Wright, G. D. 2020. Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends in Molecular Medicine*, 26(8): 768-782.

Sharma, P. 2011. Cinnamic acid derivatives: a new chapter of various pharmacological activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(2): 403-423.

Shi, C., Zhang, X., Sun, Y., Yang, M., Song, K., Zheng, Z., … Xia, X. 2016. Antimicrobial Activity of Ferulic Acid Against Cronobacter sakazakii and Possible Mechanism of Action. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(4): 196-204.

Song, J. Y., Cheong, H. J., Noh, J. Y., Kim, W. J. 2015. In vitro Comparison of Anti-Biofilm Effects against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Imipenem, Colistin, Tigecycline, Rifampicin and Combinations. *Infection & Chemotherapy*, 47(1): 27.

Soto, S. M. 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3): 223-229.

Sova, M. 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8): 749-767.

Srivastava, A., Talaue, M., Liu, S., Degen, D., Ebright, R. Y., Sineva, E., … Ebright, R. H. 2011. New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: 'switch region'. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5): 532-543.

Steinbuch, K. B., Fridman, M. 2016. Mechanisms of resistance to membrane-disrupting antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *MedChemComm*, 7(1): 86-102.

Stogios, P. J., Savchenko, A. 2020. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, 29(3): 654-669.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., … WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.. *The Lancet Infectious diseases*, 18(3): 318-327.

Taitt, C. R., Leski, T. A., Stockelman, M. G., Craft, D. W., Zurawski, D. V., Kirkup, B. C., Vora, G. J. 2014. Antimicrobial Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates Taken from Military Treatment Facilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2): 767-781.

Trebosc, V., Gartenmann, S., Tötzl, M., Lucchini, V., Schellhorn, B., Pieren, M., … Kemmer, C. 2019. Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *mBio*, 10(4).

Trimble, M. J., Mlynárčik, P., Kolář, M., Hancock, R. E. W. 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10): a025288.

Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., … Pala-Ozkok, I. 2021. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12: 3003.

Uppalapati, S. R., Sett, A., Pathania, R. 2020. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 11.

Van Looveren, M., Goossens, H. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(8): 684-704.

van Seventer, J. M., Hochberg, N. S. 2017. Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control. *International Encyclopedia of Public Health* 2017:22–39.

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. 2021. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms, 9*(10): 2041.

Vassallo, A., Silletti, M. F., Faraone, I., Milella, L. 2020. Nanoparticulate Antibiotic Systems as Antibacterial Agents and Antibiotic Delivery Platforms to Fight Infections. *Journal of Nanomaterials*, 2020: 1-31.

Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Juárez Vignon-Whaley, J. J., Abello Vaamonde, J. A., Padró Alonzo, L. A., Rivera Reséndiz, A., … Barrientos Fortes, T. 2020. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*, 9(4): 205.

Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., Li, J. 2010. Structure−Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. Journal of Medicinal Chemistry, 53(5): 1898-1916.

Vila, J., Martí, S., Sánchez-Céspedes, J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6): 1210-1215.

Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Czobor, I. B., Chifiriuc, M. C. 2020. Antibiotic Resistance Profiles, Molecular Mechanisms and Innovative Treatment Strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(6): 935.

Wang, C.-H., Hsieh, Y.-H., Powers, Z. M., Kao, C.-Y. 2020. Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 1061.

Wang, Y., Yin, M., Gu, L., Yi, W., Lin, J., Zhang, L., … Zhao, G. 2023. The therapeutic role and mechanism of 4-Methoxycinnamic acid in fungal keratitis. *International Immunopharmacology*, 116: 109782.

Wenzel, M. 2020. Do we really understand how antibiotics work?. *Future Microbiology*, 15(14): 1307-1311.

Wieczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Krawczyk, M., Tryniszewska, E. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 46(3).

Williams, K. 2009. The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine – the first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 102(8): 343-348.

Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., O'Neill, A. J. 2020. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11): 637-648.

Wisplinghoff, H. 2017. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. In: Cohen, J., Powderly, W. G. & Opal S. M. (Eds.): Infectious Diseases. Elsevier. pp. 1579-1599.e2

Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. 2017. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1): 409-447.

Woodruff, H. B. 2014. Selman A. Waksman, Winner of the 1952 Nobel Prize for Physiology or Medicine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1): 2-8.

Wu, X., Chavez, J. D., Schweppe, D. K., Zheng, C., Weisbrod, C. R., Eng, J. K., … Bruce, J. E. 2016. In vivo protein interaction network analysis reveals porin-localized antibiotic inactivation in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Nature Communications*, 7(1): 13414.

Xu, J.-G., Hu, H.-X., Chen, J.-Y., Xue, Y.-S., Kodirkhonov, B., Han, B.-Z. 2022. Comparative study on inhibitory effects of ferulic acid and *p*-coumaric acid on *Salmonella Enteritidis* biofilm formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(8): 136.

Yeh, Y.-C., Huang, T.-H., Yang, S.-C., Chen, C.-C., Fang, J.-Y. 2020. Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. *Frontiers in Chemistry*, 8: 286.

Yoneyama, H., Katsumata, R. 2006. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5): 1060-1075.

Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L. H. 2012. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25(2): 67-77.

Zárate, S., De la Cruz Claure, M., Benito-Arenas, R., Revuelta, J., Santana, A., Bastida, A. 2018. Overcoming Aminoglycoside Enzymatic Resistance: Design of Novel Antibiotics and Inhibitors. *Molecules*, 23(2): 284.

Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., Rotsztejn, H. 2018. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6): 332-336.

Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R., Samadi, E., Haghi, F. 2019. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases*, 19(1): 629.

ÖZGEÇMİŞ

ALAADDİN KORKUT

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2021-2024	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2017-2021	İstinye Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Aydemir E., Odabaş Köse E., Yavuz M., Kilit AC., Korkut A., Özkaya Gül S., Sarikurkcu C., Celep ME., Göktürk RS. (2024). Phenolic Compound Profiles, Cytotoxic, Antioxidant, Antimicrobial Potentials and Molecular Docking Studies of *Astragalus gymnolobus* Methanolic Extracts. Plants, 13(5): 658. Doi: 10.3390/plants13050658.