

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ GÖSTEREN VE EFFLUX POMPA
SİSTEMİ ÇALIŞAN *Escherichia coli* SUŞLARININ EFFLUX
POMPASI İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI CEVAPLARININ
GÖZLENMESİ**

Eda ALTINÖZ

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER
Doç. Dr. Kerem CANLI
Doç. Dr. Barış BANİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Eda ALTINÖZ tarafından hazırlanan “**Çoklu İlaç Direnci Gösteren ve Efflux Pompa Sistemi Çalışan *Escherichia coli* Suşlarının Efflux Pompası İnhibitörlerine Karşı Cevaplarının Gözlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Danışman

Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Kerem CANLI
Dokuz Eylül Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Barış Bani
Kastamonu Üniversitesi



03/07/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildirir ve taahhüt ederim.



Eda ALTINÖZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ GÖSTEREN VE EFFLUX POMPA SİSTEMİ ÇALIŞAN *Escherichia coli* SUŞLARININ EFFLUX POMPASI İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI CEVAPLARININ GÖZLENMESİ

Eda ALTINÖZ
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Antibiyotik kelimesi Yunanca'da anti ve bios kelimelerinden türetilmiş olup, antibiyotik maddesi olarak küf mantarı, bitkiler gibi natürel kaynaklarda bulunanlardan veya yapay ortamlardan üretilerek elde edilebilmektedir ve bu madde sayesinde mikroorganizmaların canlılıkları durdurulabilmekte ya da öldürülebilmektedir. Fakat bir takım sebeplerden dolayı antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gözlemlenmiş ve antibiyotiklerin etkisinde değişim ortaya çıkmıştır. Antibiyotiklerin çeşitli etki mekanizmaları vardır ve etki ettikleri bir takım hedefler bulunmaktadır. Karşımıza çıkan bu antibiyotiğe karşı gelişen direnç yolları, doğal veya kazanılmış olabilmektedir. Antibiyotik direncine karşı etki gösteren nedenlerden biri de efflux (dışa atım) pompalarıdır. Bu pompalar vasıtasıyla antibiyotik ya da kimyasal maddelerin bakteri içerisinden dış ortama salınması sebebiyle antibiyotik, bakteri içerisinde işlevini yerine getirememektedir. Pompa tipleri 5 süper aile olarak bilinen MDR, SMR, MATE, ABC ve MATE türleridir. Bugüne kadar PAβN, INF55, CCCP ve buna benzer birkaç efflux pompa inhibitörü keşfedilmiş olup, bu konu ile ilgili bilimsel çalışmaların tüm hızıyla devam ettiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında farklı kültürlerden izole edilmiş çoklu ilaç direncine sahip *Escherichia coli* suşlarında, efflux pompa inhibitörleri olarak bilinen verapamil, tiyordazin HCl ve PAβN bileşikleri antibiyotikler ile kombine kullanılarak, suşlardaki efflux pompaları inhibe edilmeye çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak; verapamil için inhibisyon etkisi %98,41; tiyordazin HCl için %96,82 ve PAβN için ise %38,09 olup, en fazla etki verapamil ve tiyordazin HCl'de gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, antibiyotik direnci, efflux pompaları, inhibitör.

2019, 118 Sayfa
Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

MSc. Thesis

OBSERVATION THE RESPONSES OF *Escherichia coli* STRAINS WITH MULTIPLE DRUG RESISTANCE and WORKING EFFLUX PUMP SYSTEMS AGAINST EFFLUX PUMP INHIBITORS

Eda ALTINÖZ
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER

The word antibiotic is derived from the Greek word anti and bios, and can be obtained from natural sources such as molds and plants or produced artificially media as antibiotic substances and the viability of microorganisms can be suppressed or killed. However, resistance to antibiotics was observed for a number of reasons and the activity of antibiotics has changed. Antibiotics have various mechanisms of action and have a number of targets to which they affect. These antibacterial resistance pathways may be natural or acquired. One of the reasons that are effective against antibiotic resistance is efflux pumps. By means of these pumps antibiotics or chemical substances are released from the bacteria to the external environment and the antibiotic cannot function in the bacteria. The pump types are MDR, SMR, MATE, ABC and MATE. A few inhibitors such as PA β N, INF55, CCCP and so on are now available and it is known that scientific studies are still in progress. In this study, verapamil, thioridazine HCl and PA β N as efflux pump inhibitors, were used in combination with antibiotics to inhibit efflux pumps in multi drug resistant *Escherichia coli* strains, which were isolated from different sources, and positive results were obtained. As a result; the effect of verapamil was 98.41%; thioridazine HCl 96.82% and 38.09% for PA β N, with the highest effect observed in verapamil and thioridazine HCl.

Key Words: Antibiotic, antibiotic resistance, efflux pumps, inhibitor.

2019, 118 Pages

Science Code: 203

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın başlangıcı olarak nitelendirmiş olduğum yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren ve tez çalışmam süresince, hiçbir desteğini esirgemeyen, sabrı, özverililiği, güleryüzlülüğü ile pozitif yaklaşımlarda bulunup destek ve moral veren, tüm bilgileri ile bana ışık tutup yol gösteren, akademik hayatım boyunca da bana desteğini esirgemeyeceğini bildiğim danışmanım Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Danışmanımın yanı sıra, tez çalışmam sırasında yardımcı olan Doç. Dr. Kerem CANLI'ya ve Uzman Biyolog Gülay ÖZLÜ EKMEKCİOĞLU'na da teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarımı yürüttüğüm Kastamonu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne, bölüm başkanı Doç. Dr. Talip Çeter'e ve bölümün diğer hocalarına da teşekkür ediyorum.

Yüksek lisansa başlamam için gerekli desteği bana gösteren Özlem AYAN'a ve bu süreçte mânen yanımda olup her daim desteğini hissettiğim çok kıymetli dostum Tuba BAYRAKTAR'a da ayrıyeten teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik hayata yön verme kararı aldıktan sonra, bu süreçte iyi yerlere gelmem için çabalayan annem Ferhan ALTINÖZ ve babam İ. Nail ALTINÖZ'e, ailemin diğer fertlerine, arkadaşlarıma ve destek veren herkese teşekkür ediyorum.

Eda ALTINÖZ
Kastamonu, Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antibiyotikler ve Genel Özellikleri.....	1
1.2. Antibiyotiklerin Zaman İçerisindeki Dirençleri.....	9
1.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması.....	10
1.3.1. Bazı Antibiyotiklerin Etki Ettikleri Hedefler.....	11
1.3.1.1. Hücre duvarı sentezini inhibe edenler.....	11
1.3.1.2. Protein sentezini inhibe edenler.....	11
1.3.1.3. Nükleik asit sentezini (DNA-RNA) inhibe edenler.....	11
1.3.1.4. Folik asit sentezi ve metabolizmasının inhibe edilmesi.....	11
1.3.1.5. Hücre zarı fonksiyonunu değiştirenler.....	12
1.4. Antibakteriyel İlaç Direnci.....	12
1.4.1. Doğal (İntrinsik) Direnç.....	15
1.4.2. Çevre Şartlarına Bağlı Direnç.....	16
1.4.3. Kazanılmış Direnç.....	16
1.5. Çapraz Direnç.....	16
1.6. Efflux (Dışa Atım) Pompaları.....	17
1.6.1. Efflux Pompa Sistemlerinin Sınıflandırılmaları.....	19
1.6.1.1. MF (Major Facilitator).....	20
1.6.1.2. MATE (Multidrug and Toxic Efflux).....	21
1.6.1.3. RND (Resistance-Nodulation-Division).....	22
1.6.1.4. SMR (Small Multidrug Resistance).....	22
1.6.1.5. ABC (ATP Binding Cassette).....	23
1.6.2. Efflux Pompalarının Yapısı ve Filogenetik Özellikleri.....	24
1.6.3. Antibiyotik Direncinde Klinik Olarak Tanımlanan Bazı Bakteriler.....	26
1.6.4. Efflux Pompasını İnhibe Edebilen Birtakım Bileşikler.....	27
1.6.4.1. Bilinen inhibe bileşiklere ait örnekler ve kimyasal yapıları.....	27
1.6.5. Pompa Tiplerine Göre Tanımlanan Antibiyotikler.....	33

1.7. Mikroorganizmalar	34
1.7.1. <i>Escherichia coli</i>	34
1.7.1.1. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin yapısı	35
1.7.1.2. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin direnci	37
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	45
3.1. Materyaller	45
3.1.1. Petri Kapları	45
3.1.2. LB Broth	45
3.1.3. Tryptic Soy Broth (TSB)	45
3.1.4. Agar-Agar	45
3.1.5. Müeller-Hinton Broth	45
3.1.6. NaCl (Tuz)	46
3.1.7. Etidyum Bromür (EtBr)	46
3.1.9. Efflux Pompası İnhibitörleri	46
3.1.10. Antibiyotik Diskleri	47
3.1.11. Falcon Tüpler	48
3.1.12. Mikrobank Boncuklu Bakteri Saklama Tüpleri	48
3.1.13. Distile Su	48
3.1.14. Sterile Distile Su	48
3.1.15. Enjektör	48
3.1.16. Enjektör Filtresi	49
3.1.17. Otomatik Mikropipetler (10 µl-100 µL ve 100 µL-1000 µL)	49
3.1.18. Mikropipet Uçları	49
3.1.19. 24 ve 96 Kuyucuklu Mikroplakalar	50
3.1.20. Steril Eküvyon Çubuğu (Swab) ve Steril Özeler	50
3.1.21. Mezür	50
3.1.22. Erlenmayer, Beher ve Cam Şişeler	50
3.1.23. Maske	51
3.1.24. Alüminyum Folyo Kâğıdı	51
3.1.25. Parafilm	51
3.1.26. Muayene Eldiveni	51
3.2. Cihazlar	51
3.2.1. Hassas Terazî	51
3.2.2. Otoklav	52
3.2.3. İnkübatör	53
3.2.4. Ultraviyole Lambası (UV)	53
3.2.4. Derin Dondurucu	53
3.2.5. Buzdolabı	53
3.2.6. Biyogüvenlik Kabini	54
3.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	54
3.4. Besiyeri Hazırlama	55
3.4.1. LB Broth	55

3.4.1.1. Bakterilerin LB Broth 'a pasajlanması	55
3.4.2. LB Agar	56
3.4.2.1. LB Agarda Çizgi Ekim	56
3.4.3. Tryptic Soy Agar (TSB)	57
3.4.3.1. TSB _A hazırlanışı	57
3.4.3.2. TSB _B hazırlanışı	57
3.4.3.3. TSB _A ve TSB _B Agarlarının Petrilere Aktarılması	58
3.4.4. Müeller-Hinton Broth (MHB)	59
3.5. Etidyum Bromür (EB) Cartwheel Method (Çember Hareketi Metodu).....	59
3.5.1. Birinci Paralel Çalışma (LB Broth İçerisinde Zenginleştirilen <i>E. coli</i> Bakterilerinden Cartwheel Yöntemi Oluşturma)	61
3.5.2. İkinci Paralel Çalışma (Bakteri Süspansiyonundan Cartwheel Yöntemi Oluşturma)	61
3.6. UV Işığı Altında Efflux Pompalarının Varlığını Gözlemeleme	62
3.7. Efflux Pompası İnhibitörleri İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesi	62
3.8. Efflux Pompası İnhibitörlerinin MİK Değerlerine Göre Hazırlanması.....	63
3.9. 24 Kuyucuklu Mikroplakalara İnhibitör, Antibiyotik Diskleri ve Bakteri Yüklemelerinin Yapılması	64
3.10. İstatistiksel Hesaplama	65
4. BULGULAR	66
4.1. EtBr Varlığında UV Altında Efflux Pompası Belirleme	66
4.2. Antibiyogram Sonuçlarına Göre MİK Değerleri.....	68
4.3. İnhibitörlerin Toksisitesi İçin MİK Test Sonuçları	71
4.4. MDR <i>E. coli</i> Suşlarının Efflux Pompası İnhibitörlerine Karşı Davranışları	72
5. TARTIŞMA	89
5.1. Efflux Pompalarının UV Altında Tespiti ve İnhibitör Etkileri.....	89
6. SONUÇLAR	103
7. ÖNERİLER.....	104
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Penisilinin kimyasal yapısı.....	1
Şekil 1.2. Streptomisin kimyasal yapısı	3
Şekil 1.3. Kloramfenikol antibiyotığının kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.4. Klortetrasiklinin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.5. Basitrasinin moleküler formu.....	4
Şekil 1.6. Sefalosporinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 1.7. Tetrasiklinin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.8. Neomisin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.9. Eritromisin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.10. Vankomisin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.11. Kanamisin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.12. Metisilin kimyasal yapısı	7
Şekil 1.13. Ampisilin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.14. Nalidiksik asidin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.15. Florokinolonun kimyasal formu.....	8
Şekil 1.16. Gentamisin moleküler yapısı.....	8
Şekil 1.17. Trimetoprimin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.18. Antimikrobiyal ilaç direncinin ülkeler arası dağılımı (%), 2014	15
Şekil 1.19. Antibiyotik kullanımının ülkeler arası dağılımı, 2014.....	15
Şekil 1.20. Efflux pompalarının şematik olarak karşılaştırılması	20
Şekil 1.21. Glukoz transporter - GLUT4.....	21
Şekil 1.22. Proteinin bir ucundan girip diğer ucundan çıkış yaptığını gösteren bir MDR.....	21
Şekil 1.23. RND topolojisi	22
Şekil 1.24. Hsmr'nin bir SMR homoloğu	23
Şekil 1.25. ABC topoloji, ABCA12 proteini.....	24
Şekil 1.26. Transportların topolojik özellikleri, mekanizması ve antibiyotikler...26	
Şekil 1.27. PAβN inhibitörünün kimyasal yapısı	27
Şekil 1.28. INF271 (BLT-4) inhibitörünün kimyasal yapısı	28
Şekil 1.29. INF55 inhibitörünün kimyasal yapısı.....	28
Şekil 1.30. CCCP inhibitörünün kimyasal yapısı.....	28
Şekil 1.31. Rezerpin inhibitörünün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 1.32. NMP (1-(1-naftilmetil) piperazin) inhibitörünün kimyasal yapısı	29
Şekil 1.33. Verapamil inhibitörünün kimyasal yapısı	30
Şekil 1.34. Klorpromazin inhibitörünün kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.35. Paroksetin inhibitörünün kimyasal yapısı	31
Şekil 1.36. Omeprazol inhibitörünün kimyasal yapısı	31
Şekil 1.37. Milbemisin inhibitörünün kimyasal yapısı.....	32
Şekil 1.38. Birikodar (VX-710) inhibitörünün kimyasal yapısı	32
Şekil 1.39. Timkodar (VX-853) inhibitörünün kimyasal yapısı.....	33
Şekil 1.40. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin mikroskopik görünümü	35
Şekil 1.41. Gram negatif bir bakterinin hücre duvar yapısı	36
Şekil 3.1. Cartwheel yönteminin uygulanışı	60
Şekil 3.2. EPI'ler, antibiyotik diskleri, bakteri yüklemesinin şema görünümü...64	

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 3.1. EtBr ve çözeltilisinin görünümü	46
Fotoğraf 3.2. İnhibitörlerin görünümü	47
Fotoğraf 3.3. Antibiyotik diski örneği.....	47
Fotoğraf 3.4. Bakteri saklamak için boncuklu tüpler	48
Fotoğraf 3.5. Mikropipet görünümleri	49
Fotoğraf 3.6. 24 ve 96 kuyucuklu plaka görünümleri	50
Fotoğraf 3.7. Hassas terazi	52
Fotoğraf 3.8. Otovlav	52
Fotoğraf 3.9. İnkübatörün içi.....	53
Fotoğraf 3.10. Biyogüvenlik kabin içi	54
Fotoğraf 3.11. Bakteri içeren LB Broth	56
Fotoğraf 3.12. LB Agar'a çizgi ekimi ve koloni görünümleri	57
Fotoğraf 3.13. TSB agarların petriye dökümü	58
Fotoğraf 3.14. Farklı konsantrasyonlarda EtBr içeren TSB agarlarının petrilerde görünümü.....	59
Fotoğraf 3.15. Cartwheel yöntemiyle üreyen bakteriler	60
Fotoğraf 3.16. Cartwheel yöntemi sonrası bakterilerin üremesi	62
Fotoğraf 3.17. Toksikite MİK değerleri için 96 kuyucuklu plakalara pipetleme çalışması	63
Fotoğraf 3.18. İnhibitör MİK toksisitesi için seri dilüsyon çalışması.....	63
Fotoğraf 3.19. Antibiyotik diski+inhibitör+bakteri uygulaması plaka örneği	65
Fotoğraf 4.1. <i>E.coli</i> bakterilerinin UV altında efflux pompalarının çalışıp çalışmadığının gözlemlenmesi	67
Fotoğraf 4.2. İnhibitörler için 96 kuyucuklu plakalarda MİK toksisitesini belirleme testi	72
Fotoğraf 4.3. Belirlenen MİK değeri örneği	72
Fotoğraf 4.4. Antibiyotik diski+inhibitör+bakteri uygulaması sonucundan bir görünüm.....	73

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Antimikrobiyallere karşı direnç gelişimine yol açan mekanizmalar.....	12
Tablo 1.2. Bakterilerin antimikrobiyal direnç mekanizmaları	14
Tablo 1.3. Efflux pompa proteinleri üst aileleri, kimyasal substratlar ve bakteriler	34
Tablo 4.1. MİK değerleri.....	69
Tablo 4.2. Verapamil İnhibitörü için Toksikite MİK Değerleri	71
Tablo 4.3. Tiyoridazin Hidroklorür İnhibitörü İçin Toksikite MİK Değerleri	71
Tablo 4.4. Bakteri 2'nin inhibitör etkileri.....	73
Tablo 4.5. Bakteri 3'ün inhibitör etkileri.....	74
Tablo 4.6. Bakteri 4'de inhibitörün etkileri.....	75
Tablo 4.7. Bakteri 5 inhibitörün etkileri	76
Tablo 4.8. Bakteri 6'nın inhibitör etkileri.....	77
Tablo 4.9. Bakteri 7'de inhibitör etkileri.....	78
Tablo 4.10. Bakteri 8'de inhibitör etkileri	79
Tablo 4.11. Bakteri 9'da inhibitör etkileri	81
Tablo 4.12. Bakteri 10'da inhibitör etkileri	83
Tablo 4.13. Bakteri 11'in inhibitör etkileri.....	84
Tablo 4.14. Bakteri 12'nin inhibitör etkileri	85

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 4.1. Tüm inhibitörlerin antibiyotik kombinasyonu ile yüzde karşılaştırılması	87
Grafik 4.2. Verapamil inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi.....	87
Grafik 4.3. Tiyoridazin HCl inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi.....	88
Grafik 4.4. PAβN inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi ...	88

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Celcius derecesi
α	Alfa
β	Beta
(-)	Negatif
(+)	Pozitif

Kısaltmalar

ABC	ATP Binding Cassette
AMC	Amosisilin-Klavulanat
AMP	Ampisilin
ATCC	American Type Cell Culture
ATM	Aztreonam
ATP	Adenozin Trifosfat
BCRP	Meme kanseri rezistans proteini
CCCP	Karbonil siyanid <i>m</i> -klorofenil hidrozon
CAZ	Seftazidim
CFM	Sefiksim
CIP	Siprofloksasin
CN	Gentamisin
CRO	Seftriakson
DMT	Drug Metabolic Transporter
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Dk	Dakika
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPI	Efflux Pompası İnhibitörü
EtBr	Etidyum Bromür (EB)
ETP	Ertapenem
FEP	Sefepim
gr	Gram
HCl	Hidroklorür
I	Orta Dirençli
INF271	1-(2-methoxyphenyl)-3-naphthalen-2-ylurea
L	Litre
LB Broth	Luria-Bertani Broth
MAR	Multi Antimicrobial Resistance
marRAB	Gen ile ilgili bir operon türü
MATE	Multidrug and Toxic Efflux
MDR	Multi Drug Resistance
MET	Multidrug Endosomal Transporter
MF	Major Facilitator
MFS	Membran Fusion Protein

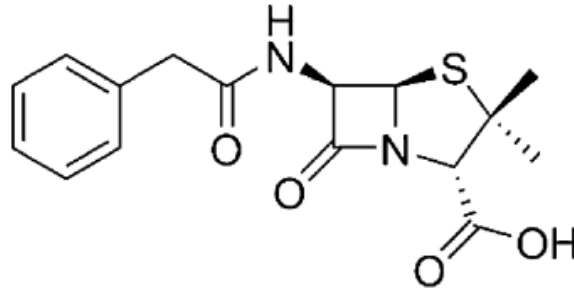
MHB	Müeller-Hinton Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MRP	Multidrug resistance protein
NOR	Norfloksasin
norA	Kinolon direncine sahip olan gen
OMC	Outer Membrane Channel
OMF	Outer Membrane Factor
PA β N	Fenil arjinin beta naftilamid
PBP	Penisilin bağlanma proteinleri
pH	Power of hydrogen
R	Resistant
RNA	Ribo Nükleik Asit
RND	Resistance-Nodulation-Division
S	Susceptible
SMR	Small Multidrug Resistance
spp.	Türler
SXT	Trimetoprim-Sülfametoksazole
TZP	Piperasillin-Tazobaktam
tetA(L)	Tetrasiklinlerin protein kodlayan geni
tetA-G	Tetrasiklinlerin protein kodlayan geni
tetK	Tetrasiklinlerin protein kodlayan geni
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Antibiyotik kelimesinin tanımına bakıldığında; bitkiler, küf mantarları gibi doğal kaynaklarda bulunan veya yapay olarak üretilen, mikroorganizmaların gelişimini durdurup, yok eden maddelerin ortak ismi olarak adlandırıldığı görülmektedir. Yunanca'da anti (karşı) ve bios (yaşam) kelimelerinden türetilmiştir (Aktuğlu, 1997; Tunçtan ve Buharalıoğlu, 2005; Gökçe, 2017).

1.1. Antibiyotikler ve Genel Özellikleri

Enfeksiyon hastalıkları, yıllar boyunca devam eden ve ölüme yol açan sebepler arasında gösterilen hastalıklardır. Bu hastalıklara örnek olarak; kolera, veba, tüberküloz, çiçek gibi hastalıklar verilebilir. Zaman içerisinde bu hastalıklara karşı önlemler alınmış ve tedavilerinde kullanılacak bazı doğal ilaçlar bulunmuştur (Töreci, 2003). Tarih boyunca enfeksiyona sebep olan bakterilere karşı, çeşitli inorganik ve organik kimyasallar, çeşitli boyalar ve tütsüler kullanılmıştır (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Dezenfektan ve antiseptik gibi bazı kimyasallar kullanılarak loğusa humması, cerrahi enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlar kısmen de olsa önlenmiştir. Fakat 19. yüzyılın sonu ile 20. yüzyılın başlarında antibiyotikler geliştirilmeye başlanmıştır. Keşfedilen ilk antibiyotik ise penisilindir (Töreci, 2003). Penisilin kimyasal yapısı Şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Mohd-Setapar, Mat ve Mohamad-Aziz, 2012).



Şekil 1.1. Penisilin kimyasal yapısı

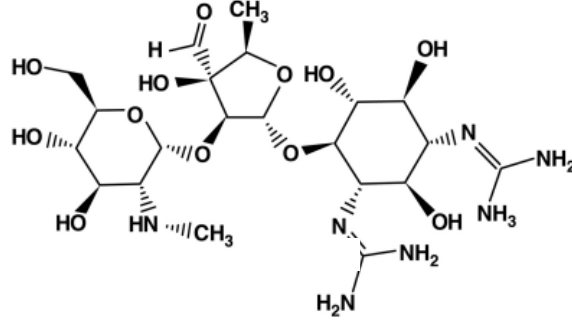
Keşfedilmiş ilk antibiyotik ile antibiyotik çağı başlamış ve çok fazla sayıda sentetik, yarı sentetik ve doğal antimikrobiyal özelliğe sahip ilaçlar üretilerek enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1877 yılında Pasteur ve Joubert, 19. yüzyılda mikrobiyolojinin en büyük atılımını yaparak enfeksiyonlara karşı antibiyotikleri bulmuşlardır. Steril idrarda iyi üreyebilen şarbon basillerinin, diğer bakteri türleriyle kirlenmiş olan idrarda üreyemediği gözlenmiş olup bu mikrobiyal kirlenme sonucunda da öldükleri saptanmıştır. Tüm bu olgular, deneysel olarak Pasteur ve Joubert tarafından kanıtlanmıştır. Diğer bakteriler ve kontamine idrar ile karıştırılmış olan şarbon basilleri deney hayvanlarında hastalık oluşturmamıştır ve böylece enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin kullanılmaları için ilk adım atılmıştır (Chambers, 2001; Gökçe, 2017).

1935 yılında, Domagh tarafından kemoterapi için başlatılan sülfonamidler ile yapılan çalışma, 1938’de Nobel ödülünü kazanmıştır. Böylece, sülfonamid çağı hızlı bir şekilde gelişmeye başlamış, değişik türevlerinin sentezi yapılmış ve klinik olarak denenmiştir. Sülfonamidler; antibakteriyel modern kemoterapide etkili bir ilaç olmasından ötürü, penisilinin klinik olarak denendiği 1942 senesine kadar yaygın bir biçimde kullanılmıştır. Alexander Fleming, çalışmalarını stafilokoklar üzerinde yapmış ve kültür ortamına bulaşan küf mantarının etrafında stafikokokların üremeyip ölmüş olduklarını gözlemlemiştir. Fleming’in, bir rastlantı sonucunda elde ettiği bu gözlemlerde, üremiş olan küf mantarlarının *Penicillium* türü olmasından esinlenerek, etkili maddesine “penicillin” adını vermiştir. Penisilinin streptokok enfeksiyonlardaki etkinliğini deneysel biçimde kanıtlayan Abraham, Chain ve Florey; deney sonuçlarını 1940 yılında yayınlamışlardır (Abraham vd., 1941; Chambers, 2001; Gökçe, 2017).

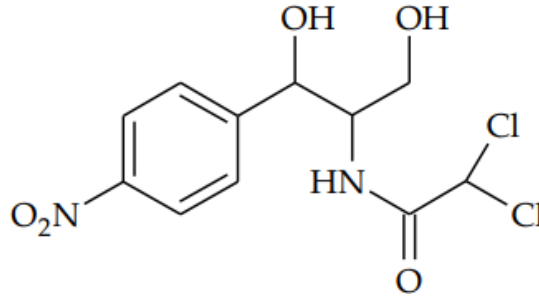
Waksman ve arkadaşları, 1939’dan 1943 yıllarına kadar *Actinomycetes* türlerinde çalışmalarını yürütmüşlerdir. Yaptıkları çalışmalarının sonunda *Streptomyces griseus* kültüründe streptomisin adı verilen bir madde bulmuşlardır (Gökçe, 2017). Streptomisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.2.’de gösterildiği gibidir

(Kwiatkowska, Maslinska, Przygodzka, Dmowska-Chalaba, Dabrowska ve Sikorska-Siudek, 2013).

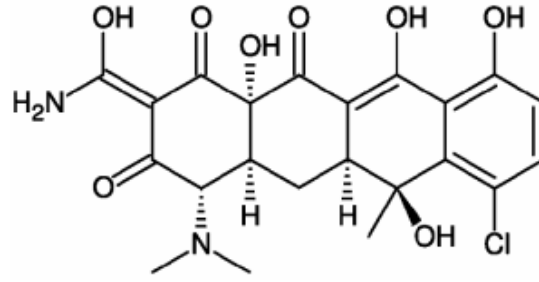


Şekil 1.2. Streptomisinin kimyasal yapısı

Bulunan streptomisin antibiyotiği, pekçok gram-negatif, gram-pozitif gibi mikroorganizmalarda ve *Mycobacterium*'lara karşı önemli derecede etkili olmuştur. Streptomisin, tüberküloz hastalığının kontrol altına alınması aşamasında çok büyük etki göstermiştir. Ancak gram-negatif mikroorganizma ve *Mycobacterium*'da direnç yol açmıştır. Direnç sebebiyle daha sonraları, etkinliği azalarak dar alanda bilinçli bir şekilde kullanılmaya devam edilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sonlarına doğru; Streptomisine ek olarak Kloramfenikol, Klortetrasiklin bulunmuştur. Günümüze kadar bulunan birçok antimikrobiyal ajan literatürlerde yerini almıştır (Gökçe, 2017; Chambers, 2001). Kloramfenikol antibiyotiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.3.'de, Klortetrasiklin antibiyotiğinin kimyasal formülü ise Şekil 1.4.'de gösterilmiştir (Onken, 1985; Biswas vd., 2007; Mehlhorn, Rahimi ve Joseph, 2018).

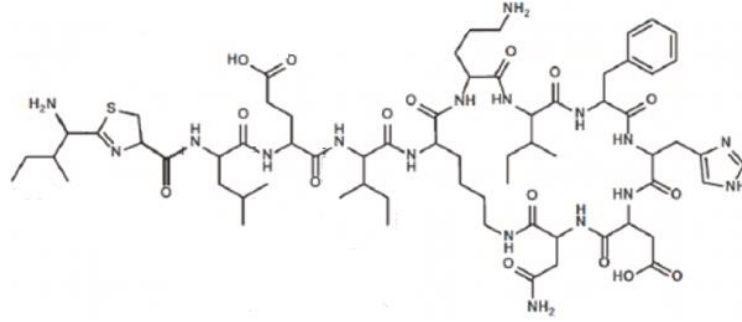


Şekil 1.3. Kloramfenikol antibiyotiğinin kimyasal yapısı



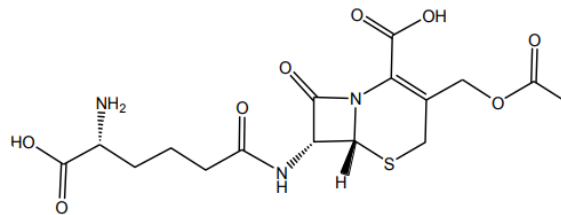
Şekil 1.4. Klortetrasiklinin kimyasal yapısı

1943 yılında Walksman'ın *Streptomyces griseus*'dan streptomisini elde etmesinin ardından yeni antibiyotiklerin keşfinde hızlanma olmuş ve yine 1943 yılında basitrasin kullanılmaya başlanmıştır (Levy, 1992; Töreci, 2003). Basitrasinin moleküler formu Şekil 1.5.'de gösterildiği gibidir (Choi vd., 2017).

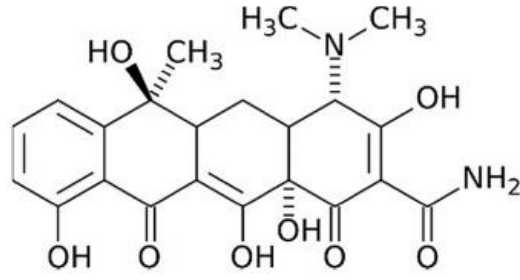


Şekil 1.5. Basitrasinin moleküler formu

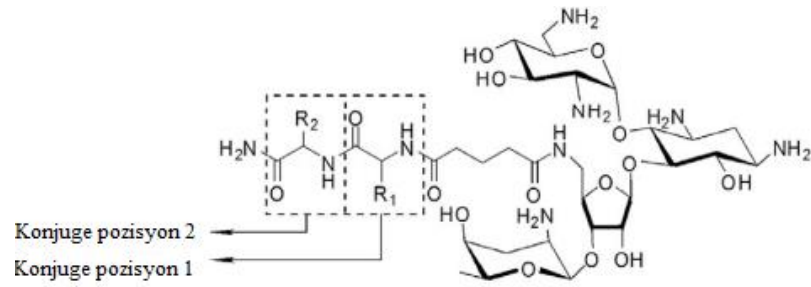
1945 yılında sefalosporinler (kullanıma girme yılı 1967), 1947 yılında tetrasiklin ve kloramfenikoller, 1949 yılında neomisin keşfedilmiştir. Ayrıca neomisinler elde edilmiş ilk aminoglikozidlerdir (Levy, 1992; Töreci, 2003). Sefalosporinin kimyasal yapısı Şekil 1.6.'da, tetrasiklinin kimyasal yapısı Şekil 1.7.'de ve neomisinlerin kimyasal yapısı Şekil 1.8.'de gösterilmiştir (Jiang vd., 2015; Watkins, Jiang, Nahar, Maiti ve Arya, 2015; Santos ve Ramos, 2016, Jumaa ve Karaman, 2015).



Şekil 1.6. Sefalosporinin kimyasal yapısı

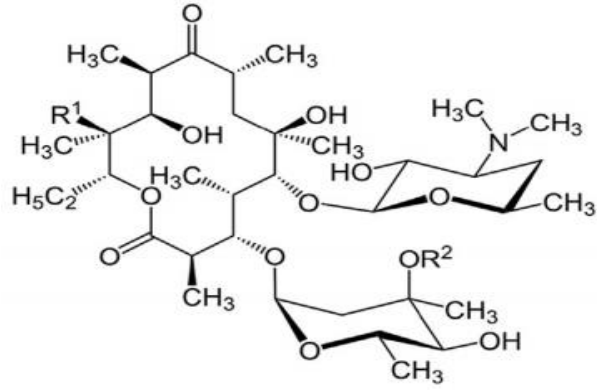


Şekil 1.7. Tetrasiklinin kimyasal yapısı

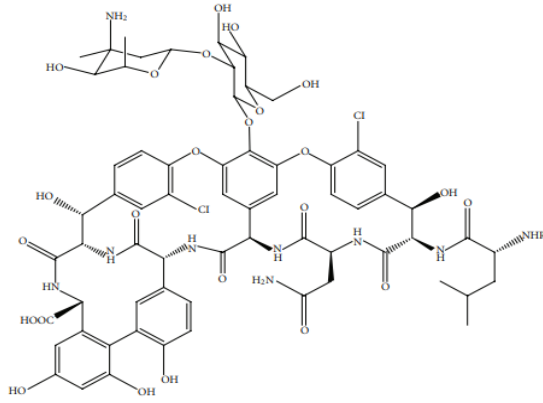


Şekil 1.8. Neomisinin kimyasal yapısı

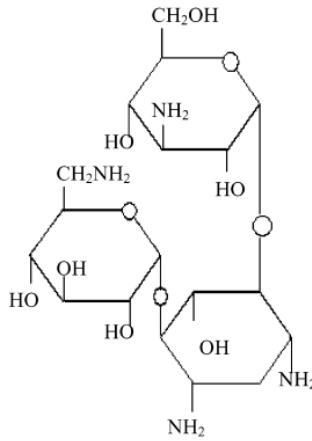
Devamında gelen senelerde; 1952 senesinde eritromisin, 1956 senesinde vankomisin, 1957 senesinde kanamisin, 1960 senesinde metisilin, 1961 yılında ampisilin, 1962 senesinde ise ilk kinolon olan nalidiksik asit ve florokinolon türevleri, 1963 yılında gentamisin, 1970 yılında ise trimetoprim ve diğer antibiyotikler elde edilmiştir (Levy, 1992; Töreci, 2003). Eritromisin kimyasal yapısı Şekil 1.9.'da, vankomisinin Şekil 1.10.'da, kanamisinin Şekil 1.11.'de, metisilin Şekil 1.12.'de, ampisilinin Şekil 1.13.'de, nalidiksik asidin Şekil 1.14.'de, florokinolonun Şekil 1.15'de, gentamisinin Şekil 1.16.'da ve trimetoprimin (TMP 5-(3,4,5,-toksibenzil)primidin-2,4-diamin) ise Şekil 1.17.'de gösterilmiştir (Bauernfeind, 1997; Kim vd., 2005; Maestro vd., 2011; Muppidi, Pumerantz, Wang ve Betageri, 2012; Lovering vd., 2012; Haas, Sanfilippo, Hesje ve Morris, 2013; Perović, Malenović, Vemić, Kostić ve Ivanović, 2014; Santos ve Ramos, 2016).



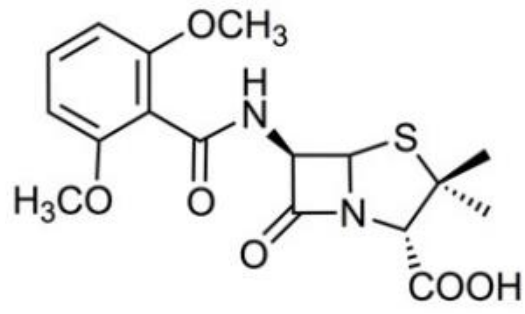
Şekil 1.9. Eritromisinin kimyasal yapısı



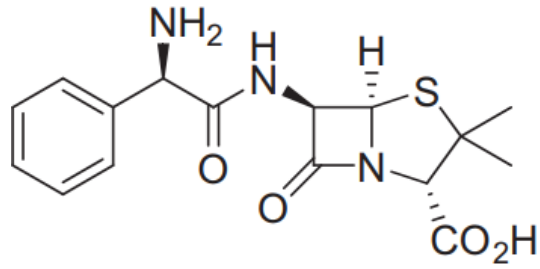
Şekil 1.10. Vankomisinin kimyasal yapısı



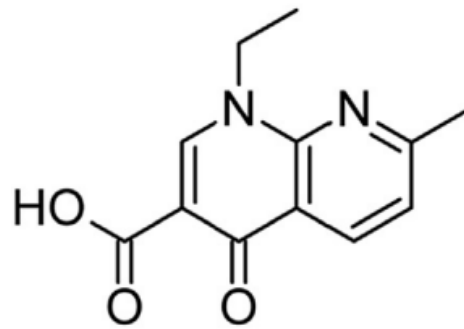
Şekil 1.11. Kanamisinin kimyasal yapısı



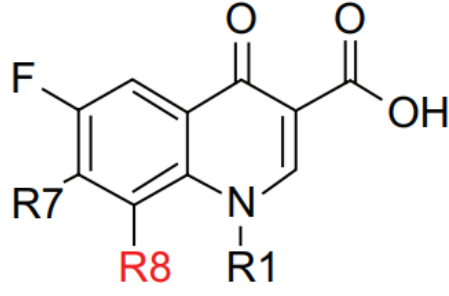
Şekil 1.12. Metisilinin kimyasal yapısı



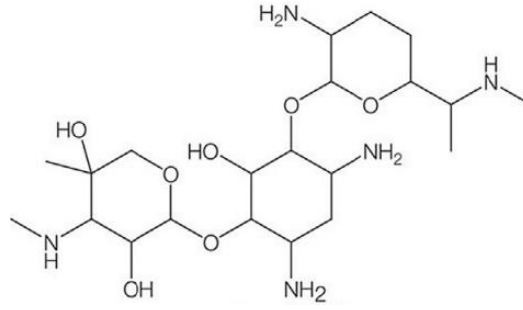
Şekil 1.13. Ampisilinin kimyasal yapısı



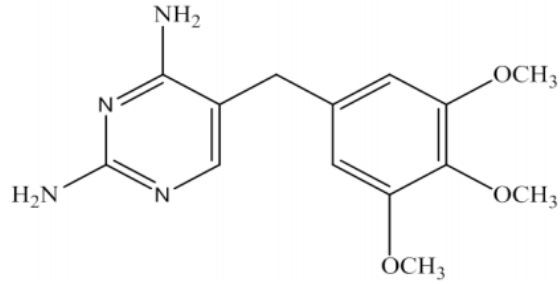
Şekil 1.14. Nalidiksik asidin kimyasal yapısı



Şekil 1.15. Florokinolonun kimyasal formu



Şekil 1.16. Gentamisinin moleküler yapısı



Şekil 1.17. Trimetopriminin kimyasal yapısı

Böylece tıp dünyasında antibiyotik dönemi başlamıştır. Tanımlanan bu ilaçlar antibakteriyel özelliğe sahiptirler. Antiviral ve antifungal ilaçlar ise biraz daha geç elde edilmiştir. 1940'lı yıllarda penisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, streptomisin gibi gram negatif (-) ve gram pozitif (+) bakterilere etkili antibiyotiklerin kullanımı, bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının ortadan kaldırılması için bu bir umut olmuştur.

Fakat ilerleyen zaman içinde, bu antibiyotiklerin etki etmemesi gibi olumsuz sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Esasen, antibiyotikler üzerlerine düşen görevi yapmıştır. Örnek olarak; Amerika’da kanser tedavi edilebildiği takdirde yaşam süresinin 3 yıl uzayacağı öngörülürken, antibiyotiklerin bu süreyi 10 sene daha uzattığı hesap edilmiştir (McDermott ve Rogers, 1982; Töreci, 2003).

Ancak, mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı gelişen direnç olayı başka bir boyuta taşınmıştır.

1.2. Antibiyotiklerin Zaman İçerisindeki Dirençleri

Antibiyotiklerin henüz yaygın olarak kullanılmadığı zamanlarda, toprakta ve dışkı örneklerinde tetrasiklinlere ve streptomisine karşı dirençli bakterilerin bulunduğu belirtilmiş ve antibiyotik direncinin sadece yaygın kullanım sonucu ortaya çıkmadığı, olumsuz çevre koşullarında bakterilerin yaşamını sürdürmek amaçlı savunma sürecinin bir parçası olduğu belirtilmiştir (Cohen, 1992; Gold ve Moellering, 1996; Tenover ve Hughes, 1996; Yüce, 2001). Antibiyotikler ilk olarak mikroorganizmalar tarafından üretilmiştir. Streptomisin, penisilin ve buna benzer bazı antibiyotikler mikroorganizmaların ürünleri olarak elde edilmişlerdir. Kendi antibiyotiğini oluşturan mikroorganizmalar, böylece yaşadıkları ortamda kendilerine avantaj sağlamışlardır. Bundan dolayı da doğal olarak üretilen antibiyotiklere karşı doğal direnç kazanmışlardır. Antibiyotikler, bakterilerde mutasyona sebep olmamaktadır. Mutasyon; kendiliğinden ve kromozomun değişik bölgelerinde olan ve düşük bir oranda gerçekleşen bir olaydır. Transpozon, plazmid ya da integronlarda kodlanan direnç genlerini de antibiyotikler oluşturmamaktadır (Töreci, 2003) Günümüzde de en çok bilinen antibiyotik olan penisiline karşı direnç 1940’lı yıllarda başlamıştır. 1950 yıllarında, tetrasiklin, streptomisin, penisilin, eritromisine karşı dirençli *Staphylococcus aureus* salgını gerçekleşmiştir. Bu salgın hastane kaynaklı olmuştur (Vanderbroucke-Grauls, 1993; Durupınar, 2001).

Mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara karşı da direnç sağladığına dair ilk bilgi, aynı zamanda modern kemoterapinin de kurucusu olan Ehrlich tarafından ileri

sürülmüştür (Ehrlich, 1907; Töreci, 2003). Ehrlich seçici toksik etki kavramını bulmuştur. Seçici toksik etki; kemoterapik maddelerin düşük miktarda mikroorganizmaların üzerinde zarar verici etkilerinin olmasıdır, ancak buna karşılık ortadan kaldırılmak istenen mikroorganizmayı taşıyan canlının üzerinde hiç etki göstermemesi veya sınırlı etki göstermesi durumudur (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Ehrlich, füksini *Trypanosoma brucei* 'ye karşı ilk olarak 1907 yılında denemiştir. İnfekte olan fareler ilk uygulamada tedavi edilmektedir, ancak bir hayvanda enfeksiyon yenilendiği takdirde sonraki uygulamada hastalık etmeninin füksinle bertaraf olamadığı gözlemlenmiştir. Böylece, tripanozomların arsenik bileşenlerine karşı da direnç kazanmış olduğu Ehrlich tarafından gösterilmiştir (Ehrlich, 1907; Töreci, 2003)

Antibiyotiklere karşı kazanılan dirençler, zaman içerisinde (yıl), (ülke, hastane, şehir), bakterinin izole edilmiş olduğu vücut bölgesi, hastane enfeksiyonları (nozokomiyal), toplumda kazanılan enfeksiyonlar, hastalığın altında yatan diğer hastalıklar, yaş ve immun sistem gibi farklı sebeplerin yanı sıra; kalabalık ortamlarda yaşantı, antibiyotik tedavisinin yanlış kullanımı, gereksiz antibiyotik kullanımı, antibiyotik dozunda yapılan yanlışlıklar, rastgele alınan antibiyotikler, yapılan duyarlılık testlerinin yanlış değerlendirilmesi ve yorumlanması gibi birçok farklı etken antibiyotiklere karşı kazanılan dirençler için sebep gösterilmektedir (Zarakolu, 2003).

1.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Antibiyotikler bakteriler üzerinde bakteriyostatik¹ ve bakterisidal² olmak üzere iki şekilde etki gösterirler (Avşar, 2007).

Antibiyotikler etki edebilmek için bakteri hücre içerisine girerek inaktive ya da metabolize olmadan bakterinin belirli bir takım fonksiyonlarını inhibe etmeleri gerekmektedir. Antibiyotikler bu etkileri belirli bir hedefi etkileyerek göstermektedir. Hücre membranı, bakteri hücre duvarı, biyokimyasal ve metabolik yollar,

¹ Bakteri gelişiminin durdurulması

² Bakterinin öldürülmesi

bakteriyel protein sentezi, replikasyonlar ve diğer fonksiyonlar, antibiyotiklerin temel hedefleridir (Burns, 1995; Fraimow ve Abrutyn, 1995; Durupınar, 2001).

1.3.1. Bazı Antibiyotiklerin Etki Ettikleri Hedefler

1.3.1.1. Hücre duvarı sentezini inhibe edenler

β -laktamaz inhibitörler, sefalosporin, penisilin, vankomisin, sikloserin, fulvisin, ristosetin, karbapenemler, basitrasin, monobaktamlar, teioplanin, fosfomisin gibi antibiyotikler hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir (Avşar, 2007; Durupınar, 2001; Oryaşın 2012; URL-1).

1.3.1.2. Protein sentezini inhibe edenler

Mitomisin, aktinomisin, streptomisin, tetrasiklin (30S ribozomal yapı), neomisin, kanamisin (30S ribozomal yapı), streptomisin, eritromisin (50S ribozomal yapı), kloramfenikol (50S ribozomal yapı), makrolitler, puromisin, linkomisin, fusidin, klindamisin (50S ribozomal yapı), aminoglikozidler (30S ribozomal yapı), gibi antibiyotikler protein sentezini inhibe etmektedir (Durupınar, 2001; Avşar, 2007; URL-1).

1.3.1.3. Nükleik asit sentezini (DNA-RNA) inhibe edenler

Novabiosin, mitomisin, rifamisin, griseofulvin, aktinomisin, doksorubisin, daunorubisin gibi antibiyotikler nükleik asit sentezini inhibe etmektedir (Avşar, 2007; URL-1).

1.3.1.4. Folik asit sentezi ve metabolizmasının inhibe edilmesi

Kinolonlar (DNA giraz) ve rifampisin (RNA sentezi) gibi antibiyotikler folik asit sentezi ve metabolizmasını inhibe etmektedir (Durupınar, 2001; URL-1).

1.3.1.5. Hücre zarı fonksiyonunu değiştirenler

Polienler, azoller ve polimiksinler gibi antibiyotikler hücre zarı fonksiyonunu değiştirmektedir (Oryaşın, 2012).

Mikroorganizmalar; bu mekanizmalardan birkaçını ya da sadece birini kullanarak, etki mekanizmaları farklı olan antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadırlar (Durupınar, 2001). Antimikrobiyallere karşı direnç gelişiminde rol oynayan etki mekanizmaları Tablo 1.1.'de gösterilmiştir (Yapar ve Erdenizmenli, 2002).

Tablo 1.1. Antimikrobiyallere karşı direnç gelişimine yol açan mekanizmalar

Direnç Mekanizması (Kullanılan ilacın hedefine etkin biçimde ulaşamaması sebepleri)	Etkilenen Antibiyotik
Efflux pompa sistemleri	Kinolonlar
Dış membran geçirgenliğinde azalış	Aminoglikozidler
Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı	Beta-laktamlar, (Omp F, Opr D)
Sitoplazmik transportunda azalış	Tetrasiklinler
İlacın bağlanmış olduğu hedefin değişmesi	Beta-laktamlar, Rifampisinler Kinolonlar, Makrolidler, Glikopeptidler, Linkozamidler
Kullanılan ilacın enzimatik inaktivasyonu	Aminoglikozidler, Kloramfenikoller Beta-laktamlar
Yeni bir metabolik yolun kullanımı	Trimetoprimler

1.4. Antibakteriyel İlaç Direnci

Bir mikroorganizmanın, antimikrobiyal ajanın üremeyi durdurucu veya öldürücü etkisinden korunabilmesi direnç olarak tanımlanmaktadır (Yapar ve Erdenizmenli, 2002). Böylece mikroorganizmalar, zaman içerisinde etkilenmiş oldukları antibiyotiklerden artık etkilenmezler ya da daha az etkilenirler (Avşar, 2007). İlaç direnci ise; mikroorganizmaların etki spektrumları içinde kemoterapötiklerin

terapötik dozlarına karşı kazanılan bir olaydır. Sadece bir ilaca karşı değil, birden fazla ilaca karşı da direnç kazanılmaktadır (Çevikbaş, 1990).

Mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirebilmek için antibiyotik üretimlerini yaptıkları daha önce belirtilmişti. Bu sebeple mikroorganizmalar kendi antibiyotiklerini nötralize eden ya da yok eden direnç mekanizmalarına sahiptirler (Madigan ve Martinko, 2010).

Antibiyotiklere karşı geliştirilen temel direnç mekanizmaları:

- 1- Bakteri hücrelerine, antibiyotiğin girişinin engellenmesi.
- 2- İlacı inaktive eden enzimlerin sentezi ve antibiyotiklerin parçalanması, enzimatik modifikasyon (Beta-laktamaz gibi enzim üretimi).
- 3- İlacın hedefe ulaşmaması ve hedef aldığı molekülün değişikliğe uğraması.
- 4- İlacı hedefin dışında yeni bir metabolik yolağın kullanılması.
- 5- Antibiyotiğin hücre dışına efflux (dışa atım) pompası ile atılması veya hücre içine alınımının azalması (Çevikbaş, 1990; Yapar ve Erdenizmenli, 2002; Çağlar, 2005).

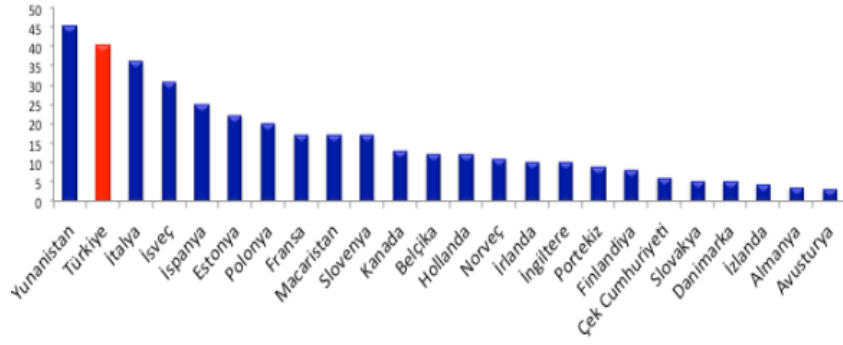
Mikroorganizmaların, antibiyotik ve diğer ilaçlara karşı sağladıkları direnç faktörü sebepleri birkaç grupta incelenebilmektedir. Bunlar; mutasyonlar, hücre duvarının yokluğu, permeabilitenin azalmış olması, kompetatif inhibisyon, antibiyotiğe bağımlılık, plasmide bağlı dirençliliğin olması, uygun kombinasyonun olmaması, hücre membranının transfer sisteminde değişiklik olması ve transpozonlara bağlı dirençliliği (URL-1).

Çeşitli antimikrobiyal grupların direnç gelişimlerin şu şekilde sıralanabilir: Beta laktam ajanlara direnç (Beta laktamazlar, penisilin bağlayan proteinlerde değişiklikler, dış zar proteinlerinde değişiklikler, karbapenem direnci, Aztreonam direnci), Aminoglikozidlere direnç, kinolonlara direnç, Glikopeptidlere direnç, makrolidlere direnç, Linkozamidlere direnç, Trimetoprim-Sulfametoksazole direnç,

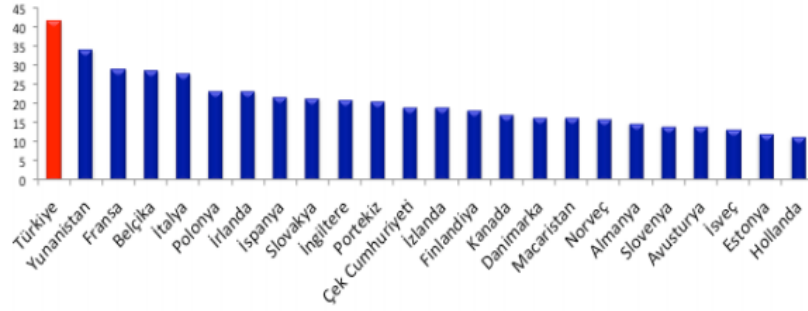
Metronidazol'e direnç (Yapar ve Erdenizmenli, 2002). Çeşitli bakterilerin antimikrobiyal direnç mekanizmaları Tablo 1.2.'de gösterilmiştir (Madigan ve Martinko, 2010). Antimikrobiyal ilaç direncinin bazı ülkeler arasındaki dağılımı ve antibiyotik tüketim oranları Türkiye Ekonomi Politikaları Araştırma Vakfı (TEPAV) tarafından grafiksel olarak sunulmuş olup; Şekil 1.18.'de ve Şekil 1.19.'da gösterilmiştir (TEPAV, 2017; Özkanca, 2018).

Tablo 1.2. *Bakterilerin antimikrobiyal direnç mekanizmaları*

Direnç Mekanizması	Örnek Antibiyotik	Direncin Genetik Temeli	Mekanizmanın Mevcut Olduğu Organizma
Efflux Pompa Sistemleri	Eritromisin Tetrasiklin Kloromfenikol	Kromozomal Plazmid Kromozomal	<i>Staphylococcus</i> spp. Enterik bakteriler <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Geçirgenliğin azaltılması	Penisilin	Kromozomal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Enterik bakteriler
Dirençli biyokimyasal yolun geliştirilmesi	Sülfonamid	Kromozomal	Enterik bakteriler <i>Staphylococcus aureus</i>
Antibiyotik inaktivasyonu (metilaz, penisillinaz,asetilaz, fosforilaz)	Penisilin Kloromfenikol	Plazmid Kromozomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterik bakteriler <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Hedef bölgesinin değiştirilmesi (RNA polimeraz. Rifamisin: ribozom streptomisin, eritromisin. DNA giraz: quinolonlar)	Aminoglikozid Eritromisin Norfloksasin Rifamisin Streptomisin	Plazmid Kromozomal	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Enterik bakteriler Enterik bakteriler Enterik bakteriler



Şekil 1.18. Antimikrobiyal ilaç direncinin ülkeler arası dağılımı (%), 2014



Şekil 1.19. Antibiyotik kullanımının ülkeler arası dağılımı, 2014

İlaçlara karşı geliştirilen dirençler; intrinsik (doğal) direnç, çevre ve şartlara bağlı direnç ve kazanılmış direnç olarak 3 farklı ana kategoriye ayrılabilir (Yapar ve Erdenizmenli, 2002).

1.4.1. Doğal (İntrinsik) Direnç

Doğal (intrinsik) dirençte; mikroorganizmalar, yapısal özellikleri nedeniyle herhangi bir antibakteriyel ajandan etkilenmezler. Buna örnek olarak; Mikoplazma ve Klamidya verilebilir (Yapar ve Erdenizmenli, 2002).

Bu direnç tipinde; yapısal ve kimyasal bazı özellikler sayesinde bakterinin doğasına bağlı olarak meydana gelen bir direnç söz konusudur (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Mikroorganizmalar belli antibiyotiklere karşı doğal dirençlidirler (Madigan ve

Martinko, 2010). Antibiyotiklerin hedef bölgelerini içermezler veya antibiyotiklere kimyasal yapı farklılıkları sebebiyle düşük seviyede geçirgenlik gösterirler. Penisilin buna örnek olarak gösterilebilir. Bu antibiyotiğin hedefi bakteri hücre duvarına yöneliktir ve hücre duvarından yoksun bakteriler için etkili olmamaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1.4.2. Çevre Şartlarına Bağlı Direnç

Çevre ve şartlara bağlı dirençte; mikroorganizmaların aslında duyarlı oldukları bir antibiyotik vardır, fakat buldukları ortam sebebiyle etki gösterememektedir. Bu direnç için ortamın pH'ı, oksijen miktarı ve mikroorganizmanın etkeni olduğu enfeksiyon yeri önemlidir (Yapar ve Erdenizmenli, 2002).

1.4.3. Kazanılmış Direnç

Kazanılmış dirençte ise; mikroorganizmaların, önceden duyarlı oldukları antibiyotiklerden artık etkilenmemeleri söz konusudur. Kazanılmış direnç mutasyonlarda olabileceği gibi plazmid ya da transpozonlar vasıtası ile de gelişebilmektedir (Yapar ve Erdenizmenli, 2002).

Kazanılmış direnç mekanizmaları; genetik ve biyokimyasal olarak iki temel başlık altında incelenmektedir. Biyokimyasal mekanizmalar; 4 kategori içerisinde incelenir ve bunlarında alt kategorileri de bulunup, fazla sayıda çeşitlilik gözlemlenmektedir. Yani, bir bakteri suşu; sahip olduğu direnç sistemlerinden birisiyle direnç oluşturabileceği gibi, birden çok mekanizmayla da direnç kazanabilir. Kazanılmış dirençler de kendi içinde; antibiyotiğin inaktivasyonu, efflux pompası sistemleri ve hücre duvarındaki geçirgenlik değişimi, hedefteki molekülünün değişmesi, diğer mekanizmalar sonucunda gelişen dirençler olarak 4 gruba ayrılabilir (Davies ve Davies, 2010; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1.5. Çapraz Direnç

Mikroorganizmalarda, ilaçlara karşı oluşan direnç, genetiğe bağlı olan ve genetiğe bağlı olmayan direnç şeklinde tanımlanmaktadır. Genetiğe bağlı olan dirençler;

kromozomal, ekstrakromozomal (kromozom dışı) ve çapraz dirençtir. Herhangi bir antimikrobiyal ilaca direnç sağlamış mikroorganizmaların ayrı ya da benzer bir mekanizma ile etkili olan başka bir antibiyotiğe karşı da direnç kazanması durumuna çapraz direnç denilmektedir (Çevikbaş, 1990).

Çapraz direnç durumu, kanamisin ile neomisin veya oleandomisin ile eritromisin gibi genel olarak yapıları benzer ilaçlarda karşılaşılr. Fakat bazen linkomisin ile eritromisin gibi hiç ilgisi olmayan bazı ilaçlar arasında çapraz direnç gözlemlenebilmektedir. (Eliopoulos, 1992; Joklik, Willet ve Amos, 1992; Jawetz, Melnick ve Adelberg, 1995; Mayer, Opal ve Medeiros, 1995; Yüce, 2001) Antitüberküloz ilaçları ve dezenfektanlar (triklozan) gibi bazı mikobakteri suşlarında çapraz direnç (rezistans) olduğu bilinmektedir (Çağlar, 2015).

1.6. Efflux (Dışa Atım) Pompaları

Efflux pompasının ilk olarak 1980 senesinde tanımlanmış ve *E. coli* bakterisinde hücre içinde bulunan tetrasiklinlerin hücre dışına doğru pompalanabildiği bir mekanizma olarak nitelendirilmiştir (McMurry, Petrucci ve Levy, 1980; Özkanca, 2018). Aktif pompalama sistemleri olarak bilinen efflux (dışa atım) pompaları, hücre içinden hücre dışına toksik maddeleri çıkaran, transport proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde, tüm ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda bulunurlar (Bambeke, Balzi ve Tulkens, 2000; Webber ve Piddock, 2003) ve hücreye giren ilaçları hızla dışarı atarlar. Efflux pompa sisteminde görev alan proteinler yapısal açıdan transport proteinlerine benzemektedir ve ATP'ye bağımlıdır (Davies, 1994; Nikaido, 1994; Yüce, 2001). Efflux pompaları direnç mekanizmaları arasında çok önemli bir yere sahiptir. Efflux pompa sistemleri ile oluşturulan dirençler, antibiyotik modifikasyonu olmadan kontsantrasyonunun azaltılması ile gerçekleşmektedir. Azalmış olan hücre membran geçirgenliği yüzünden antibiyotiğin hücreye girişi de azalmaktadır. Meydana gelen bu durum, klinik olarak önem taşıyan birçok bakteride düşük düzeyde dirence sebep olmaktadır. Antibiyotiğin dışa atılımını sağlayan efflux pompa sistemlerinin varlığı öncelikle tetrasiklinler için belirlenmiştir (Bambeke vd., 2000; Çiftçi ve Aksoy, 2015). Tetrasiklinler; enerjiye bağımlı efflux pompa sistemi ile dışarı atılırlar ve

hücre içinde birikemezler. Bu tip direnç, plazmid ya da kromozom kontrolünde sağlanmaktadır. 14 üyeli makrolidler, azalidler, kinolonlar, streptograminler, kloramfenikoller, beta-laktamlara karşı dirençte etkili rol oynamakta ve çok fazla bakteride bulunmaktadır. Örnek olarak; *Staphylococcus aureus*'un *norA* geni efflux mekanizması ile kinolon direncine sebep olur iken, *Escherichia coli* ise yine aynı mekanizma ile norfloksasin için direnç kazanmış olmaktadır. Tetrasiklin için transport proteinlerini kodlayan genler (*tetK*, *tetA-G*), Gram-pozitif ile Gram-negatif bakterilerde bulunmaktadır. Örneğin; *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia coli* türlerinde bulunmakta olan *marRAB* operonunun, tetrasiklinin dışarı atımı ile alakalı olduğu bilinmektedir (Davies, 1994; Nikaido, 1994; Yüce, 2001). Yıllar önce tetrasiklinler için belirlenen bu aktif pompa sistemi günümüzde beta laktam gruplarının da içinde yer aldığı pekçok antibiyotik grubuna karşı dirençte mühim rol oynamıştır. Önceleri gram negatif bakterilerin doğal direncinin dış membrandan kaynaklandığı sanılıyordu, fakat bugün aktif pompa sistemleri bu durumun önüne geçmiştir ve sebep gösterilenler arasında yerini almıştır (Bambeke vd., 2000; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Efflux pompa sistemleri, tek bir substrata özgü olabilmektedir veya yapısal olarak da birbirlerinden farklı maddeleri substrat olarak kullanabilmektedir. Karşılaşılan bu durum, çoklu antibiyotik dirence (MDR) sebebiyet vermektedir. Substrat profili genişliğine bağlı olarak deterjanlar, dezenfektanlar, kanser kemoterapisinde kullanılan bazı ilaçlar, antimikrobiyal peptidler, biyosidler ve bazı boyalara karşı da dirençle karşı karşıya kalınabilmektedir. Mekanizmanın aktive olması, düzenleyici genlerin yapısında oluşan mutasyonlar veya çevresel uyarılar sonucunda olmaktadır ve bu, enerji gerektiren bir durumdur. Gerekli olan enerji ihtiyacı proton aktivasyonu veya ATP'den sağlanmaktadır (Zarakolu, 2003).

Bakterilerde kazanılmış olan antibiyotik direncine sebep olan mekanizmalardan biri antibiyotik konsantrasyonun bakteri hücresi içinde yeterli bir seviyeye ulaşmamasıdır. Bu durum iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Birinci durumda; bakteri hücre zarının porin yitirmesiyle birlikte geçirgenlik azalır ve böylece ilacın hücreye girişi yeterince olamamaktadır. İkinci durumda ise; efflux pompaları çok fazla eksprese olup, etkili bir biçimde antibiyotiği dış ortama atmaktadır. Sorumlu

membran proteinler tarafından, endojen ve ekzojen kaynaklı çeşitli maddeler hücre dışına atılır. Hücre içindeki ve hücre dışındaki ortamlar arasında maddelerin transferi iki türlü gerçekleşir. Bunlar aktif taşıma ve pasif taşımadır. Aktif transfer olayında; kendi içinde aktif taşıma ve veziküller aracılığıyla taşıma yapılır. Pasif taşıma olayında ise; kendi içinde kolaylaştırılmış ve basit difüzyon olarak taşınmaktadır (Brincat vd., 2010; Denis, Rodriguez-Villalobos, ve Struelens, 2011; Bhardwaj ve Mohanty, 2012; Tortora ve Derrickson, 2012; Ughachukwu ve Unekve, 2012; Aygül, 2015). Bütün bakteriyel genlerin yaklaşık olarak %5 ila 10'u taşımada görev almaktadırlar (Lomovskaya vd., 2001; Saier ve Paulsen, 2001; Webber ve Piddock, 2003; Poole, 2005; Özkanca, 2018).

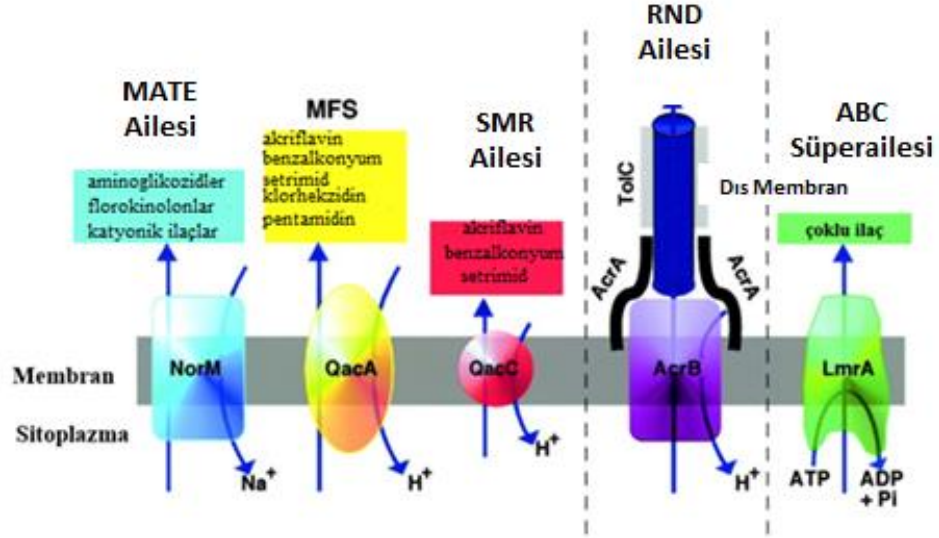
İlaç efflux (dışa atım) pompaları, oldukça aktif olmalarından dolayı, şaşırtıcı bir derecede çok geniş bir ilaç çeşitliliğine olanak sağlamıştır ve geniş bir substrat spesifitesine sahiptirler. İlaçlar, amfifilik özelliği göstermektedirler. İlaç dışa atımı enzim aracılığıyla işleyen detoksifikasyon sistemleri üzerindeki yükü azaltır, böylece enzimleri doyumluğa erişmesi engellenmiş olur. Bu durum, ilaçların amfifitesinde bir artışa sebep olarak, ilaç pompalarına daha uygun substratlar sağlamaktadır (Kolaczowski ve Goffeau, 1997; Bambeke vd., 2000).

Efflux pompa sistemleri, maya, insan, bakteri, küf, mantar gibi her tür hücrede bulunmaktadır. Tetrasiklinler, florokinolonlar, makrolidler için orta ya da yüksek direnç gelişimine sebep olabilmektedirler. Örneğin; florokinolonlar için dirence sebep olanlar *Staphylococcus aureus*, makrolidler için *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus pneumoniae* bulunmaktadır (Cohen, Murray ve Levy, 1988; Masuda vd., 1999; Gülay, 2001).

1.6.1. Efflux Pompa Sistemlerinin Sınıflandırılmaları

Prokaryotlar âleminde 5 süper aile olarak bilinen efflux taşıyıcılar; ABC (ATP Binding Cassette); MATE (Multidrug and Toxic Efflux), MF (Major Facilitator), RND (Resistance-nodulation-division) ve SMR (Small Multidrug Resistance) olarak bilinenlerdir (Lomovskaya vd., 2001; Webber ve Piddock, 2003). Efflux

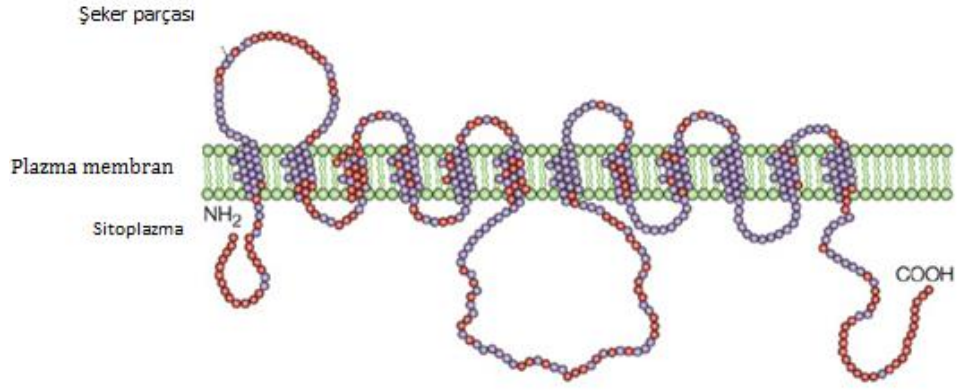
pompalarının şematik olarak karşılaştırılması Şekil 1.20.'de gösterilmiştir (Pidcock, 2006).



Şekil 1.20. Efflux pompalarının şematik olarak karşılaştırılması

1.6.1.1. MF (Major Facilitator)

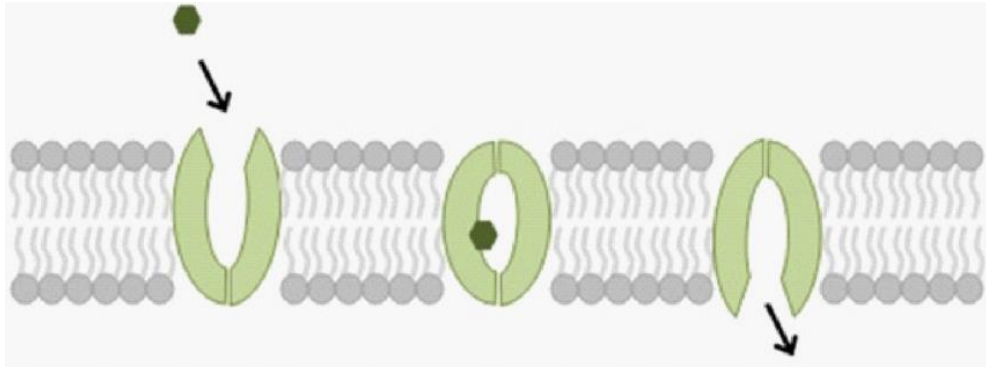
MF taşıyıcıları yaklaşık olarak 400 aminoasit içerirler (Borges, McKeegan ve Walmsley, 2003; Saier vd., 1999). Tipik olarak 12'den fazla olmak üzere transmembran segmenti bulundurlar. Uniport, simport ve antiport sürecini ABC süper familyası ile birlikte düzenler. Krebs döngüsünün, şeker ve ilaçların transportunu sağlar ve benzerlik derecelerine bağlı olarak 17 alt aileye bölünür (Deng vd., 2015). TetA(B) proteini, MF ailesinin üyeleri içerisinde en çok incelenenlerden birisidir (Tamura vd., 2001; Borges vd., 2003). Bu tip efflux pompasının şematik görünümü Şekil 1.21.'de gösterilmiştir (Deng vd., 2015).



Şekil 1.21. Glukoz transporter - GLUT4

1.6.1.2. MATE (*Multidrug and Toxic Efflux*)

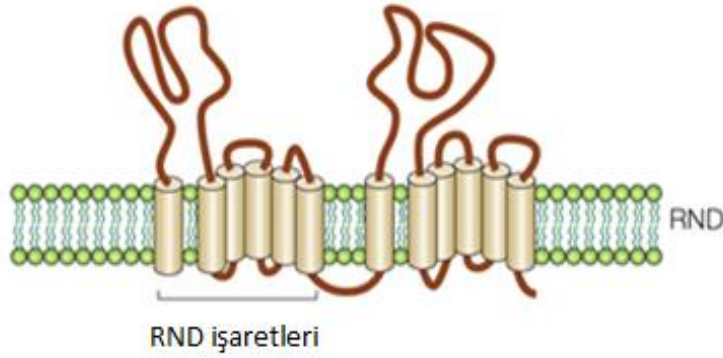
MATE taşıyıcıları, MF taşıyıcılarına benzer bir boyuttadır ve tipik olarak yaklaşık 450 aminoasitten oluşmaktadır. Heliks yapısı 12'dir (Jack, Yang ve Saier, 2001; Borges vd., 2003). Sekans veri tabanlarındaki bilgilere göre, çeşitli mikroorganizmalarda çok fazla sayıda MATE taşıyıcıları mevcuttur. Bilimsel çalışmalarda elde edilen verilere göre şimdiye kadar yaklaşık 20 MATE taşıyıcısı karakterize edilmiştir (Kuroda ve Tsuchiya, 2009). Bir MDR proteininin şematik görüntüsü Şekil 1.22'de gösterilmiştir (Cherak, Gugala ve Turner, 2016).



Şekil 1.22. Proteinin bir ucundan girip diğer ucundan çıkış yaptığını gösteren bir MDR proteinin şematik gösterimi

1.6.1.3. RND (*Resistance-Nodulation-Division*)

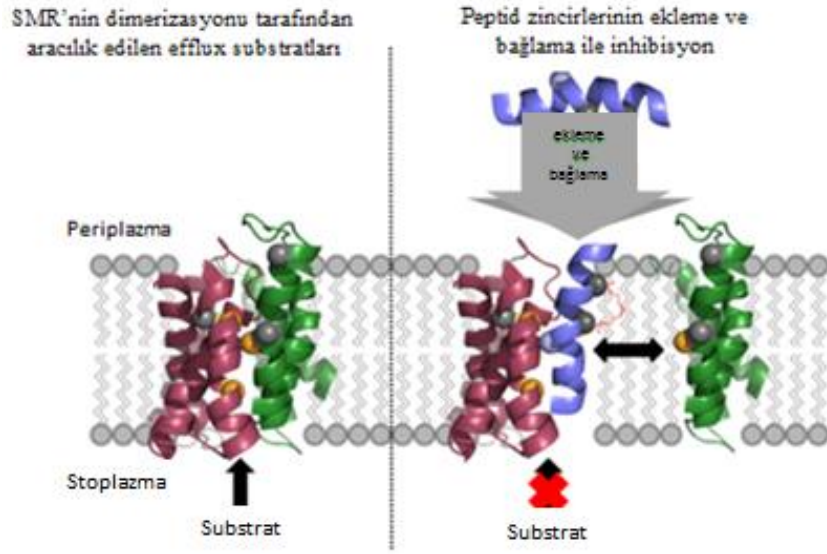
RND taşıyıcıları, MF taşıyıcılarından çok daha büyüktür ve yaklaşık olarak 1000 aminoasit artıkları içermektedir. Yapısal olarak 12 heliks yapıya sahip olduğu öngörülmüştür (Fujihira, Tamura, ve Yamaguchi, 2002; Elkins, ve Nikaido, 2002; Mao vd., 2002; Murakami, Nakashima, Yamashita, ve Yamaguchi, 2002; Borges vd., 2003; Elkins ve Nikaido, 2003). Phenylalanyl-arginyl- β -naphtylamide, RND tipi pompa sisteminde inhibe ettiği bilinen ilk bileşiktir. *Acinetobacter baumannii* bakterisi de RND tipi AdeABC pompasını da inhibe etmektedir (Ribera, Ruiz, Jimenez de Anta ve Vila, 2002; Lomovskaya ve Bostian, 2006; Dal, Dal ve Ağır, 2012). RND transportunun motifi Şekil 1.23’de gösterilmiştir (Loannou, 2001).



Şekil 1.23. RND topolojisi

1.6.1.4. SMR (*Small Multidrug Resistance*)

SMR protein ailesi, bir bakteriyel çoklu ilaç taşıyıcı ailesidir. SMR proteinleri yaklaşık olarak 100-140 aminoasit uzunluğundaki 4 transmembran α sarmalından oluşmaktadır (Paulsen vd., 1996; Chung ve Saier, 2001; Bay, Rommens ve Turner, 2007). RND ve MF ailelerine göre daha küçüktürler ve 4'lü sarmal yapıdadırlar. En iyi tanımlanmış olan SMR pompası *E. coli*'de bulunan ve EtBr (Etidyum Bromür) ve Metil Viologen'e karşı dirence katkıda bulunan, EmrE'dir (Yerushalmi, Lebendiker ve Schuldiner, 1995; Yerushalmi, Lebendiker ve Schuldiner, 1996; Schuldiner vd., 2001; Borges vd., 2003). SMR homoloğu Şekil 1.24'de gösterilmiştir (Sickert, Stone, Poulsen ve Deber, 2015).

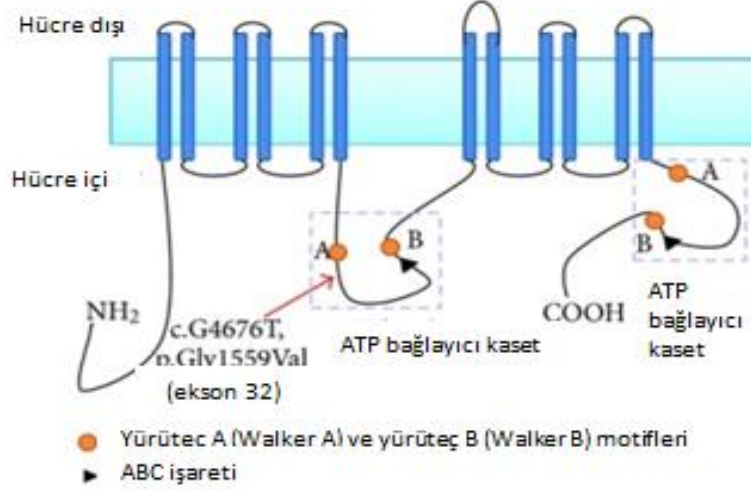


Şekil 1.24. Hsmr'nin bir SMR homoloğu

1.6.1.5. ABC (ATP Binding Cassette)

ABC tipi pompa türünde; çeşitli ilaçlar, endojen bileşikler ve ksenobiyotiklerin, membranlardan taşınmasını sağlayan proteinlerden oluşur. ABC (ATP binding cassette) proteinleri substratlarını membranlardan pompalamakta ve ATP'ye bağlı biçimde çalışmaktadır. Primer aktif taşıyıcı özelliktedirler. Karaciğer, böbrek, bağırsak segmentleri gibi ilaç emiliminden, atılımından ve metabolizmasından sorumlu olan organlar ile birlikte kalp ve beyin gibi elzem dokularda da varlığı bilinmektedir. P-gp (P-glikoprotein), ABC ailesinin önemli bir üyesidir ve meme kanseri direnç proteini (BCRP) ile çoklu ilaç direncine bağlı proteinler (MRP), ilaçların bağırsaklardan dışarı atımında görev almaktadır. Bu sebepten dolayı ABC transporterlarının ilaç metabolitlerinin ve ilaç farmokinetiğinde, detoksifikasyonunda önemli bir rol aldığı bilinmektedir. Bilinen bu ABC proteinleri sağlıklı dokularda eksprese olabildikleri gibi, birçok tümör dokularında da eksprese olabilmektedirler. Bu transporterlar; antineoplastik ilaçları tümör hücrelerinde de atarlar ve ilacın tümör dokusunda toplanmasını engeller. Bu yüzden de uygulanan kemoterapi tedavi yöntemi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Karşılaşılan bu durum MDR olarak bilinmektedir. İster kanser tedavisi, ister antibiyotik tedavisi olsun sorun olarak düşünülmektedir. ABC transporterları ile taşınan ilaçların toksisite ve etkinliklerinde uygulama zamanlarına bağlı olarak farklılıklar gözlemlenmiştir (Kara,

Öztürk, Öztürk ve Okyar, 2013). Bahsi geçen ABC transportunun, ABCA12 proteininin şematik gösterimi Şekil 1.25.'deki gibidir (Walsh vd., 2012).



Şekil 1.25. ABC topoloji, ABCA12 proteini

1.6.2. Efflux Pompalarının Yapısı ve Filogenetik Özellikleri

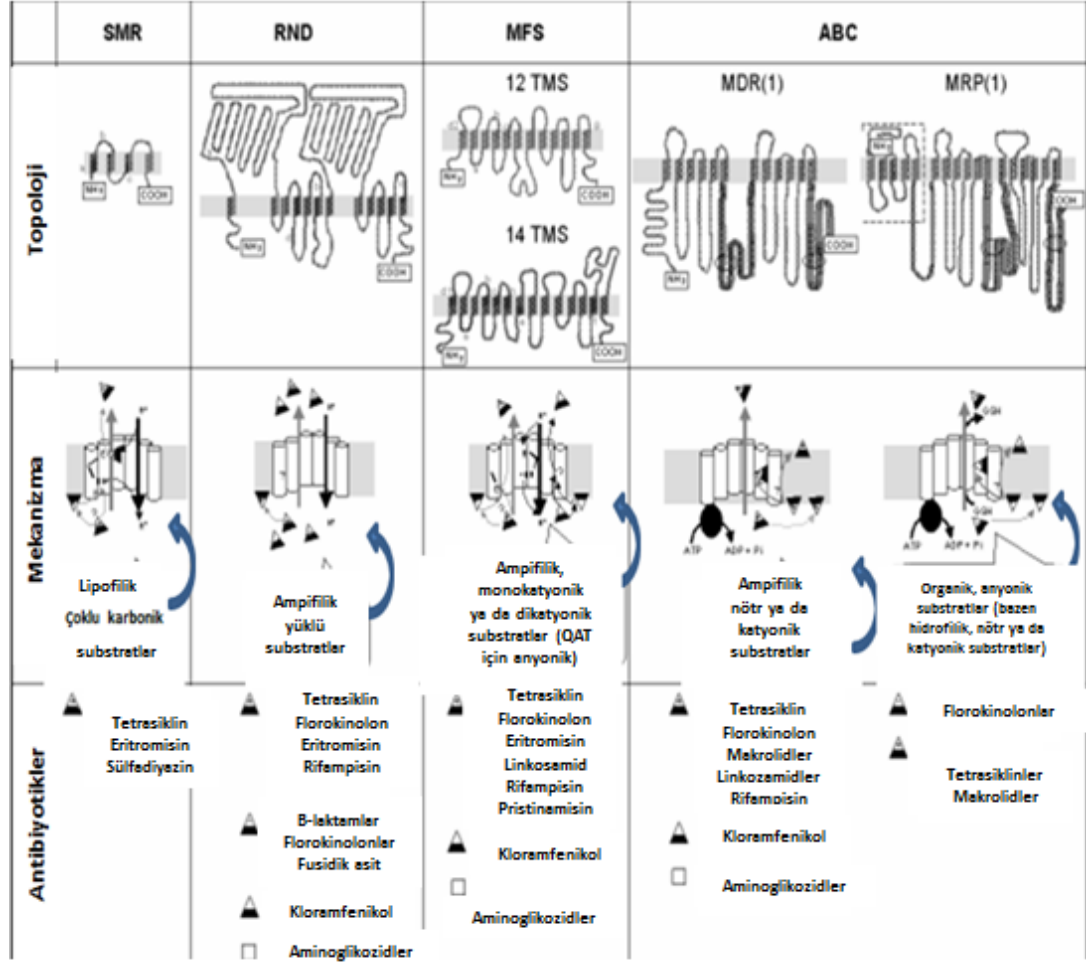
Taşıyıcılar; enerji kaynağı, filogenetik ve yapısal özellikler, substrat spesifikliğı, transport yolu, birincil ve ikincil aktif transport sistemleri olmak üzere sınıflandırılabilir (Paulsen, Sliwinski ve Saier, 1998; Paulsen, Sliwinski, Nelissen, Goffeau ve Saier, 1998; Bambeke vd., 2000).

Birincil aktif transport sistemleri; ABC (ATP-Binding Cassette) üst ailesine bağlı olan 6 tane aile, antibiyotik atılımından sorumludur. Özellikle ökaryot hücrelerden antibiyotik atılımını sağlayan bu aileler önemli rol oynamaktadır. İkincil aktif transport sistemleri (simport, antiport, uniport); 5 üst aile içerisindeki 10 aileden oluşmaktadır. Daha basit yapıya sahiptirler. Bahsedilen 5 üst aile; Multidrug Endosomal Transporter (MET), Small Multidrug Resistance (SMR), Multi Antimicrobial Resistance (MAR), RND (Resistance-Nodulation-Division) ve Major Facilitator Superfamily (MFS)'dir. Prokaryot hücrelerde bulunan üst aileler sadece RND ve SMR'dir. ABC üst ailesine ait olan 4 aile ve MET haricinde kalanlar ise prokaryot hücrelerinin farklı antibiyotik sınıflarının atılımında görev almaktadır (Li, Nikaido ve Poole, 1995; Nikaido, 1998; Bambeke vd., 2000; Nikaido, 2000a; Gülay, 2001).

Sekonder aktif transport sistemi içinde MFS (Membran Fusion Protein), en büyük gruptur. SMR ailesi; DMT (Drug Metabolic Transporter) süper familyasına aittir (Bambeke vd., 2000; Saier ve Paulsen, 2001; Poole, 2005; Bambeke ve Lee, 2006; Hasdemir, 2007; Stavri, Piddock ve Gibbons, 2007; Li ve Nikaido, 2009; Pagès ve Amaral, 2009; Webber ve Coldham, 2010; Tegos vd., 2011; Soto, 2013; Sun, Deng ve Yan, 2014; Aygül, 2015). Gram-negatif bakterilerin antibiyotik direnci için önemli bir yere sahip olan RND üst ailesi, beta-laktam antibiyotikleri için çok önemli bir yere sahiptir. Bu ailenin üyeleri, 3 elemanlı pompa sistemleri ve 3 farklı proteinden oluşmaktadır. Örnek olarak; *Escherichia coli*'de Acr AB-Tol C pompası ve *Pseudomonas aeruginosa*'da ise Mex AB-OprM pompaları verilebilir (Li vd., 1995; Nikaido, 1998; Bambeke vd., 2000; Nikaido, 2000b; Gülay, 2001).

Efflux (Dışa Atım) pompaları yapısal olarak incelendiğinde; mikroorganizmanın hücre duvarı şekline göre farklı biçimlerde organize oldukları gözlemlenmiştir. Gram pozitif bakterilerde dışa atım sistemi hücrenin membranından tek bir pompa proteini ile gerçekleştirilir. Tek pompalı dışa atım proteinleri dar spektrumludur, çünkü antibiyotik, plazmadan periplazmik boşluğa atılır. Gram-negatif bakterilerde ise dışa atım tek pompa proteini veya 3 modül proteinden meydana gelen pompa sistemi ile gerçekleşmektedir. Üç pompalı dışa atım sistemleri geniş spektrumlu özelliğe sahiptir ve çoklu dirence sebep olurlar, çünkü antibiyotik sitoplazmadan dış ortama direkt aktarılır. 3 parçalı bu sistemin birinin özelliği; OMF (Outer Membrane Factor) olarak adlandırılan dış membran faktörü ya da OMC (Outer Membrane Channel) şeklinde nitelendirilen dış membrana oturmuş olan bir kanal proteindir. Diğeri ise; 2 proteinin arasındaki irtibatı sağlayan membran füzyon proteindir (MFP). Üçüncü protein ise; hücre membranına yerleşmiş olan ve dışa atımı sağlayan transport proteinleridir. Bahsedilen pompaların işlevsel olabilmesi için, minimum 12 transmembran segmenti olmalıdır. SMR tipi pompa proteinlerinin de, trimerler şeklinde organize oldukları bilinmektedir (Bambeke vd., 2000; Saier ve Paulsen, 2001; Levy, 2002; Poole, 2005; Bambeke vd., 2006; Hasdemir, 2007; Stavri vd., 2007; Li ve Nikaido, 2009; Pagès ve Amaral, 2009; Webber ve Coldham, 2010; Tegos vd., 2011; Schweizer, 2012; Soto, 2013; Sun vd., 2014; Aygül, 2015). Transportların topolojisi, mekanizması ve antibiyotiklerin şematik gösterimi Şekil

1.26.'de verilmiştir (Georges, Tsuruo ve Ling, 1993; Bakos vd., 1996; Paulsen, Brown ve Skurray, 1996; Bambeke vd., 2000).



Şekil 1.26. Transportların topolojik özellikleri, mekanizması ve antibiyotikler

1.6.3. Antibiyotik Direncinde Klinik Olarak Tanımlanan Bazı Bakteriler

Gram-negatif bakterilerin direnci, gram-pozitif bakterilerin direncine göre daha fazladır. Klinik olarak dirençli tanımlanan bakterilere örnek olarak *Campylobacter jejuni* (CmeABC), *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM, Mex-CD-Oprj, MexEF-Oprn, MexXY-OprM), *Streptococcus pneumoniae* (PrmA), *Staphylococcus aureus* (NorA), *Escherichia coli* (AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrB, EmrD), *Salmonella typhimurium* (AcrB) verilebilir (Kaatz ve Seo, 1995; Gill, Brenwald ve Wise, 1999; Nikaido, 2000b; Poole, 2000; Lin, Michel ve Zhang, 2002; Pumbwe ve Piddock, 2002; Webber ve Piddock, 2003).

1.6.4. Efflux Pompasını İnhibe Edebilen Birtakım Bileşikler

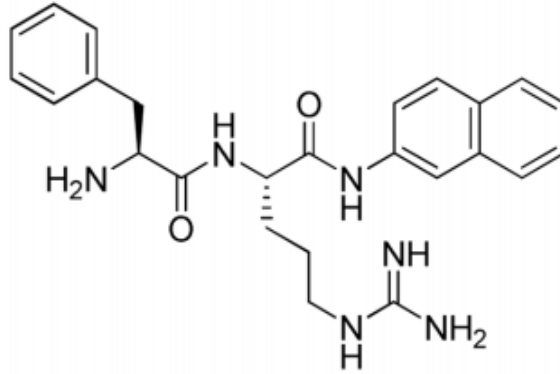
Efflux pompasını inhibe edebilen birtakım bileşenler; INF271, Fenil Arjinin Beta Naftilamid (PAβN), karbonil siyanid *m*-klorofenil hidrozon, birikodar, rezerpin, timkodar, birikodar, milbemisin, verapamil, paroksetin, klorpromazin, omeprozol'dür. Fakat toksisite problemleri olduğundan dolayı klinik kullanımı olan pompa inhibitörleri henüz yaygın değildir (Aygül, 2015).

1.6.4.1. Bilinen inhibe bileşiklere ait örnekler ve kimyasal yapıları

Peptidomimetikler sınıfı

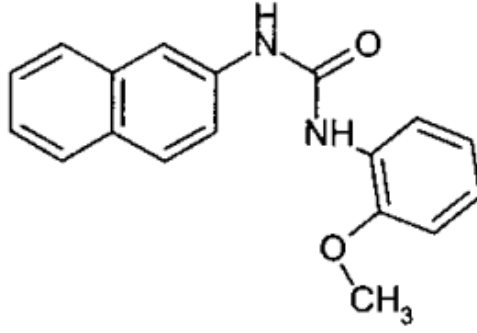
Bu sınıf türünde bulunduğu bilinen üç adet inhibitör vardır. Bunlar:

- Fenil Arjinin Beta Naftilamid (PAβN), (MC-207, 110) inhibitörü, gram-negatif bakterilerde etkindir. Dışa atım sistemleri RND'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.27.'de gösterilmiştir (Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015; Opperman ve Nguyen, 2015).



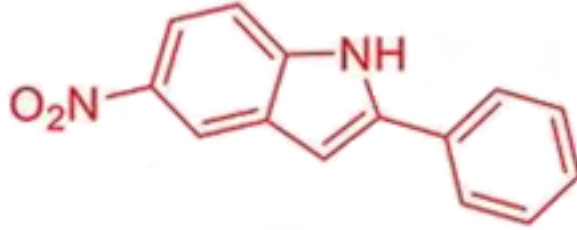
Şekil 1.27. PAβN inhibitörünün kimyasal yapısı

- INF271 (BLT-4) inhibitörü, gram-pozitif bakterilerde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.28.'de gösterilmiştir (Markham, Westhaus, Klyachko, Johnson ve Neyfakh, 1999; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015).



Şekil 1.28. INF271 (BLT-4) inhibitörünün kimyasal yapısı

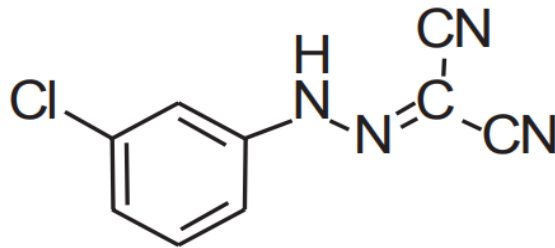
- INF55 inhibitörü, gram-pozitif bakterilerde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.29.'da gösterilmiştir (Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygöl, 2015; Rineh, 2017).



Şekil 1.29. INF55 inhibitörünün kimyasal yapısı

Proton iyonoforları (enerji dekuplör) sınıfı

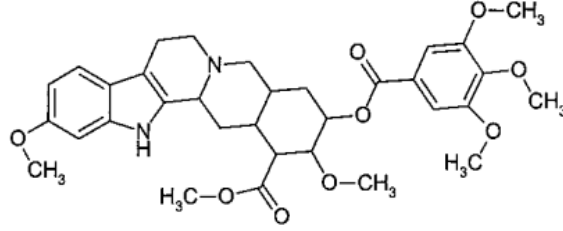
CCCP (Karbonil Siyanid *m*-Klorofenil Hidrazon) inhibitörü, gram-negatif ve mikobakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri; RND, MFS ve MATE'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.30.'da gösterilmiştir (Pagès, Masi ve Barbe, 2005; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygöl, 2015).



Şekil 1.30. CCCP inhibitörünün kimyasal yapısı

Alkaloidler sınıfı

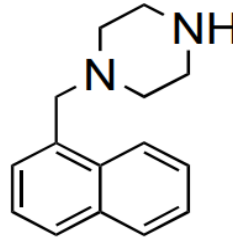
Rezerpin inhibitörü, gram-pozitif bakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS ve ABC'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.31.'de gösterilmiştir (Markham vd., 1999; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015).



Şekil 1.31. Rezerpin inhibitörünün kimyasal yapısı

Piperazin türevleri sınıfı

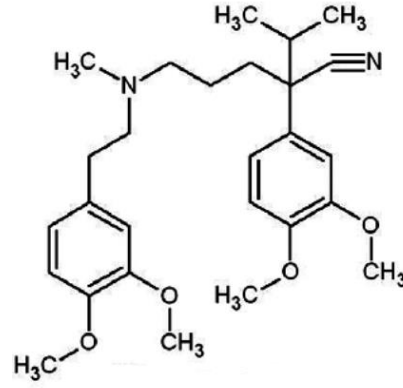
NMP (1-(1-Naftilmetil) Piperazin) inhibitörü, gram-negatif bakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri RND'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.32.'de gösterilmiştir (Bohnert ve Kern, 2005; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015; Yang, Domalaon, Lyu, Zhanel ve Schweizer, 2018).



Şekil 1.32. NMP (1-(1-naftilmetil) piperazin) inhibitörünün kimyasal yapısı

Ca⁺ antagonistleri sınıfı

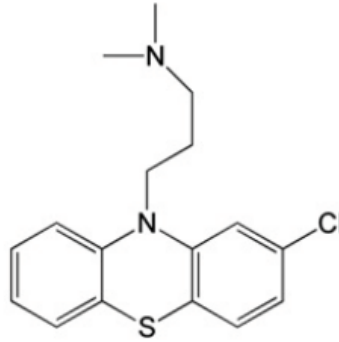
Verapamil inhibitörü gram-negatif ve mikobakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS ve ABC'dir. Kimyasal formülü Şekil 1.33.'de gösterilmiştir (Loo ve Clarke, 2001; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Gadhe ve Cho, 2013; Aygül, 2015).



Şekil 1.33. Verapamil inhibitörünün kimyasal yapısı

Fenotiyazinler sınıfı

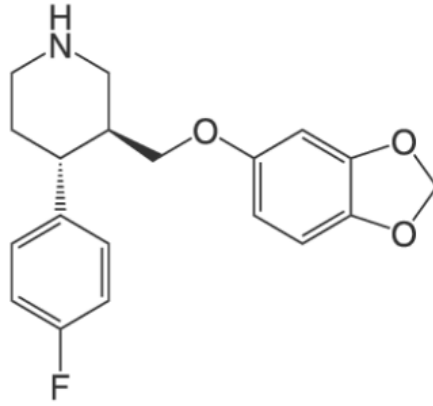
Klorpromazin inhibitörü gram-pozitifler ve mikobakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri ABC ve SMR'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.34.'de gösterilmiştir (Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015; Nys vd., 2016).



Şekil 1.34. Klorpromazin inhibitörünün kimyasal yapısı

Selektif serotonin geri alım inhibitörleri sınıfı

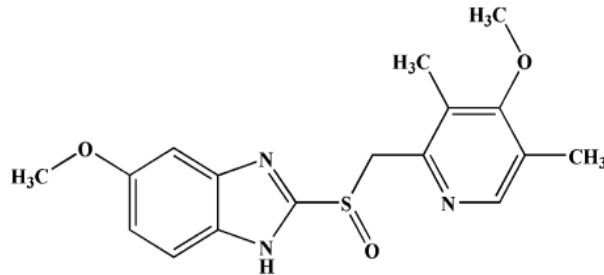
Paroksetin inhibitörü, gram-pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri, MFS ve RND'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.35.'de gösterilmiştir (Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Porto vd., 2012; Aygül, 2015).



Şekil 1.35. Paroksetin inhibitörünün kimyasal yapısı

Proton pompa inhibitörleri sınıfı

Omeprazol inhibitörü, gram-pozitifler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemi MFS'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.36.'da gösterilmiştir (Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygöl, 2015; Pawar, Punith, Naik ve Seetharamappa, 2017).

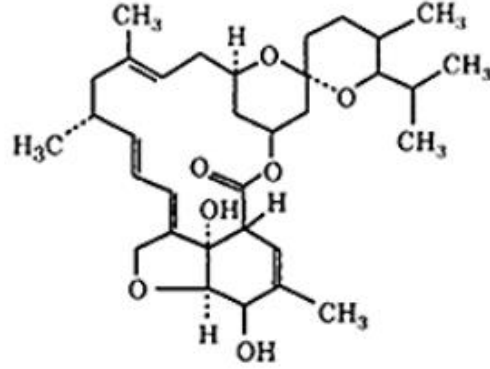


Şekil 1.36. Omeprazol inhibitörünün kimyasal yapısı

Makrolid türevleri sınıfı

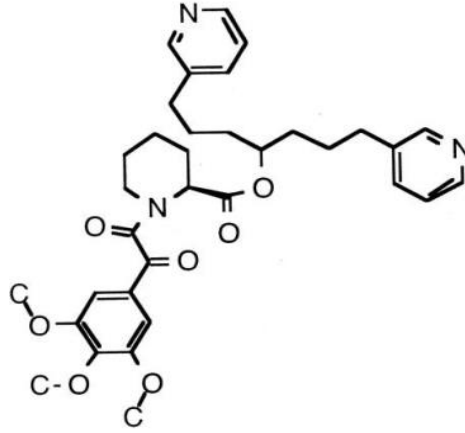
Bu sınıf içerisinde bilinen iki adet inhibitör bulunmaktadır. Bunlar:

- Milbemisin inhibitörü, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemi ABC'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.37.'de gösterilmiştir (Aygöl, 2015; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Bambeke vd., 2006; Abongwa, Martin ve Robertson, 2017).



Şekil 1.37. Milbemisin inhibitörünün kimyasal yapısı

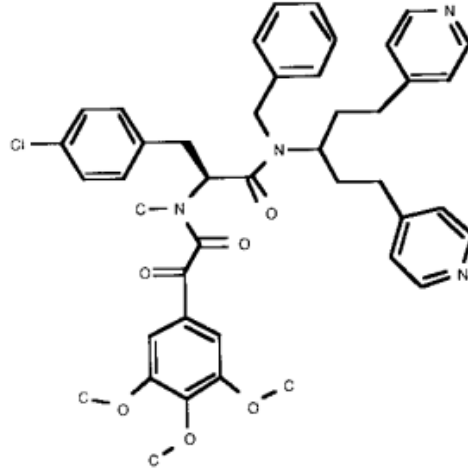
- Birikodar (VX-710) inhibitörü, gram-pozitif ve gram-negatifler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS ve ABC'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.38.'de gösterilmiştir (Mullin, Mani ve Grossman, 2004; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015).



Şekil 1.38. Birikodar (VX-710) inhibitörünün kimyasal yapısı

Piperidin-karboksilik asit türevleri sınıfı

Timkodar inhibitörü (VX-853) inhibitörü, gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde etkindir. Dışa atım sistemleri MFS ve ABC'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.39.'da verilmiştir (Mullin vd., 2004; Bambeke vd., 2006; Li ve Nikaido, 2009; Tegos vd., 2011; Aygül, 2015).



Şekil 1.39. Timkodar (VX-853) inhibitörünün kimyasal yapısı

1.6.5. Pompa Tiplerine Göre Tanımlanan Antibiyotikler

ABC (ATP Binding Cassette); aminoglikozidler, tetrasiklinler, rifampisinler, florokinolonlar, makrolidler, kloramfenikoller, linkozamidler (Bambeke vd., 2000; Li ve Nikaido, 2009; Aygöl, 2015).

MFS (Major Facilitator Superfamily); aminoglikozidler, tetrasiklinler, rifampisinler, florokinolonlar, makrolidler, kloramfenikoller, linkozamidler'e ek olarak pristinamisin (Bambeke vd., 2000; Li ve Nikaido, 2009; Aygöl, 2015).

RND (Resistance-Nodulation-Division); beta-laktamlar, fusidik asid, sülfonamid (Bambeke vd., 2000; Li ve Nikaido, 2009; Aygöl, 2015).

SMR (Small Multidrug Resistance); tetrasiklin, sülfadiyazin, eritromisin. (Bambeke vd., 2000; Li ve Nikaido, 2009; Aygöl, 2015).

Efflux pompa proteinleri üst aileleri, kimyasal substratlar ve konak bakterilerin tablo şeklinde görünümü Tablo 1.3.'de verilmiştir (Zarakolu, 2003).

Tablo 1.3. *Efflux pompa proteinleri üst aileleri, kimyasal substratlar ve bakteriler*

Süper familya	Kimyasal substrat	Konak bakteri
SMR	Antibiyotikler, tetrafenil fosfonium, kuarterner amonyum bileşikleri, antiseptikler	<i>Escherichia, Bacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Mycobacterium</i>
MFS	Antibiyotikler, bazik boyalar, fosfonium iyonları, kuarterner amonyum bileşikleri	<i>Escherichia, Bacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Mycobacterium, Steptococcus, Vibrio</i>
ABC	Etidium alkaloidleri, fosfolipidler, iyonoforlar	<i>Escherichia, Lactobacillus, Staphylococcus, Mycobacterium</i>
MATE	Florokinolonlar, boyalar, aminoglikozidler	<i>Vibrio, Bacillus, Haemophilus</i>
RND	Deterjanlar, yağ asitleri, antibiyotikler, bazik boyalar	<i>Pseudomonas, Neisseria, Haemophilus, Escherichia</i>

1.7. Mikroorganizmalar

Efflux pompaları, gram (-) ve gram (+) gibi birçok mikroorganizmada bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalardan biri de bu tez çalışmasında kullanılan ve gram (-) özelliğe sahip olan *Escherichia coli* bakterisidir.

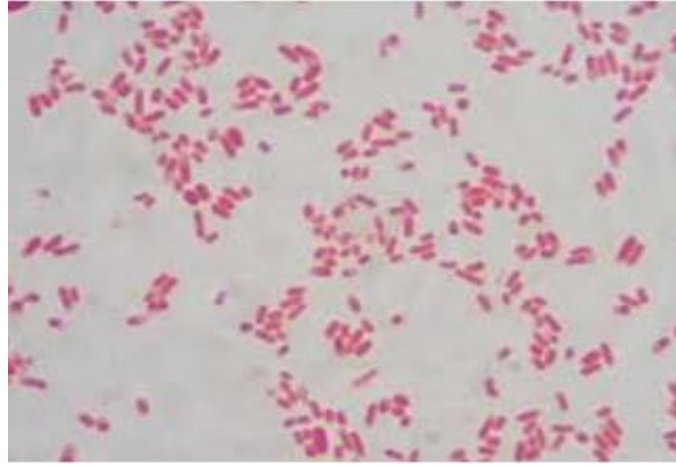
1.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli olarak adlandırılan mikroorganizma Theodor Escherichia tarafından 1885 yılında bulunmuş olup, önceleri *Bacterium coli* ismiyle, ardından Theodor Escherichia soyisini alarak adlandırılmıştır. Yeni doğmuş bebeklerin dışkılarından izole edilmiştir. *E. coli* önceleri uzun zaman boyunca kalın bağırsakta kommensal

olarak yaşıyan canlı olarak düşünölmüştür, fakat daha sonraları bu düşünce etkisini yitirmiştir. Çünkü 1935 yılında bebeklerde ishal vakasında görölmüştür. Bu durumdan dolayı mikroorganizmanın kommensal bir yaşam süremeyeceği öngörölmüştür (Altuner, 2008).

E. coli, nozokomiyal kaynaklı enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Bunun nedeni ise antimikrobiyallere karşı olabildiğince hızlı bir biçimde direnç oluşturması, normal flora elemanı olması ve virölans faktörleri arasında olmasıdır. *E. coli*, üriner sistem enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %70 ve fazlasına sebebiyet vermektedir (Taşdemir, 2009).

E. coli, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olmak ile birlikte gram negatif bir bakteridir. Fakültatif anaerob özelliği gösterir. Sağlıklı ya da hastalıklı insanların veya hayvanların bağırsaklarında yaşamaktadır. *E. coli*, gastrointestinal sistemde (üriner sistem) yaygın olarak bulunmasından dolayı üriner sistem enfeksiyonu, bakteriyel enfeksiyon, gastroenterit, neonatal menenjit gibi hastalıklara sebebiyet vermektedir. *E.coli* bakterisinin mikroskopik görünümü Şekil 1.40.'da gösterilmiştir. (Altuner, 2008; Karn, Sharon, Kumar ve Sharon, 2014).

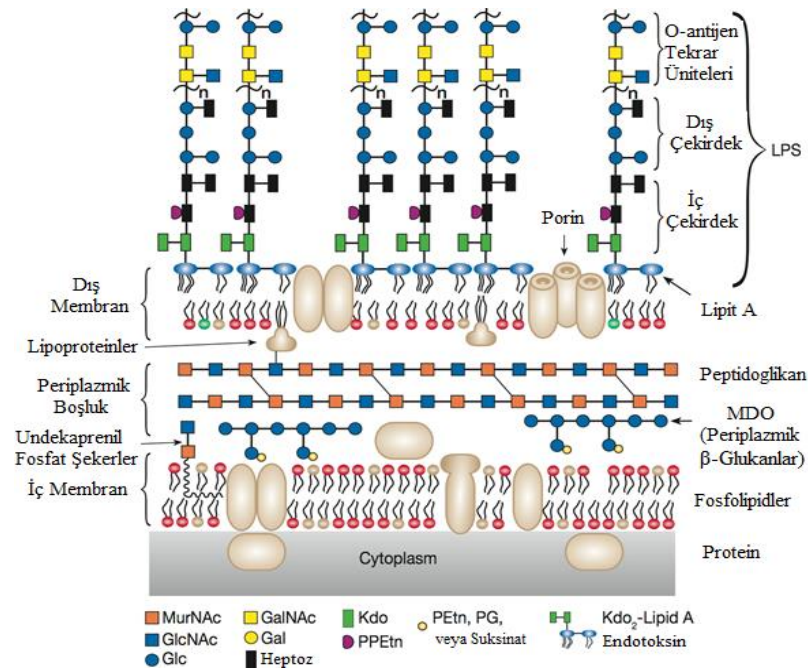


Şekil 1.40. *Escherichia coli* bakterisinin mikroskopik görünümü

1.7.1.1. *Escherichia coli* bakterisinin yapısı

E. coli bakterisi, gram negatif bir bakteri olup çubuk şeklinde ve sporsuz bir bakteri türüdür. Kapsül oluşturmaları nadiren görülür. H kirpik antijenleri ve O somatik

antijen biçimlerine göre tiplendirilebilmekte ve bakteriyofajlarına göre de faj tiplerine sınıflandırılabilirler. Bunların dışında, kolisin tiplerine göre de ayrılabilir ve kolisin antimikrobiyal aktivitesi olan bir bakteriyosin olarak bilinmektedir. *Escherichia coli* bakterisi, jeloz ve peptonlu su gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerde fakültatif anaerob biçimde üremektedir ve optimal üremesi 37°C’de nötr pH varlığında olmaktadır. *E. coli*, sıvı besiyerlerinde ürettiği zaman homojen bir bulanıklık oluşturmaktadır. 24 saatte katı besiyerlerindeki *E. coli* üremesinde ise; ortası kalkık, düzgün kenarlı ve 2-3 milimetre (mm) çapında pigmenti olmayan S kolonileri oluşmaktadır. Laktoz, maltoz, D-sorbitol, D-mannitol, glikozdan asit ve gaz oluşturması, eritrol, metil kırmızısı, indol oluşturması, üreaz oluşturmaması, jelatini hidroliz edememesi, deoksiribonükleaz (DNaz) deneylerinin negatif olması, potasyum siyanid’li (KCN) ortamda ürememesi ve buna benzer birtakım biyokimyasal olaylar *E. coli*’nin önemli özellikleri olarak bilinmektedir. Bakterinin hücre duvar yapısı şematik olarak Şekil 1.41.’de gösterilmiştir (Bilgehan, 2000; Töreci, 2002; Taşdemir, 2009; Varki vd., 2009).



Şekil 1.41. Gram negatif bir bakterinin hücre duvar yapısı

1.7.1.2. Escherichia coli bakterisinin direnci

E. coli bakterisi çok fazla dirence sahiptir. Dezenfektanlara karşı oldukça direnç geliştirmelerine rağmen safra, safra tuzları, sodyum tetratiyonat, sodyum sülfat, brillant yeşili, malaşit yeşili ve selenit tuzlarına karşı daha az dirençli oldukları bilinmektedir ve bu daha az direnç özelliğinden yararlanılarak *Shigella* ve *Salmonella* gibi bakterilere selektif besiyerler geliştirilmektedir. Ayrıca, *E. coli* bakterisinin oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 60°C'de uzun bir süre canlı kalabildiği belirtilmiş olup 8°C'ye kadar da canlılığını yitirmeden kaldığı bilinmektedir. (Bilgehan, 2000; Taşdemir, 2009).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Özer (2013) yapmış olduğu çalışmasında *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* gibi gram negatif bakterilerinde efflux pompalarına etki ettiği bilinen tiyridazin, CCCP ve PAβN gibi inhibitörleri ile birlikte Bisbenzimid maddesini kullanarak bu bakterilerin antimikrobiyal direnç gelişimini belirlemede mikrodilüsyon metoduyla araştırmasını amaçlamıştır. Bisbenzimid maddesi, bakteri içeren 96 kuyucuklu plaka kuyucuklarına eklenip bakteri hücrelerinin DNA yapısına bağlanmasını ve floresans miktarının ölçülmesini sağlayıp nicel değerlerin elde edilmesini sağlamıştır. Böylece floresans miktarına göre hücre içindeki konsantrasyonu belirlemiştir ve efflux pompalarının inhibisyon etkisini gözlemlemiştir. *Acinetobacter baumannii* bakterisi üzerinde Efflux pompasına en etkili olan inhibitörün PAβN olduğunu gözlemlemiştir. PAβN inhibitörünün efflux pompasında en az etkili olduğu gözlemlenen bakteri türü ise *Klebsiella pneumoniae* olarak belirlenmiştir. CCCP inhibitörünün ise efflux pompasını inhibe etmediği ve bununla birlikte Bisbenzimid maddesini de dışarı attığını gözlemlemiştir. Tiyridazin inhibitörünün de efflux pompası aktivitesinde etki göstermediğini gözlemlemiştir. Aynı şekilde CCCP inhibitörünün *E. coli* bakterisi üzerinde de bir etki sağlamayıp efflux pompasını inhibe etmediğini, Bisbenzimid maddesinin de dışarı atımını arttırmış olduğunu gözlemlemiştir. *E. coli* için kullanılan CCCP inhibitörü 4 µL ve 10 µL olarak kullanılmıştır. Bisbenzimidin + bakteri değerleriyle CCCP inhibitörünün bulunduğu kuyucukların değerleri arasında oldukça farklılık olduğunu tespit etmiştir (P<0,0001). Değerlerin, kuyucuklarda bulunan CCCP konsantrasyon miktarına göre değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. CCCP inhibitörü eklenen kuyucuklarda bulunan bütün bakterilerde bisbenzimidin + bakteri kuyucuklarındaki floresans değerlerinden daha düşük veriler elde edildiğini belirtmiştir. 10 µL CCCP inhibitörü eklenen kuyucuklarda bulunan verilerin, 4 µL eklenmiş olan kuyucuklara oranla daha düşük değere sahip olduğunu saptamıştır. Fakat PAβN inhibitörünün *E.coli* bakterisinde efflux pompasını inhibe edip bisbenzimid maddesinin de bakterinin içerisinde kaldığını ve atılmayıp bakterinin DNA yapısına bağlandığı sonucuna ulaşmıştır. PAβN inhibitörü için kullanılan 10 µL değer için en yüksek etki *Acinetobacter baumannii* bakterisinde, 4

μ L değer için ise *E. coli* bakterisi ve *A. baumannii* de saptanmıştır. Araştırmada yer alan grafik sonuçlarına göre alanlar karşılaştırıldığında *E. coli* + bisbenzimid + PA β N değerlerinin *E. coli* + bisbenzimid değerlerinden daha yüksek olduğunun kanıtlandığını belirtmiştir. Bununla birlikte bu değerlerin istatikselsel olarak arasında fark olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Çetinkaya (2007) yapmış olduğu çalışmasında çoklu ilaç direncine sahip olan gram negatif ve gram pozitif bakterilerine karşı efflux pompası inhibitörlerin etkilerini *in vitro* ortamda araştırmıştır. alışılmış olan tüm suşların siprofloksasin'e karşı dirençli olduğunu belirlemiştir. Efflux pompa inhibitörlerini (EPI) kullanarak mikrodilüsyon metoduyla siprofloksasin MİK'leri ile tekrar çalışmış ve *E.coli* ve diğer bakteriler için MİK değerlerinin tespitini yapmıştır. *E. coli* bakterisi için PA β N inhibitörünü kullanmıştır. *E.coli* bakterisinin siprofloksasin MİK değerlerine göre; 25 mg/L PA β N mevcudiyetinde bakteri suşlarının siprofloksasin MİK'lerinin %42,2'sinde yaklaşık 4 kat ve üzeri, %30,9'unda ise 2 kat ve üzeri azalma olduğunu gözlemlerken, %26,9'unda ise bir azalma olmadığını belirtmiştir. 100 mg/L PA β N mevcudiyetine göre değerler ölçüldüğünde ise; bakteri suşlarının MİK'lerinin %83,6'sında 4 kat ve üzeri, %13,4'nde 2 kat azalma olduğu belirtilirken, %3'nde ise bir azalma olmadığını gözlemiştir. Tüm bu değerler göz önünde bulundurulduğunda; gram negatif bakteriler (*E. coli*) için kullanılan PA β N inhibitörünün varlığı sayesinde siprofloksasin MİK değerlerinde bir azalma olduğunu gözlemiştir. Azalan bu MİK değerlerinin sebep olduğu etken olarak efflux pompaların inhibisyonunun etkisi olduğunu düşünmektedir.

oban, Birinci, Ekinci ve Durupınar (2004) yapmış oldukları çalışmada, yüksek düzeyde florokinolon'a dirençli olan *E. coli* bakterilerinin klinik izolatlarında efflux pompası inhibitörlerinin siprofloksasin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. İnhibitör olarak verapamil, lansoprazol, PA β N (MC-207, 110) ve omeprazol' kullanmışlardır. İdrar örneklerinden izole edilen 14 *E. coli* bakterisinin florokinolon'lara karşı oldukça dirençli olduğu belirtmişlerdir. MİK değerlerini Müeller-Hinton sıvı besiyerinde NCCLS'nin (National Committee for Clinical Laboratory Standards) verilerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Deney aşamasında, 20 μ g/mL verapamil

(Sigma), lansoprazol (İlsan, İltaş), PAβN (MC-207,110) (Sigma) ve omeprazol (Sigma) inhibitörlerini kullanmışlardır. Bakterilerin siprofloksasin'e karşı direnç MİK aralığını 16-512 µg/mL olarak hesaplamışlardır. 20 µg/mL omeprazol inhibitörü için siprofloksasin'in MİK değerinde değişiklik olduğunu gözlemleyemediklerini belirtmişlerdir. 20 µg/mL lansoprazol ve verapamil inhibitörleri için MİK değerlerinin iki bakteride 2 kat arttığını gözlemlemişlerdir. 20 µg/mL PAβN için ise altı bakteride 2 kat ve iki bakteride de 4 kat azalmış olarak saptamışlardır. Böylece, izole edilen *E. coli* bakterilerinin siprofloksasin direncine karşı yapılan çalışmada test edilen inhibitör bileşenlerinin çok önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Tuncer (2016), klinik olarak izole edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin izoniazid direncine sebep olan efflux pompalarının saptanmasını çalışmıştır. Yapmış olduğu çalışmada; izoniazid direncine sahip olan izole edilmiş 50 tane *M. tuberculosis* bakterisini kullanmış olup, MİK değerlerini agar dilüsyon yöntemiyle belirlemiştir. Efflux pompasının varlığını göstermek için ise EtBr kimyasal boyasını kullanmıştır. Efflux pompasını inhibe etmek amaçlı ise rezerpin, verapamil ve klorpromazin inhibitörlerini kullanmıştır. Kullanılan inhibitörlerin miktarlarını, MİK değerlerinin ¼ oranında olacak şekilde plaklar hazırlayarak uygulamıştır. *M. tuberculosis*'in izoniazid konsantrasyonunun en düşük MİK değerini 4 µg/mL, maksimum değerini ise >512 µg/mL olarak belirlemiştir. Klorpromazin MİK değeri için en düşük değer 2,5 µg/mL olup, maksimum değerini ise 40 µg/mL olarak saptamıştır. Ayrıca, izole edilenlerin 24 tanesinde ise klorpromazinin MİK değerini 10 µg/mL olarak belirlemiştir. Verapamilin MİK değer sonuçlarını ise minimum 62,5 µg/mL, maksimum 250 µg/mL olarak bulmuştur. Ayrıca, izole edilen *M. tuberculosis* bakterisinin 36'sında MİK değer sonucunu 125 µg/mL olarak saptamıştır. Klorpromazin inhibitörü ve izoniazid kombinesi ile oluşan izolatların 34'ünün MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşüşü, verapamil inhibitörü ile izoniazid kombinasyonu ile oluşan izolatların 18 tanesinin MİK değerlerinde ≥ 1 dilüsyon düşüşü ve rezerpin inhibitörü ile izoniazid kombinasyonu ile meydana gelen izolatların 18 adedinin MİK değerinde de ≥ 1 dilüsyon düşüşü meydana geldiğini saptamıştır. Genel olarak MİK değerleri sonuç olarak belirtildiğinde; MİK değerlerinin 4 µg/mL'den başlamış olup >512 µg/mL'ye kadar yükseldiğini saptamış

ve %90 izolatin MİK değerinin sonucunu ise ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlemiştir. Çalışmasında kullandığı 50 adet dirençli *M.tuberculosis*'in 38 tanesinde (%76) kullanılan inhibitörlerin herhangi bir tanesinin varlığında izoniazid MİK değerinde bir azalma olduğunu saptamıştır. MİK değerlerinde azalma gösteren 21 tane izole bakterinin, efflux pompası varlığını göstermek için EtBr'yi kullanmıştır. 11 tane izolatta, inhibitör içeren ve içermeyenleri floresans yoğunluğuna göre gözlemlemiş ve efflux pompası varlığını belirlemiştir.

Martins ve arkadaşları, (2010) yapmış oldukları çalışmada; çoklu ilaç direncine sahip olan klinik izolatlı bakterileri kullanarak EtBr'li agarda cartwheel yöntemi ile efflux pompalarının varlığını belirlemiştir. Çalışmada kullanmış oldukları bakteriler; dirençli *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* ve *Staphylococcus aureus* suşlarıdır. Yapmış oldukları çalışmanın ilk aşamasında, bakterileri Luria-Bertani (LB) Broth içerisinde büyütmüşlerdir (OD= 0,6; 600 nm) ve efflux pompalarının varlığını gözlemlemek üzere cartwheel yöntemiyle bakteri pasajını EtBr kimyasal boyasını içeren TSB agarları üzerine yapmışlardır. 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L ve 2,5 mg/L olacak şekilde konsantrasyonlarını ayarlamışlardır. UV altında gözlemi yaptıktan sonra, 0,5 mg/L konsantrasyonda efflux pompasının tüm bakterilerde aktif olduğunu, 1,0 mg/L'de bütün bakterilerin efflux pompasının çalışmadığını gözlemlemiştir. 1,5 mg/L, 2,0 mg/L, 2,5 mg/L olan konsantrasyonlarda EtBr kimyasalının fazla miktarda olmasından dolayı EtBr maddesinin dışarı atılmadığı için bakteri içinde kaldığını ve pompanın çalışmadığını saptamışlardır. Pompa varlığını belirledikten sonra çalışmanın ikinci aşamasında, dirençli bakterilere karşı antibiyotik diskleri ve bazı inhibitörler kullanmışlardır. Kullanmış oldukları inhibitörler PA β N, CCCP, klorpromazin (CPZ) ve tioridazin'dir (TZ) (Sigma Aldrich). Yapılan çalışmada iki adet *E. coli* suşu için iki adet antibiyotik (tetrasiklin ve ofloksasin) kullanılmış olup, bu suşların her ikisinde de tetrasiklin ile birlikte kullanılan PA β N inhibitör etkisi gösterirken, bu suşlardan sadece birinde tetrasiklin ile birlikte kullanılan tioridazin inhibitör olarak etki göstermiştir.

Dal (2009) yapmış olduğu çalışmasında, gram negatif bir bakteri türü olan *Acinetobacter baumannii*'yi kullanarak çoklu ilaç direncinde AdeABC pompasının

rolünü araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmasında, MDR'ye sahip olan 14 adet *A. baumannii* bakterisi kullanmıştır. *E. coli* bakterisinde bulunan AcrAB-TolC'un RND protein ailesine üye olan AdeABC pompa sisteminde etkin rol oynadığı için, sıvı mikrodilüsyon testinde *E. coli* ATCC 25922 bakterisini kontrol suşu olarak kullanmıştır. Eritromisin, gentamisin, siprofloksasin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim antibiyotiklerini kullanarak MİK konsantrasyonlarını belirlemiştir. Efflux pompa inhibitörleri olarak ise (RND tipi pompa); 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) ve PA β N bileşenlerini kullanmış olup, mevcudiyetinde ve yokluğunda sıvı mikrodilüsyon metoduyla araştırıp inhibitörler varlığında gerçekteşen antibiyotik MİK değerlerini belirlemiştir. İzole edilen suşların antibiyotiklerinin MİK değerleri 0,25 ile \geq 512 μ g/mL arasında değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. Kullandığı tüm bakterilerin %51,1'inde; PA β N ve NMP inhibitörlerine karşı duyarlılık tespit edildiğini gözlemlemiştir. Grup I olarak çalıştığı bakterilerin antibiyotiklerinin MİK değerlerinde; PA β N'inde 0-2,66 kat yani ortalama 1,4 düşüş gözlemlenirken, NMP'ninde ise 1,66-6 kat yani ortalama 3,74 düşüş olduğunu belirtmiştir. Grup II olarak çalıştığı bakterin %42,9'unda NMP ve PA β N inhibitör bileşenlerinin antibiyotik MİK değerlerinde herhangi bir etkisinin saptanmadığını belirtmiştir. NMP inhibitörünün PA β N inhibitörüne göre daha belirgin oranda düşüşe sebebiyet vermesi, pompa inhibitörünün RND tipi efflux pompasının inhibesinde daha etkili olduğu sonucuna ulaşmıştır. Elde ettiği bu sonuçlara göre, efflux pompa tiplerinden biri olan RND pompasının oldukça etkin bir rolü olduğu ve RT-PCR testi ile elden edilen verilere göre yüksek ihtimalle AdeABC çoklu direnç pompasının olduğunu ortaya koyduğunu belirtmiştir.

Özkanca (2018) yapmış olduğu çalışmasında, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerini kullanarak kademeli bir biçimde oluşturulan antibiyotik direncini bitkisel maddelerle engellemesini amaçlamıştır. CLSI tarafından belirlenen değerler ile mikrodilüsyon yöntemini kullanarak MİK değerlerini oluşturmuştur. MİK değerleri için kullanmış olduğu antibiyotikler siprofloksasin ve meropenemdir. Antibiyotik direncini engellemek amaçlı kullanmış olduğu bitkisel maddeleri ise karanfil yağı, kurkumin, sinnamaldehit, punikalagin ve epigallokateşin gallat olarak belirlemiştir. Kullandığı maddelerin MİK değerlerini de CLSI verilerine göre hesaplamıştır. Standartı sağlamak amaçlı kullanmış olduğu suşlar ise *E. coli* ATCC

25922 ve *S. aureus* ATCC 25923'tür. Standart *E. coli* suşunun meropenem MİK değeri 0,32 mg/L, siprofloksasin MİK değeri ise 0,008 mg/L'dir. Klinik *E. coli* suşunun siprofloksasin MİK değeri 0,125-0,5 mg/L olarak bulunurken, meropenemin MİK değeri ise 0,003-0,032 mg/L olarak bulunmuştur. *E. coli* suşunun siprofloksasin antibiyotiğine karşı dirençli sayılabilmesi için EUCAST değerlerine göre MİK değerinin $\geq 0,5$ mg/L, meropenem için ise ≥ 8 olması gerektiği belirtilmiştir. Kullanılan bitkisel maddelerin MİK değerleri ise *E. coli* için; sinnamdehit 0,25-0,5 mg/L, epigallokateşin gallat 0,12 mg/L, kurkumin 325 mg/L, punikalagin 121,6 ve karanfil yağı 3,47 mg/L olarak belirlenmiştir. *E. coli* bakterisine ait sonuçlar şöyledir; siprofloksasin ve meropenem antibiyotiklerinin 0,001-8 mg/L konsantrasyonları her gün önceki günün 2 katı olacak şekilde tek başına ve bitkisel maddelerle sub-MİK değerleriyle beraber bırakılarak gözlemlenmiştir. Deney süresince antibiyotik kullanmadan bırakılan suşların kontrol grubundaki MİK değerlerinde başlangıca göre artış gözlenmemiş olup siprofloksasin ilacı için 0,025 mg/L olarak kalırken, meropenem ilacı için 0,032 mg/L olarak kalmıştır. Antibiyotik temas ettirilen grup ise 0,001-0,25 mg/L konsantrasyonlarında 9 gün süresince büyümüş ve MİK değerleri 0,032 mg/L'den 0,25mg/L'ye artmış olarak gözlemlenmiştir. Bitkilerden sinnamaldehitin kullanıldığı çalışma grubu 7 gün süresince hayatta kalarak 0,032 mg/L-0,16 mg/L MİK değerlerini gösterirken, karanfil yağının kullanıldığı grup aynı şekilde 7 gün süresince canlı bir biçimde kalarak 0,032 mg/L-0,08 mg/L, epigallokateşin gallat bitkisi grubu 7 gün bitiminde 0,032 mg/L-0,16 mg/L, punikalagin ile kurkumin çalışma grupları 6 günün bitiminde 0,032 mg/L-0,16 mg/L MİK değerleri sonucuna ulaştığı belirtilmiştir. Yapılan pasajlamaların MİK değerleri > 8 mg/L'ye (direnç sınırı) erişmediği için meropenem ilacına karşı direnç kazanılmadığını belirtmiştir. Siprofloksasin antibiyotiği ile kullanılan deney grubunda da *E. coli* için şöyledir; yalnızca antibiyotik ile etkileşim oluşturulan grup 0,001-8,00 mg/L konsantrasyonda 11 gün süresince üreme sağlanmış ve MİK değerleri 0,025-0,8 mg/L konsantrasyona ulaşmıştır. 10. günden itibaren antibiyotik, bakterilere karşı etkisiz hale gelmiştir. Bitki gruplarından sinnamaldehit 6 gün süresince 0,025-0,05 mg/L, karanfil yağı 7 gün süresince 0,025-0,1 mg/L MİK değeri gösterirken, epigallokateşin gallat 6 gün süresince 0,025-0,08 mg/L, kurkumin 7 gün süresince 0,025-0,08 mg/L ile punikalagin 6 gün süresince 0,025 mg/L-0,08 mg/L olarak MİK değerleri belirlenmiş olup siprofloksasin direnç

sınırını $>0,5$ mg/L olarak aşımıştır. Fakat bitkisel ögelerle kombine halde kullanıldığında dirençli MİK değerlerinin aşılamadığı belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan materyal ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Petri Kapları

Bu çalışmada, 90 mm ebatlarında cam petri kapları kullanılmış olup Labor Teknik'ten sipariş edilmiştir ve kullanımdan önce inkübatörde 180°C'de 1 saat süresince steril edilmiştir. Mikroorganizma kültürlerini oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2. LB Broth

LB Broth, (Merck, Almanya) deney aşamasında çalışılan bakteri sayısını arttırıp, bakterilerin çoğalıp zenginleşmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3. Tryptic Soy Broth (TSB)

TSB Broth (Merck, Almanya) bakterilerin zenginleşmesi amaçlı kullanılmıştır.

3.1.4. Agar-Agar

Agar-Agar (Merck, Almanya) besiyeri; TSB ve LB agar oluşturmak için kullanılmış olup, TSB ve LB agar bakteri süspansiyonu hazırlanmasında kullanılacak saf kolonileri elde etmek için kullanılmıştır.

3.1.5. Müeller-Hinton Broth

Deney aşamasında kullanılan *E.coli* suşları MİK çalışmasında ve besiyeri+antibiyotik+inhibitör uygulaması aşamasında kullanılmış sıvı besiyerinde üremesini sağlamak amaçlı kullanılmıştır. Müeller-Hinton Broth (MHB) (Merck,

Almanya); yapılan diğ er çalışmalarda standardizasyonu sağladığı için tercih edilmiştir.

3.1.6. NaCl (Tuz)

NaCl (Merck, Almanya), serum fizyolojik hazırlamak amaçlı kullanılmıştır.

3.1.7. Etidyum Bromür (EtBr)

EtBr (Merck, Almanya) kanserojen bir kimyasal boya maddesi olup, genel olarak moleküler biyoloji laboratuvarlarında nükleik asitlerin flüoresan işaretlemelerinde kullanılmaktadır. DNA'ya bağlanması durumunda moleküllerin ultraviyole (UV) işınları, yani morötesi işıkları altında floresans özelliğine sahiptir. UV işınları altında gözlemlendiğinde turuncu renk ile kendini belli etmektedir. Yapılan deneyde kullanma amacı ise; EtBr'nin UV altında işıma yapması avantajından yararlanarak çoklu ilaç direncine sahip *E.coli* bakterisinin efflux pompasının çalışıp çalışmadığını kontrol edip gözlemleyebilmek için kullanılmıştır. Ayrıca, bu kimyasal madde oldukça zararlı olduğu için solunmaması ve çıplak elle dokunulmaması gerekmektedir. EtBr ve EtBr çözeltilisinin görünümü Fotoğraf 3.1.'de verilmiştir.



Fotoğraf 3.1. EtBr ve çözeltilisinin görünümü

3.1.9. Efflux Pompası İnhibitörleri

Fenil arjinin beta naftilamid (25 mg), verapamil (1 gr) ve tiyoridazin hidroklorür (5 gr) (Sigma Aldrich) bileşenleri, efflux pompasını inhibe etmek amaçlı kullanılmış

olup, görünümü Fotoğraf 3.2.'de görüldüğü gibidir. PAβN inhibitörü -20°C derin dondurucuda bekletilmiştir.



Fotoğraf 3.2. İnhibitörlerin görünümü

3.1.10. Antibiyotik Diskleri

Deneyin son aşaması olan inhibitörlerin etkisini belirlerken, antibiyotik + inhibitör kombinasyonu etkisini ölçmek amaçlı kullanılmıştır. Sefixsim (CFM) (5µg), Seftazidim (CAZ) (10µg), Seftriakson (CRO) (30µg), Sefepim (FEP) (30µg), Aztreonam (ATM) (30µg), Ampisilin (AMP) (10µg), Amoksisilin-Klavulanat (AMC) (30µg), Siprofloksasin (CIP) (5µg), Norfloksasin (NOR) (10µg), Piperasillin-Tazobaktam (TZP) (36µg) Gentamisin (CN) (10µg), Trimetoprim-Sülfametoksazole (SXT) (25µg) ve Ertapenem (ETP) (10µg) (Oxoid, UK). kullanılmıştır. Antibiyotik disk örneği Fotoğraf 3.3.'de gösterilmiştir.



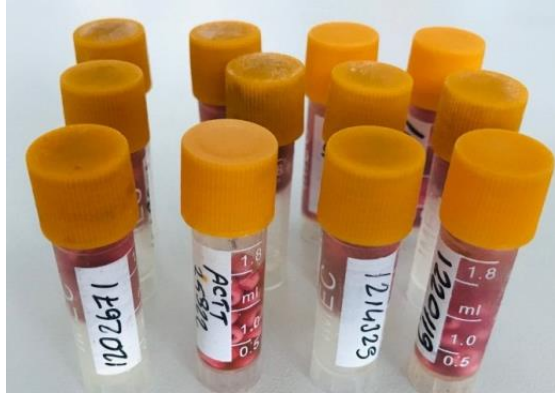
Fotoğraf 3.3. Antibiyotik disk örneği

3.1.11. Falcon Tüpler

LB Broth besiyerlerini dökmek, serum fizyolojik hazırlamak ve inhibitörleri muhafaza etmek amaçlı sterile edilmiş falcon tüpler (Isolab, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.12. Mikrobank Boncuklu Bakteri Saklama Tüpleri

Kullanılan bakteriyi stoklayıp muhafaza edebilmek amacıyla kullanılmış olup, Orbak'dan (Türkiye) sipariş edilmiştir. *E. coli* bakterilerinin muhafaza edildiği boncuklu bakteri saklama tüplerinin görünümü Fotoğraf 3.4.'te verildiği gibidir.



Fotoğraf 3.4. Bakteri saklamak için boncuklu tüpler

3.1.13. Distile Su

Yapılan deney aşamasındaki materyal temizliği ve besiyer hazırlamak için kullanılmıştır. Kullanılan distile su, distile su cihazı tarafından (Human Corporation, Kore) üretilmiştir.

3.1.14. Sterile Distile Su

Yapılan çalışmada, efflux pompa inhibitörlerini hazırlamak amaçlı kullanılmıştır.

3.1.15. Enjektör

Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisini TSB_A agarına aktarmak amaçlı ve inhibitör çözeltilerini filtre ile sterilize edebilmek amaçlı kullanılmıştır (Helmed).

3.1.16. Enjektör Filtresi

EtBr çözeltilisini TSB_A agarına aktarırken ve inhibitör kimyasal bileşenleri çözeltilisini mikroplakalara aktarmadan önce sterile etmek amaçlı steril 0,45 µm'lik enjektör filtreleri (Sartorius stedim) kullanılmıştır.

3.1.17. Otomatik Mikropipetler (10 µl-100 µL ve 100 µL-1000 µL)

92 ve 24 kuyucuklu mikroplakalara bakteri, inhibitör ve MHB yüklemesi yapmak için mikropipetler (Microlit ve Dragon) kullanılmış olup Fotoğraf 3.5.'de gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.5. Mikropipet görünümüleri

3.1.18. Mikropipet Uçları

Otomatik mikropipetlerin uç kısımlarına takılıp işlem yapılması amaçlı sterile edilmiş, 10 µl-100 µL ve 100 µL-1000 µL pipet uçları kullanılmıştır (Isolab, Almanya).

3.1.19. 24 ve 96 Kuyucuklu Mikroplakalar

96 kuyucuklu mikroplakalar (Citotest, Çin) MİK testi için, 24 kuyucuklu mikroplakalar (Cellstar) ise inhibitör uygulamasını yapmak için kullanılmış olup Fotoğraf 3.6.'da gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.6. 24 ve 96 kuyucuklu plaka görünimleri

3.1.20. Steril Eküvyon Çubuğu (Swab) ve Steril Özeler

Bakteri kültürü hazırlamak, mikroorganizmaları pasajlamak ve çizgi ekimi yapmak için kullanılmış olup Loop plast'dan (İtalya) alınmıştır.

3.1.21. Mezür

Hazırlanan çözeltilerin miktarlarını doğru ayarlamak için 100-250-500'er mL'lik cam mezurlar kullanılmıştır (İldam, Türkiye).

3.1.22. Erlenmayer, Beher ve Cam Şişeler

TSB_A ve TSB_B agarlarını birbirlerine ekleyip 200 mL'ye tamamlamak, EtBr gibi çözeltileri hazırlamak ve agarları hazırlamak amaçlı çeşitli ölçütlerde şişeler kullanılmıştır (İsolab, Almanya).

3.1.23. Maske

EtBr gibi kimyasal maddeleri ve agar hazırlama aşamasında solunmayı etkilememesi için maske (Neon) kullanılmıştır.

3.1.24. Alüminyum Folyo Kâğıdı

EtBr çözeltisini ışıktan korumak, malzemelerin sterilizasyonu yapılırken ve petrilerin kontamine olmaması için sarmak amaçlı kullanılmıştır.

3.1.25. Parafilm

Besiyerlerin muhafazası aşamasında kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır (Orlab, Türkiye).

3.1.26. Muayene Eldiveni

Yapılan çalışmalar esnasında el hijyeni ve koruması için kullanılmıştır (Perfect Touch)

3.2. Cihazlar

3.2.1. Hassas Terazî

Deney aşamasında kullanılan malzemeleri tartmak amaçlı hassas terazî (Precisa, İsviçre) kullanılmıştır. Ölçümlerde kullanılan hassas terazinin görünümü Fotoğraf 3.7.'deki gibidir.



Fotoğraf 3.7. Hassas terazi

3.2.2. Otoklav

Deney aşamasında kullanılan materyalleri ve kültür ortamlarını steril etmek amacı ile otoklav cihazı (Wise Clave, Kore) kullanılmıştır. Kullanılan otoklavın görünümü Fotoğraf 3.8.'deki gibidir.



Fotoğraf 3.8. Otoklav

3.2.3. İnkübatör

Durağan bir sıcaklıkta; bakterileri geliştirmek için, kuru sterilizasyonu sağlamak veya hazırlanan besiyerlerinin kontaminasyon kontrolünü sağlamak amacıyla inkübatör (Selecta, İspanya) kullanılmıştır. Çalışmalar esnasında kullanılan inkübatörün içinden bir görünüm Fotoğraf 3.9.'daki gibidir.



Fotoğraf 3.9. İnkübatörün içi

3.2.4. Ultraviyole Lambası (UV)

Efflux pompası çalışan ve çalışmayan bakterileri, florasan içeren EtBr varlığında gözlemleyebilmek amaçlı UV lambası (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.4. Derin Dondurucu

Deney aşamasında kullanılan malzemelerden bakteri içeren mikrobank boncuklu bakteri saklama tüplerini ve fenil arjinin beta naftilamid inhibitörü derin dondurucuda (Vestel, Türkiye) muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Buzdolabı

Hazırlanan besiyerleri ve antibiyotik disklerini buzdolabında (Vestel, Türkiye) muhafaza etmek amaçlı bekletilmiştir.

3.2.6. Biyogüvenlik Kabini

Deney aşamasında çalışılan ortamın steril olması gerektiğinden, yapılan bazı çalışmalar biyogüvenlik kabini (Heal Force, Çin) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma esnasında kullanılan biyogüvenlik kabini içinden bir görünüm Fotoğraf 3.10.'da verilmiştir.



Fotoğraf 3.10. Biyogüvenlik kabin içi

3.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Yapılan çalışmada, çoklu ilaç direncine sahip (MDR) farklı kültürlerden izole edilmiş *Escherichia coli* (*E.coli*) suşları kullanılmıştır (Tablo 3.1.). Kullanılan mikroorganizmaların teşhisi ve MİK değerleri antibiyogram sistem cihazı Phoenix 100'de ölçülmüştür.

Tablo 3.1. *Kullanılan E. coli suşları*

Bakteri	Kodu
Bakteri 1	25922 ATCC
Bakteri 2	#1200740
Bakteri 3	#1202265
Bakteri 4	#1202671
Bakteri 5	#1203120
Bakteri 6	#120912
Bakteri 7	#1210323
Bakteri 8	#1214329
Bakteri 9	#1214816
Bakteri 10	#1219801
Bakteri 11	#1219806
Bakteri 12	#1220119

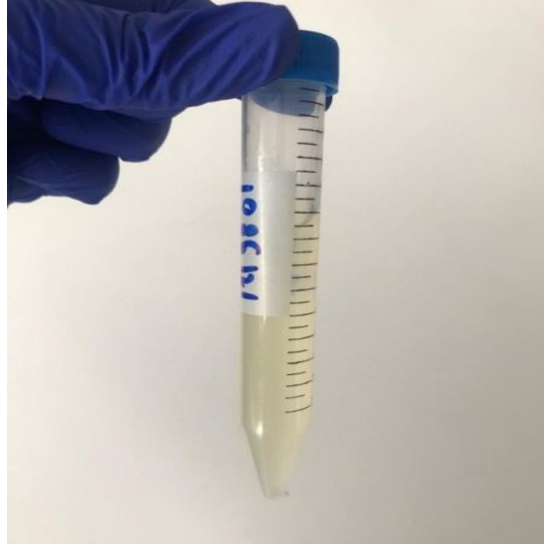
3.4. Besiyeri Hazırlama

3.4.1. LB Broth

25 gram (gr) LB Broth, hassas terazi kullanılarak tartılmıştır ve 1 litre (L) distile su içerisinde karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır ve sonrasında ise 15 dakika (dk) boyunca 121°C’de otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilize edilen LB Broth, daha önce sterilize edilmiş olan falcon tüplere 10’ar mililitre (mL) boşaltılmıştır. LB içeren falcon tüpler inkübatörde kontaminasyon kontrolü yapılmak üzere 24 saat boyunca 37°C’de bekletilmiştir. 24 saat sonrasında kontrol edilen falcon tüpleri daha sonra kullanılmak üzere buzdolabına yerleştirilmiştir.

3.4.1.1. *Bakterilerin LB Broth’a pasajlanması*

Bakteri saklama tüplerindeki *E. coli* bakterileri öze yardımıyla, hazırlanmış olan LB Broth içerisine pasajı yapıp 24 saat 37°C’de inkübatörde üremeye bırakılmıştır. LB Broth üreme sonrasında içerisinde zenginleşen bakteriler sebebiyle bulanıklaşmış olup, görünümü Fotoğraf 3.11.’deki gibidir.



Fotoğraf 3.11. Bakteri içeren LB Broth

3.4.2. LB Agar

7.5 gr Agar-Agar, hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Ardından 500 mL olarak hazırlanan LB Broth içerisine eklenerek çözünmesi sağlanmış olup, 121°C’de 15 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında agar sıcaklığını kaybedip jelleşme olması sağlanmadan, steril cam petri kaplarına dökülmüştür. Steril cam petri kaplarındaki agarlar kontaminasyon kontrolü yapılmak üzere 37°C’de etüvde 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.2.1. LB Agarda Çizgi Ekim

LB Broth içerisinde zenginleştirilmiş olan *E. coli* bakterileri öze yardımıyla çizgi ekimi yapılarak LB Agar’a pasajlanıp koloni oluşturulması amaçlanmıştır. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra üreme için inkübatörde 37°C’de 24 saat bekletilmiştir. LB Agar’da bakteriler üreyip koloni oluşturduktan sonra bir diğer aşama; saf kolonilerinden seçilip serum fizyolojik de çözüldükten sonra EtBr’li TSB agarlarına cartwheel yöntemini uygulayıp pasajının yapılmasıdır. LB Agar’a çizgi ekimi ve kolonilerin görünümü Fotoğraf 3.12.’deki gibidir.



Fotoğraf 3.12. LB Agar'a çizgi ekimi ve koloni görünümü

3.4.3. Tryptic Soy Agar (TSB)

TSB Agar, TSB Broth kullanılarak hazırlanmıştır. TSB Agar iki türlü hazırlanmış olup TSB_A ve TSB_B olarak adlandırılmıştır. TSB'lerin hazırlanış yöntemleri aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.4.3.1. TSB_A hazırlanışı

18 gr TSB Broth ve 9 gr Agar-Agar hassas terazide tartılarak 580 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 121°C'de 15 dk boyunca otoklavlanmıştır. TSB_A agarın 580 mL olarak hazırlanmış olmasının sebebi, üzerine 20 mL Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisinin eklenecek olmasıdır. Böylece TSB 600 mL'ye tamamlanmıştır.

Etidyum Bromürlü (EtBr) TSB_A

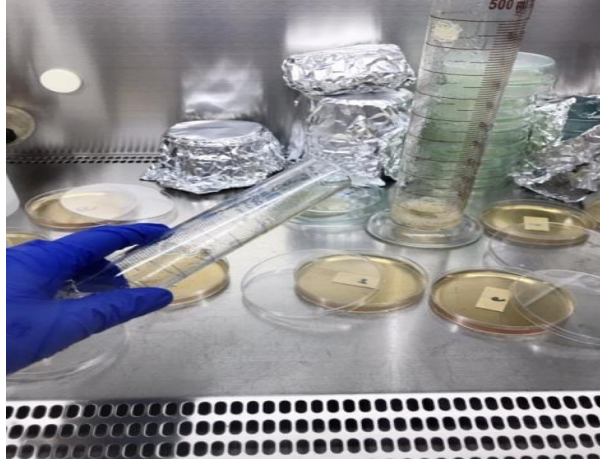
0,0015 gr EtBr hassas terazide tartılarak 20 mL distile su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

3.4.3.2. TSB_B hazırlanışı

600 mL distile su içerisine, hassas terazi kullanarak tartılan 18 gr TSB Broth ve 9 gr Agar-Agar eklenip çözünmesi sağlandıktan sonra 15 dk süresince 121°C'de otoklavlanmıştır. TSB_B agar içerisinde Etidyum Bromür bulunmamaktadır.

3.4.3.3. TSB_A ve TSB_B Agarlarının Petrilere Aktarılması

TSB_A agarının EtBr'li dilüsyon hesabı yapılmış ve sonrasında TSB_B agarı ile belirlenen miktarlarda karıştırıldıktan sonra petri kaplarına dökülmüştür. EtBr dilüsyon hesabı Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. TSB agarlarını petriye dökerken görünümü Fotoğraf 3.13.'deki gibidir.

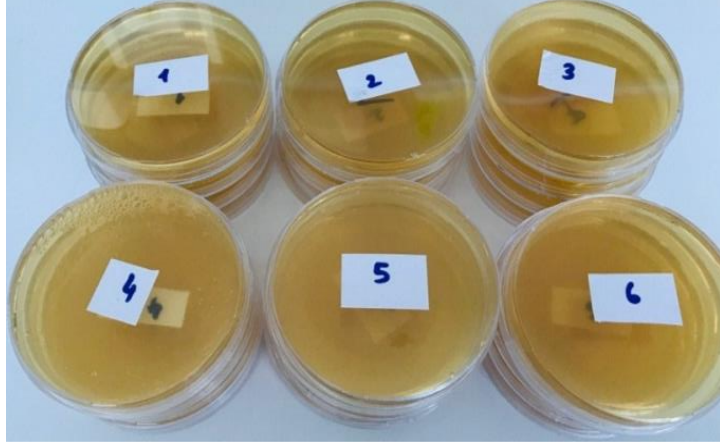


Fotoğraf 3.13. TSB agarların petriye dökümü

Tablo 3.2. EtBr dilüsyon hesabı

Stok (2,5 mg/L)	Stoktan Alınan (TSB_A)	TSB 'den Alınan (TSB_B)	Toplam ($TSB_A + TSB_B$)	
No:1 0 mg/L	0 mL	200 mL	200 mL	Kontrol (TSB_A)
No:2 0,5 mg/L	40 mL	160 mL	200 mL	
No:3 1 mg/L	80 mL	120 mL	200 mL	
No:4 1,5 mg/L	120 mL	80 mL	200 mL	
No:5 2 mg/L	160 mL	40 mL	200 mL	
No:6 2,5 mg/L	200 mL	0 mL	200 mL	Kontrol (TSB_B)

Tablo 3.2’de ki verilere göre hazırlanmış olan TSB’ler petri kaplarına 20 mL olarak dökülmüştür. Yapılan çalışma 2 paralel şekilde tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda EtBr içeren TSB agarlarının, petrilere aktarımı sonrası görünüşleri Fotoğraf 3.14.’de verilmiştir.



Fotoğraf 3.14. Farklı konsantrasyonlarda EtBr içeren TSB agarlarının petrilere görünümü

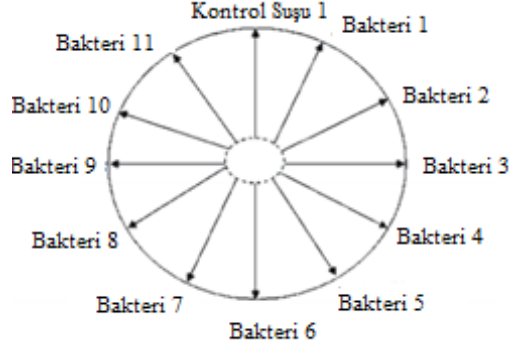
3.4.4. Müeller-Hinton Broth (MHB)

İnhibitörlerin MİK değerinin belirlenmesi ve bakteriye inhibitör + antibiyotik etkisinin uygulanması için MHB besiyeri 1 L olarak hazırlanmıştır.

3.5. Etidyum Bromür (EB) Cartwheel Method (Çember Hareketi Metodu)

Bakterilerin çoklu ilaç direncinden (MDR) sorumlu olduğu efflux pompalarının, çalışıp çalışmadığını belirlemek amaçlı kullanılan bir yöntemdir. Bu, nükleik asitlere bağlandığında floresans yapan EtBr’nin kullanıldığı bir yöntemdir. *E. coli* ATCC 25922 standart suşu, çoklu ilaç direncine sahip diğer bakteriler ile efflux pompalarının çalışıp çalışmadığının karşılaştırılması amaçlı referans suş olarak kullanılmıştır. EtBr hücrelerin içine girer ve efflux pompası çalışmayan çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin hücre içinde EtBr yüksek konsantrasyonda bulunur. Hücreler EtBr’ü dışarı atamazlar ve EtBr nükleik asitlere bağlanarak floresans yapar. Yayılan floresansa bakılarak efflux pompasının çalışmadığı tespit edilir. Turuncu parlak floresans efflux pompalarının çalışmıyor olduğunu göstermektedir. Tüm bu

bilgiler ışığında, cartwheel yöntemiyle pasajlar yapılmıştır. Bu yöntemin uygulanışı Şekil 3.1’de gösterilmiştir (Martins, Couto, Viveiros ve Amaral, 2010).



Şekil 3.1. Cartwheel yönteminin uygulanışı

Şekil 3.1.’de gösterilmiş olduğu gibi bakteriler çizgi halinde pasajlanmıştır. Araştırmada kullanılan bakteri sayısı 12 adettir. Bunlardan 1 tanesi *E. coli* ATCC 25922 standart suşu olup, kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer 11 bakteri ise numaralandırılarak 2 tane petri kabına pasajlanmıştır. İlk petri 1’den 6’ya kadar olan bakterileri, ikinci petri ise 7’den 12’ye kadar numaralandırılmış olan bakterileri içermektedir. 1 numara *E. coli* ATCC 25922 suşunu içermektedir. Bakteriler pasajlanırken 2 paralel şekilde çalışma yapılmıştır. Paralellerden birisi LB Broth içerisinde zenginleştirilen *E. coli* bakterilerinden pasajlanmış olup, diğer paralel de ise serum fizyolojik bakteri süspansiyonundan pasajı yapılmıştır (Mc Farland 0,5). Uygulanan cartwheel yöntemi çalışmasından bir görünüm Fotoğraf 3.15.’de verilmiştir.



Fotoğraf 3.15. Cartwheel yöntemiyle üreyen bakteriler

3.5.1. Birinci Paralel Çalışma (LB Broth İçerisinde Zenginleştirilen *E. coli* Bakterilerinden Cartwheel Yöntemi Oluşturma)

İçerisinde *E. coli* bulunan LB Brothlara steril eküvyon çubukları (swab) daldırıp çıkartılarak TSB agar içeren petrilere pasajlanması yapılmıştır. 1-6 arasındaki ilk petri kabına, 7-12 arasındaki bakteriler ise ikinci petri kabına tek çizgi şeklinde ekilmiştir. Cartwheel yönteminde ekim işlemi yapılırken 6 farklı petri kullanılmıştır. Her petride farklı konsantrasyonda EtBr Tablo 3.2’de belirtildiği gibi bulunmaktadır. 1 numaralı petri de EtBr bulunmamaktadır (0,0 mg/mL) ve kontrol amaçlı kullanılmıştır. Sadece TSB agar içermektedir. 2 numaralı petri 0,5 mg/mL, 3 numaralı petri 1,0 mg/mL, 4 numaralı petri 1,5 mg/mL, 5 numaralı petri 2,0 mg/mL konsantrasyonda EtBr içermektedir. 6 numaralı petri ise 2,5 mg/mL EtBr bulundurmaktadır. Değişen EtBr konsantrasyonu sayesinde bakterilerin dışarı atabildikleri EtBr konsantrasyonu tespit edilmiştir.

3.5.2. İkinci Paralel Çalışma (Bakteri Süspansiyonundan Cartwheel Yöntemi Oluşturma)

Bu çalışmada kullanılacak serum fizyolojik hazırlanırken, 2,25 gr NaCl hassas terazide tartılmış ve tuz önce mezüre aktarılmıştır. Ardından tuzun üzerine distile su eklenerek 250 mL’ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan 250 mL’lik serum fizyolojik otoklavlanıp sterile edilmiştir ve her bir bakteriyi çözmek amaçlı hazırlanan serum fizyolojik steril falcon tüplerine 10’ar mL aktarılmıştır. Daha sonra, steril plastik özeler kullanılarak petrilere ekilmiş olan *E. coli* bakterileri kolonilerin aynı morfolojiye sahip olanlarından alınarak serum fizyolojinin içerisine daldırılıp çözülmesi sağlanmıştır. Bulanıklık 0,5 Mc Farland’a ayarlanmıştır. Ardından, serum fizyolojinin içerisinden steril plastik özeler ile farklı konsantrasyonlarda EtBr bulunan TSB’li petrilere pasajlanması yapılmıştır.

Tüm işlemler tamamlandıktan sonra petrilere inkübatörde 37°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Cartwheel yöntemi uygulama sonrası bakterilerin inkübatörde üremesi sonrası görünümü Fotoğraf 3.16.’daki gibidir.



Fotoğraf 3.16. Cartwheel yöntemi sonrası bakterilerin üremesi

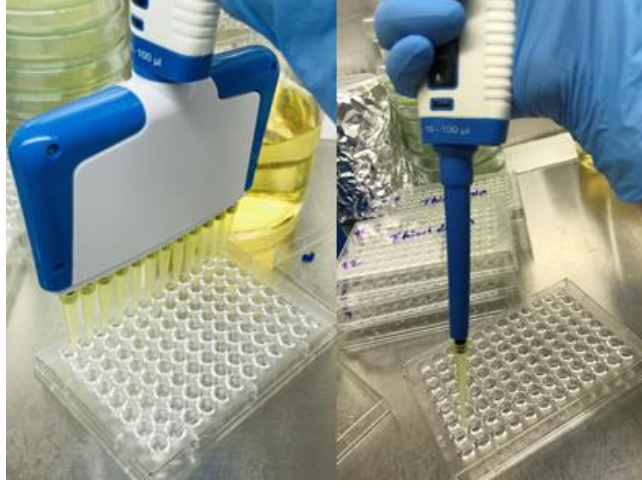
3.6. UV Işığında Efflux Pompalarının Varlığını Gözleme

Cartwheel yöntemi ile ekimi yapılan *E. coli* bakterilerinin karanlık bir ortam sağlanarak UV lambası ile varlığı gözlemlenmiştir. Çeşitli EtBr konsantrasyonuna sahip bakterilerden efflux pompası çalışanların renk vermemesi beklenirken, efflux pompası çalışmayan bakterilerin ise hücre içindeki EtBr nükleik asitlere bağlanarak turuncu bir renk vererek ışımaya yapması beklenmektedir.

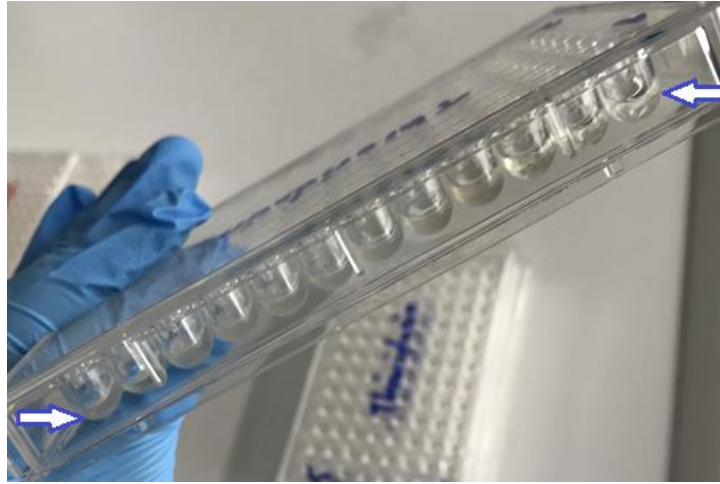
3.7. Efflux Pompası İnhibitörleri İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Efflux pompası inhibitörleri (EPI) olarak; verapamil, tiyridazin hidroklorür ve fenil arjinin beta naftilamid olmak üzere 3 adet kimyasal bileşen kullanılmıştır. Yapılan MİK çalışması, EPI'ler için toksisite miktarını ölçmek amaçlıdır. EPI stok çözeltileri 512 µg/mL olarak hazırlanmış olup, 96 kuyucuklu mikrolakalarda seri dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Uygulama aşamasında kontrol grubu dışındaki her plakanın kuyucuklarına 100 µL MHB + 100 µL inhibitör + 10 µL bakteri eklenmiştir. İlk kuyucuğa 100 µL MHB + 100 µL inhibitör eklendikten sonra ilk kuyucuktan 100 µL alınıp, ikinci kuyucuğa aktarılmış; bu işlem kontrol kuyucuklarına kadar devam etmiş ve son kuyucuktan 100 µL dışarı atılmıştır. 7 adet plaka ile 12 adet çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşu kullanılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol kuyucuklarında ise, pozitif kontrol kuyucuğunda 100 µL MHB + 10 µL bakteri kullanılmışken negatif kontrol kuyucuğuna 100 µL MHB pipetlenmiştir. İnhibitörler hazırlanırken distile sterile su kullanılmış olup, deney aşaması esnasında taze hazırlanmıştır.

Toksisite MİK değerleri için pipetleme çalışmaları Fotoğraf 3.17.'de, seri dilüsyon çalışması ise Fotoğraf 3.18.'da gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.17. Toksisite MİK değerleri için 96 kuyucuklu plakalara pipetleme çalışması



Fotoğraf 3.18. İnhibitör MİK toksisitesi için seri dilüsyon çalışması

3.8. Efflux Pompası İnhibitörlerinin MİK Değerlerine Göre Hazırlanması

Seri dilüsyon yöntemi uygulanıp toksisite MİK değerleri belirlendikten sonra, bir sonraki aşama olan *E. coli* suşlarının EPI'lere karşı davranışlarının gözlenmesi için inhibitörler yeniden hazırlanmıştır. Her bir inhibitör MİK değerinin yarısı (MİK/2) olacak şekilde uygulanmıştır. Buna göre; verapamil için 128 µg/mL (256/2 µg/mL), tioridazin hidroklorür ve fenil arjinin beta naftilamid için 32 µg/mL (126/2 µg/mL) olarak hesaplanmıştır (Martins vd., 2010).

3.9. 24 Kuyucuklu Mikroplakalara İnhibitör, Antibiyotik Diskleri ve Bakteri Yüklemelerinin Yapılması

Deneyin bu aşamasında 13 adet 24 kuyucuklu mikrolakla ile 12 adet çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşu kullanılmıştır. İlk olarak MHB, plakaların tüm kuyucuklarına 1000 µg/mL olacak şekilde yüklenmiştir. Ardından, kontrol grubu haricinde (A1, B1, C1, D1) tüm kuyucuklara, numaralandırılan bakterilerden hangi antibiyotiğe karşı direnci var ise o antibiyotik diski yerleştirilmiş ve o antibiyotiğe karşı dirençli olan bakteriler (10µL) eklenmiştir. Kuyucuklardan ilk satıra EPİ konulmamış olup (A satırı), diğer 3 satıra 3 farklı EPİ eklenmiştir (100µL) (B satırına verapamil, C satırına tiyoridazin hidroklorür ve D satırına PAβN). Yapılan çalışmada pozitif (+) ve negatif (-) kontrol grupları kullanılmıştır. (+) kontrol grubunda MHB + bakteri bulunurken, (-) kontrol grubunda ise sadece MHB bulunmaktadır (Martins vd., 2010).

Yapılan deneyin son aşaması olan inhibitör, antibiyotik ve bakteri yüklemelerinin şematik görünümü Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Plaka	1	2	3	4	5	6	
A	(+) Kontrol	* MHB * Antibiyotik * Bakteri	* MHB * Antibiyotik * Bakteri	* MHB * Antibiyotik * Bakteri	* MHB * Antibiyotik * Bakteri	* MHB * Antibiyotik * Bakteri	EPİ Yok
B	(+) Kontrol	* MHB * Antibiyotik * İnhibitör * Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör * Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	Verapamil
C	(-) Kontrol	* MHB * Antibiyotik * İnhibitör * Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	* MHB * Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	Tiyoridazin Hidroklorür
D	(+) Kontrol	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik * İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik *İnhibitör *Bakteri	*MHB *Antibiyotik * İnhibitör *Bakteri	PAβN

Şekil 3.2. EPİ'ler, antibiyotik diskleri, bakteri yüklemesinin şema görünümü

Şekil 3.2.'de şematik olarak gösterilen uygulama aşamasının plakalar şeklinde görünümü Fotoğraf 3.19.'da verilmiştir.



Fotoğraf 3.19. Antibiyotik diski+inhibitör+bakteri uygulaması plaka örneği

3.10. İstatistiksel Hesaplama

Deneyler üçer tekrarlı olarak yapılmış olup, tekrarlar arasındaki farkın istatistiksel değerlendirilmesinde R Studio v 3.3.2 programı kullanılmıştır. Verilerin gruplar arasındaki dağılımı ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. p -değeri 0,05'den küçük olduğunda gruplar arasındaki fark anlamlı kabul edilmiştir (Core R Team, 2016).

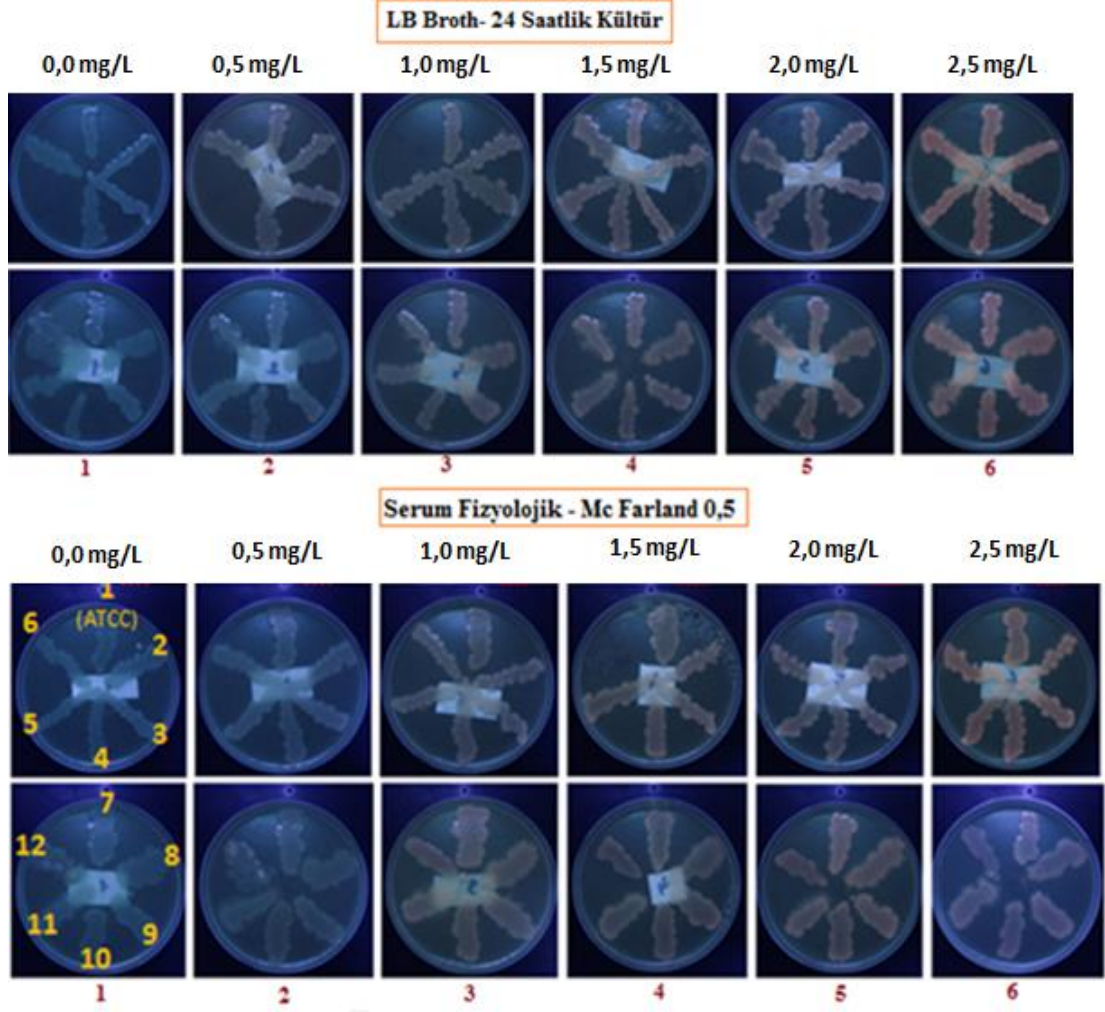
4. BULGULAR

4.1. EtBr Varlığında UV Altında Efflux Pompası Belirleme

Yapılan tez çalışmasında; EtBr varlığında cartwheel yöntemi ile ekimi yapılan çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* bakterilerinin, UV ışığı altında gözlemlenen efflux pompalarının çalışması ile ilgili elde edilen sonuç bilgileri aşağıda verilmiştir. Yapılan çalışma, LB Broth 24 saatlik kültür ortamı ile serum fizyolojik Mc Farland 0,5 olmak üzere 2 farklı şekilde yapılmıştır.

Toplamda 12 adet *E. coli* bakteri suşu kullanılmış olup, bunlardan sadece bir tanesi standart *E. coli* suşudur (ATCC 25922). Standart suş referans olarak kontrol amaçlı kullanılmıştır. Kalan diğer bakteriler ise 11 farklı klinik izole çoklu ilaç direncine sahip (MDR) suşlarıdır. Kullanılan bakteriler, Tablo 3.2’de gösterildiği gibi çeşitli konsantrasyonlarda EtBr içeren TSB agarlarına cartwheel yöntemi ile pasajlanmıştır.

Elde edilmiş olan verilere göre, üreme sonrasında efflux pompalarının çalışıp çalışmadığı UV ışığı altında görüntülenmiştir ve elde edilen sonuçlar Fotoğraf 4.1.’de verilmiştir.



Fotoğraf 4.1. *E.coli* bakterilerinin UV altında efflux pompalarının çalışıp çalışmadığının gözlemlenmesi

Fotoğraf 4.1.'de görüldüğü üzere; 1 numaralı petripler kontrol amaçlı kullanılmıştır ve sadece TSB agar içermektedir. İçerisinde EtBr bulunmamasından dolayı herhangi bir floresans gözlenmemiştir.

2 numaralı petripler 0,5 mg/L en düşük konsantrasyona sahip EtBr içermektedir. Standart olarak kullanılan ATCC suşu haricindeki diğer bakteriler, içerisinde bulunan kimyasal maddeyi dışarı atabilmiştir. Standart suşda ise efflux pompası EtBr'yi dışarı atamadığından, EtBr bakterinin nükleik asitlerine bağlanıp floresansa sebep olmuştur. Floresans, UV altında parlak turuncu bir renkte görülmektedir. Klinik izole diğer diğer 11 bakterinin ise efflux pompasının çalıştığı ve aktif olduğu gözlemlenmiştir. Bakteriler efflux pompaları ile EtBr'yi hücre dışına atmışlardır.

Çalışılan 11 bakterinin de efflux pompasının dışarı atabildiği maksimum EtBr konsantrasyonunun aynı olmadığı gözlenmiştir.

3 numaralı petriler 1,0 mg/L EtBr içermektedir. 0,5 mg/L EtBr içeren 2. petriye göre 11 bakterinin yaptığı floresans belli olmaya başlamıştır. Konsantrasyon arttığı için EtBr, bakteri hücre içinde birikmeye başlamıştır. 3 numaralı petrilerden sadece 5 numaraya ekilen suşun efflux pompasının bu konsantrasyondaki EtBr'yi dışarı atabildiği görülmektedir.

4 numaralı petrilerde bulunan EtBr konsantrasyonu 1,5 mg/L, 5 numaralı petrilerde bulunan EtBr konsantrasyonu ise 2,0 mg/L'dir. Konsantrasyon gittikçe arttığından dolayı, bakteride biriken EtBr artmıştır. Bu sebeple UV altında görülen floresansta da artış söz konusu olmuştur.

6 numaralı son petriler ise kontrol amaçlı kullanılmış olup yüksek miktarda EtBr içermektedir (2,5 mg/L). EtBr oranı fazla olduğu için tüm bakterilerde oldukça yüksek bir floresans meydana gelmiştir.

4.2. Antibiyogram Sonuçlarına Göre MİK Değerleri

Çalışmada kullanılan suşlar, Phoenix 100 cihazındaki MİK değerlerine göre baz alınmış olup sadece dirençli olunan antibiyotiklere karşı çalışma yürütülmüştür. Antibiyogram sonuçlarına göre MİK değerleri Tablı 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *MİK değerleri*

Antibiyotikler	#Bakteri 2	#Bakteri 3	#Bakteri 4	#Bakteri 5	#Bakteri 6
Amikasin	< = 4 (S)	< = 4 (S)	< = 4 (S)	< = 4 (S)	< = 4 (S)
Gentamisin	< = 1 (S)	2 (S)	2 (S)	< = 1 (S)	< = 1 (S)
Ertapenem	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)
İmipenem	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	< = 0.25 (S)	2 (S)
Meropenem	< = 0.13 (S)	< = 0.13 (S)	< = 0.13 (S)	< = 0.13 (S)	< = 0.13 (S)
Sefiksim	< = 0.5 (S)	> 2 (R)	< = 0.5 (S)	< = 0.5 (S)	1 (S)
Seftazidim	< = 1 (S)	4 (I)	< = 1 (S)	< = 1 (S)	< = 1 (S)
Seftriakson	< = 1 (S)	> 4 (I)	< = 1 (S)	< = 1 (S)	< = 1 (S)
Sefepim	< = 1 (S)	2 (I)	< = 1 (S)	< = 1 (S)	< = 1 (S)
Aztreonam	< = 1 (S)	4 (I)	< = 1 (S)	< = 1 (S)	< = 1 (S)
Ampisilin	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	< = 2 (S)	> 8 (R)
Amoksisilin-Klavulanat (f)	16/2 (R)	4/2 (S)	16/ 2 (R)	4/2 (S)	8/2 (R)
Piperasillin-Tazobaktam	< = 4/4 (S)	< = 4/4 (S)	< = 4/4 (S)	< = 4/4 (S)	< = 4/4 (S)
Kolistin	< = 1 (X)	< = 1 (X)	< = 1 (X)	< = 1 (X)	< = 1 (X)
Trimetoprim-Sülfametoksazole	< = 1/19 (S)	> 4 / 76 (R)	< = 1/ 19 (S)	> 4 / 76 (R)	> 4 / 76 (R)
Fosfomisin w/G6P	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)
Nitrofurantoin	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)	< = 16 (S)
Siprofloksasin	< = 0.25 (S)	> 1 (R)	> 1 (R)	> 1 (R)	> 1 (R)
Norfloksasin	< = 0.5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)

(S): Duyarlı

(R): Dirençli

(I): Orta Dirençli

Tablo 4.1. 'in devamı

Antibiyotikler	#Bakteri 7	#Bakteri 8	#Bakteri 9	#Bakteri 10	#Bakteri 11	#Bakteri 12
Amikasin	<= 4 (S)	8 (S)	8 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)
Gentamisin	2 (S)	2 (S)	> 4 (R)	2 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Ertapenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	> 1 (R)	<= 0,25 (S)
İmipenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	2 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	0,5 (S)
Meropenem	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	X	<= 0,13 (S)
Sefiksim	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)	<= 0,5 (S)	> 2 (R)
Seftazidim	<= 1 (S)	2 (I)	> 8 (R)	> 8 (R)	<= 1 (S)	> 8 (R)
Seftriakson	<= 1 (S)	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)	<= 1 (S)	> 16 (R)
Sefepim	<= 1 (S)	4 (I)	> 8 (R)	<= 1 (S)	2 (I)	> 8 (R)
Aztreonam	<= 1 (S)	2 (I)	> 16 (R)	8 (R)	<= 1 (S)	> 16 (R)
Ampisilin	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	<= 2 (S)	> 8 (R)
Amoksisilin-Klavulanat (f)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	4/2 (S)	16/2 (R)
Piperasillin-Tazobaktam	> 16/4 (R)	> 16/4 (I)	8/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)
Kolistin	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)
Trimetoprim-Sülfametoksazole	> 4 / 76 (R)	> 4 / 76 (R)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)
Fosfomisin w/G6P	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)
Nitrofurantoin	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	32 (S)
Siprofloksasin	<= 0,25 (S)	> 1 (R)	> 1 (R)	0,5 (I)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)
Norfloksasin	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	1 (I)	<= 0,5 (S)	<= 0,5 (S)

(S): Duyarlı

(R): Dirençli

(I): Orta Dirençli

4.3. İnhibitörlerin Toksikitesi İçin MİK Test Sonuçları

512 µg/mL olarak hazırlanan inhibitörlerin MİK değeri sonuçları Tablo 4.2.'de ve Tablo 4.3.'de verilmiştir. İstatistiksel analizler paralel çalışmalar arasında istatistiksel açıdan fark olmadığını ortaya koymuştur (p -değeri > 0,05).

Tablo 4.2. *Verapamil İnhibitörü için Toksikite MİK Değerleri*

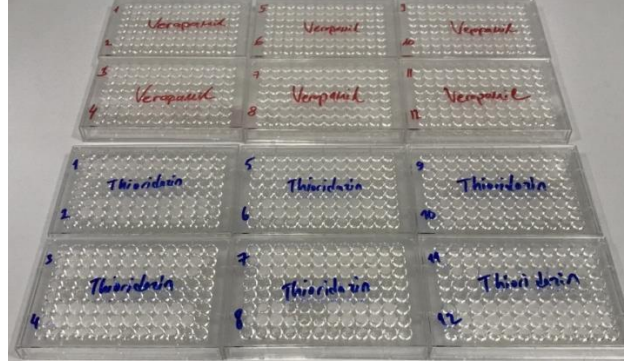
Verapamil İnhibitörü	İnhibitör İçin MİK Değeri
1. Bakteri	>256 µg/mL
2. Bakteri	>256 µg/mL
3. Bakteri	>256 µg/mL
4. Bakteri	>256 µg/mL
5. Bakteri	>256 µg/mL
6. Bakteri	>256 µg/mL
7. Bakteri	>256 µg/mL
8. Bakteri	>256 µg/mL
9. Bakteri	>256 µg/mL
10. Bakteri	>256 µg/mL
11. Bakteri	>256 µg/mL
12. Bakteri	>256 µg/mL

Tablo 4.3. *Tiyoridazin Hidroklorür İnhibitörü İçin Toksikite MİK Değerleri*

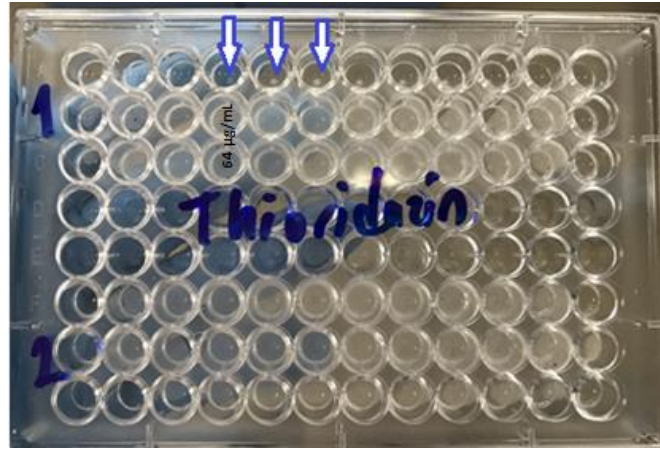
Tiyoridazin Hidroklorür İnhibitörü	İnhibitör İçin MİK Değeri
1. Bakteri	64 µg/mL
2. Bakteri	128 µg/mL
3. Bakteri	128 µg/mL
4. Bakteri	128 µg/mL
5. Bakteri	128 µg/mL
6. Bakteri	128 µg/mL
7. Bakteri	128 µg/mL
8. Bakteri	128 µg/mL
9. Bakteri	128 µg/mL
10. Bakteri	128 µg/mL
11. Bakteri	128 µg/mL
12. Bakteri	128 µg/mL

PAβN inhibitörü için madde miktarının azlığından dolayı MİK testi yapılamamıştır. PAβN için MİK değeri, iki inhibitör için en düşük değer olan 64 µg/mL seçilmiştir.

İnhibitörler için MİK toksisite bulgularından bir görünüm Fotoğraf 4.2.'de ve Fotoğraf 4.3.'de gösterilmiştir.



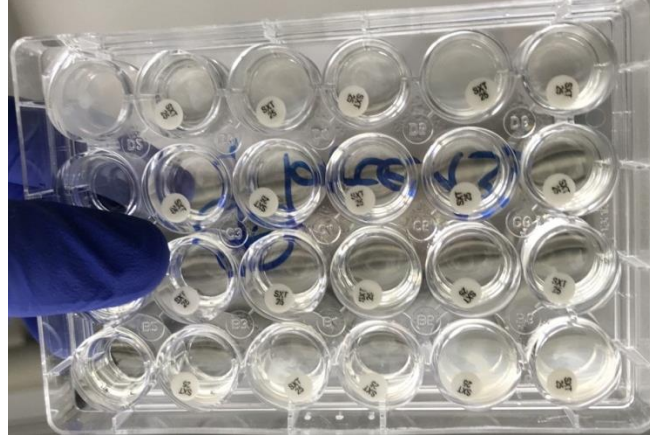
Fotoğraf 4.2. İnhibitörler için 96 kuyucuklu plakalarda MİK toksisitesini belirleme testi



Fotoğraf 4.3. Belirlenen MİK değeri örneği

4.4. MDR *E. coli* Suşlarının Efflux Pompası İnhibitörlerine Karşı Davranışları

Çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşlarının, efflux pompasını inhibe etme özelliği olduğu bilinen verapamil, tiyridazin hidroklorür ve PAβN inhibitörlerine karşı davranışları yapılan deney aşamaları sonucunda gözlemlenmiş olup 24 kuyucuklu plaka çalışmalarından görünüm Fotoğraf 4.4.'de verilmiştir. İnhibitör sonuçları ise Tablo 4.4., Tablo 4.5., Tablo 4.6., Tablo 4.7, Tablo 4.8., Tablo 4.9., Tablo 4.10., Tablo 4.11., Tablo 4.12., Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.'de gösterilmiştir.



Fotoğraf 4.4. Antibiyotik diski+inhibitör+bakteri uygulaması sonucundan bir görünüm

Tablo 4.4. Bakteri 2'nin inhibitör etkileri

Bakteri 2		EPI'ler
AMP (+)	AMC (-)	EPI Yok
AMP (-)	AMC (-)	Verapamil
AMP (-)	AMC (-)	Tiyoridazin HCl
AMP (+)	AMC (-)	PAβN

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

2. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 2; AMP antibiyotiğine karşı dirençlidir ve üremeye devam etmiştir. Fakat normalde dirençli olan AMC antibiyotik diski üremesini durdurmuştur.

2. bakteri için EPI etkileri;

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi gözlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesine devam etmiş ve inhibitör etkisini göstermemiştir.

AMC + Verapamil, AMC + Tiyoridazin HCl ve AMC + PAβN kombinasyonunda ise üreme gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.5. Bakteri 3'ün inhibitör etkileri

Bakteri 3									EPI'ler
AMP	NOR	CIP	CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	SXT	EPI Yok
(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	
AMP	NOR	CIP	CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	SXT	Verapamil
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
AMP	NOR	CIP	CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	SXT	Tiyoridazin HCl
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
AMP	NOR	CIP	CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	SXT	PAβN
(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

3. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 3; AMP, CIP, CFM, CAZ, CRO, FEP ve SXT antibiyotiklerine karşı normalde dirençli olmasına rağmen üremesi durmuştur. NOR ve ATM antibiyotiğine karşı ise dirençli olup, üremeye devam etmiştir.

3.bakteri için EPI etkileri;

AMP + Verapamil, AMP + Tiyoridazin HCl ve AMP + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi gözlenmemiştir.

NOR + Verapamil ve NOR + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş ve inhibitör etkisini göstermiştir. NOR + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş, inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

CIP + Verapamil, CIP + Tiyoridazin HCl ve CIP + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

CFM + Verapamil, CFM + Tiyoridazin HCl ve CFM + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

CAZ + Verapamil, CAZ + Tiyoridazin HCl ve CAZ + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

CRO + Verapamil, CRO + Tiyoridazin HCl ve CRO + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

FEP + Verapamil ve FEP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur. FEP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiştir.

ATM + Verapamil ve ATM + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, üremenin olmadığı ve inhibitörün etkisinin gerçekleştiği görülmüştür. ATM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

SXT + Verapamil, SXT + Tiyoridazin HCl ve SXT + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

Tablo 4.6. Bakteri 4'de inhibitörün etkileri

Bakteri 4				EPI'ler
AMP (+)	AMC (-)	CIP (+)	NOR (+)	EPI Yok
AMP (-)	AMC (-)	CIP (-)	NOR (-)	Verapamil
AMP (-)	AMC (-)	CIP (-)	NOR (-)	Tiyoridazin HCl
AMP (-)	AMC (-)	CIP (+)	NOR (+)	PAβN

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

4. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 4; AMP, CIP ve NOR antibiyotiklerine karşı dirençliliğini korumuş olup, bakteri üremesi devam etmiştir. AMC antibiyotiğine karşı ise normalde dirençli iken duyarlılık göstermiş ve bakteri üremesi gözlemlenmemiştir.

4. bakteri için EPI etkileri;

AMP + Verapamil, AMP + Tiyoridazin HCl ve AMP + PAβN kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup inhibitör etkisini göstermiştir.

AMC + Verapamil, AMC + Tiyoridazin HCl ve AMC + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

CIP + Verapamil ve CIP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CIP + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

NOR + Verapamil ve NOR + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. NOR + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

Tablo 4.7. Bakteri 5 inhibitörün etkileri

Bakteri 5			EPI'ler
CIP (+)	NOR (+)	SXT (+)	EPI Yok
CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	Verapamil
CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	Tiyoridazin HCl
CIP (+)	NOR (+)	SXT (+)	PAβN

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

5. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 5; CIP, NOR ve SXT antibiyotiklerine karşı dirençli olup, üremeye devam etmiştir.

5. bakteri için EPI etkileri;

CIP + Verapamil ve CIP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup inhibitör etkisini göstermiştir. CIP + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

NOR + Verapamil ve NOR + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. NOR + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

SXT + Verapamil ve SXT + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. SXT + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

Tablo 4.8. *Bakteri 6'nın inhibitör etkileri*

Bakteri 6				EPI'ler
AMP (+)	CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	EPI Yok
AMP (-)	CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	Verapamil
AMP (-)	CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	Tiyoridazin HCl
AMP (+)	CIP (-)	NOR (-)	SXT (-)	PAβN

(+) : Üreme var
(-) : Üreme yok

6. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 6; AMP antibiyotiğine karşı dirençli olup, üremeye devam etmiştir. CIP, NOR ve SXT antibiyotiklerine karşı normalde duyarlı dirençli olmasına rağmen üreme gözlenmemiştir.

6. bakteri için EPI etkileri;

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

CIP + Verapamil, CIP + Tiyoridazin HCl ve CIP + PAβN kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiştir.

NOR + Verapamil, NOR + Tiyoridazin HCl ve NOR + PAβN kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiştir.

SXT + Verapamil, SXT + Tiyoridazin HCl ve SXT + PAβN kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.9. Bakteri 7'de inhibitör etkileri

Bakteri 7				EPI'ler
AMC	TZP	AMP	SXT	EPI Yok
(+)	(+)	(+)	(+)	
AMC	TZP	AMP	SXT	Verapamil
(-)	(-)	(-)	(-)	
AMC	TZP	AMP	SXT	Tiyoridazin HCl
(-)	(-)	(-)	(-)	
AMC	TZP	AMP	SXT	PAβN
(+)	(+)	(+)	(+)	

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

7. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 7; AMC, TZP, AMP ve SXT antibiyotiklerine karşı dirençliliğini korumuş ve bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

7. bakteri için EPI etkileri;

AMC + Verapamil ve AMC + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMC + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

TZP + Verapamil ve TZP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. TZP + PAβN

kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

SXT + Verapamil ve SXT + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üreme gözlemlenmemiş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. SXT + PAβN kombinasyonunda ise inhibitör etkisini gösterememiş ve bakteri üremeye devam etmiştir.

Tablo 4.10. Bakteri 8'de inhibitör etkileri

Bakteri 8										EPI'ler
CFM (+)	CAZ (+)	CRO (+)	FEP (-)	ATM (-)	AMP (+)	AMC (+)	TZP (-)	CIP (+)	SXT (+)	EPI Yok
CFM (-)	CAZ (-)	CRO (-)	FEP (-)	ATM (-)	AMP (-)	AMC (-)	TZP (-)	CIP (-)	SXT (-)	Verapamil
CFM (-)	CAZ (-)	CRO (-)	FEP (-)	ATM (-)	AMP (-)	AMC (-)	TZP (-)	CIP (-)	SXT (-)	Tiyoridazin HCl
CFM (-)	CAZ (-)	CRO (-)	FEP (-)	ATM (-)	AMP (+)	AMC (-)	TZP (-)	CIP (+)	SXT (+)	PAβN

(+) : Üreme var
(-) : Üreme yok

8. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 8; CFM, CAZ, CRO, AMP, AMC, CIP ve SXT antibiyotiklerine karşı direnç göstermiş ve bakteri üremesine devam etmiştir. FEP, ATM ve TZP antibiyotiklerine

karşı ise normalde dirençli olmasına rağmen duyarlılık göstermiş olup, bakteri üremesi durmuştur.

8. bakteri için EPI etkileri;

CFM + Verapamil, CFM + Tiyoridazin HCl ve CFM + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir.

CAZ + Verapamil, CAZ + Tiyoridazin HCl ve CAZ + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir.

CRO + Verapamil, CRO + Tiyoridazin HCl ve CRO + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir.

FEP + Verapamil, FEP + Tiyoridazin HCl ve FEP + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuştur.

ATM + Verapamil, ATM + Tiyoridazin HCl ve ATM + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuştur.

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup inhibitör etkisini gösterememiştir.

AMC + Verapamil, AMC + Tiyoridazin HCl ve AMC + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir.

TZP + Verapamil, TZP + Tiyoridazin HCl ve TZP + PAβN kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuştur.

CIP + Verapamil ve CIP + Tiyoridazin HCl kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CIP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisini gösterememiştir.

SXT + Verapamil ve SXT + Tiyoridazin HCl kombinasyonuna karşı bakteri üremesi durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. SXT + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisini gösterememiştir.

Tablo 4.11. Bakteri 9'da inhibitör etkileri

Bakteri 9										EPI'ler
CN (+)	CFM (+)	CAZ (+)	CRO (+)	FEP (+)	ATM (+)	AMP (+)	AMC (+)	CIP (+)	NOR (+)	EPI Yok
CN (-)	CFM (-)	CAZ (-)	CRO (-)	FEP (-)	ATM (-)	AMP (-)	AMC (-)	CIP (-)	NOR (-)	Verapamil
CN (-)	CFM (-)	CAZ (-)	CRO (+)	FEP (-)	ATM (+)	AMP (-)	AMC (-)	CIP (-)	NOR (-)	Tiyoridazin HCl
CN (+)	CFM (+)	CAZ (+)	CRO (+)	FEP (+)	ATM (+)	AMP (+)	AMC (-)	CIP (+)	NOR (+)	PAβN

(+): Üreme var

(-) : Üreme yok

9. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 9; CN, CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, AMP, AMC, CIP ve NOR antibiyotiklerinin hepsine karşı dirençlidir ve bakteri üremesine devam etmiştir.

9. bakteri için EPI etkileri;

CN + Verapamil ve CN + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CN + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

CFM + Verapamil ve CFM + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CFM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

CAZ + Verapamil ve CAZ + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CAZ + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

CRO + Verapamil ve üreme durmuş olup inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür. CRO + Tiyoridazin ve CRO + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

FEP + Verapamil ve FEP + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. FEP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

ATM + Verapamil ve üreme durmuş olup inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür. ATM + Tiyoridazin ve ATM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

AMC + Verapamil, AMC + Tiyoridazin ve AMC + PAβN kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir.

CIP + Verapamil ve CIP + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. CIP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

NOR + Verapamil ve NOR + Tiyoridazin kombinasyonunda üreme durmuş olup, inhibitör etkisini göstermiştir. NOR + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş ve inhibitörün etkisinin olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.12. Bakteri 10'da inhibitör etkileri

Bakteri 10								EPI'ler
CFM	CAZ	CRO	ATM	AMP	AMC	CIP	NOR	EPI Yok
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
CFM	CAZ	CRO	ATM	AMP	AMC	CIP	NOR	Verapamil
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
CFM	CAZ	CRO	ATM	AMP	AMC	CIP	NOR	Tiyoridazin HCl
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
CFM	CAZ	CRO	ATM	AMP	AMC	CIP	NOR	PAβN
(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	

(+): Üreme var

(-) : Üreme yok

10. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 10; CFM, CAZ, CRO, ATM, AMP ve AMC antibiyotiklerine karşı direnç göstermiş olup, bakteri üremesi devam etmiştir. CIP ve NOR antibiyotiklerine karşı ise normalde dirençli olmasına rağmen üremesi durmuştur.

10. bakteri için EPI etkileri;

CFM + Verapamil ve CFM + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkisi gözlemlenmiştir. CFM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesi devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

CAZ + Verapamil, CAZ + Tiyoridazin HCl ve CAZ + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir.

CRO + Verapamil ve CRO + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup inhibitörün etkisi gözlemlenmiştir. CRO + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesi devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

ATM + Verapamil ve ATM + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkisi gözlemlenmiştir. ATM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesi devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkisi gözlemlenmiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesi devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

AMC + Verapamil ve AMC + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkisi gözlemlenmiştir. AMC + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremesi devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlemlenmemiştir.

CIP + Verapamil, CIP + Tiyoridazin HCl ve CIP + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

NOR + Verapamil, NOR + Tiyoridazin HCl ve NOR + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

Tablo 4.13. Bakteri 11'in inhibitör etkileri

Bakteri 11		EPI'ler
ETP (-)	FEP (-)	EPI Yok
ETP (-)	FEP (-)	Verapamil
ETP (-)	FEP (-)	Tiyoridazin HCl
ETP (-)	FEP (-)	PAβN

(+) : Üreme var
(-) : Üreme yok

11. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

11. bakteri; ETP ve FEP antibiyotiklerine karşı normalde dirençli olmasına rağmen bakteri üremesi durmuştur.

11. bakteri için EPI etkileri;

ETP + Verapamil, ETP + Tiyoridazin HCl ve ETP + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

FEP + Verapamil, FEP + Tiyoridazin HCl ve FEP + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuştur.

Tablo 4.14. *Bakteri 12'nin inhibitör etkileri*

Bakteri 12							EPI'ler
CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	AMP	AMC	EPI Yok
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	AMP	AMC	Verapamil
(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	AMP	AMC	Tiyoridazin HCl
(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
CFM	CAZ	CRO	FEP	ATM	AMP	AMC	PAβN
(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	

(+) : Üreme var

(-) : Üreme yok

12. bakteri için EPI'siz antibiyotik etkisi;

Bakteri 12; CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, AMP ve AMC antibiyotiklerine karşı dirençli olup, bakteri üremeye devam etmiştir.

12. bakteri için EPI etkileri;

CFM + Verapamil, CFM + Tiyoridazin HCl ve CFM + PAβN kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir.

CAZ + Verapamil ve CAZ + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir. CAZ + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

CRO + Verapamil ve CRO + PAβN Kombinasyonunda bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlenmemiştir. CRO + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda ise bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir.

FEP + Verapamil ve FEP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir. FEP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

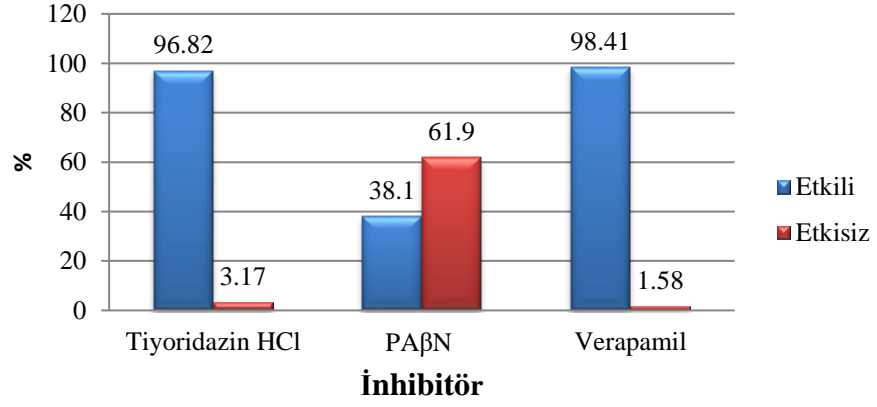
ATM + Verapamil ve ATM + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir. ATM + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

AMP + Verapamil ve AMP + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir. AMP + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

AMC + Verapamil ve AMC + Tiyoridazin HCl kombinasyonunda bakteri üremesi durmuş olup, inhibitörün etkili olduğu gözlemlenmiştir. AMC + PAβN kombinasyonunda ise bakteri üremeye devam etmiş olup, inhibitör etkisi gözlenmemiştir.

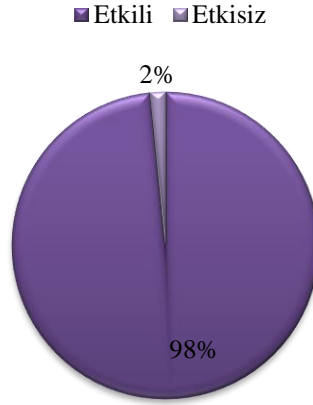
Tüm bu bulgulara göre; verapamil ve tiyoridazin inhibitörünün etkisi PAβN inhibitörüne göre daha etkili olduğu görülmüştür. Verapamil inhibitörü için etki %98,41; tiyoridazin HCl için %96,82 ve PAβN için ise %38,09 olarak gözlenmiş olup, yüzde grafikleri Grafik 4.1.'de, Grafik 4.2.'de, Grafik 4.3.'de ve Grafik 4.4.'de verilmiştir.

Verapamil, Tiyoridazin HCl ve PAβN İnhibitörleri Antibiyotik Kombinasyon Etki Sonuçları



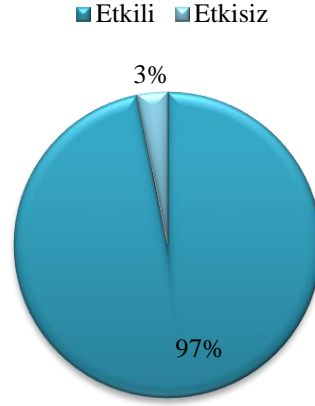
Grafik 4.1. Tüm inhibitörlerin antibiyotik kombinasyonu ile yüzde karşılaştırılması

Verapamil İnhibitörü-Antibiyotik Kombinasyon Etki Sonuçları



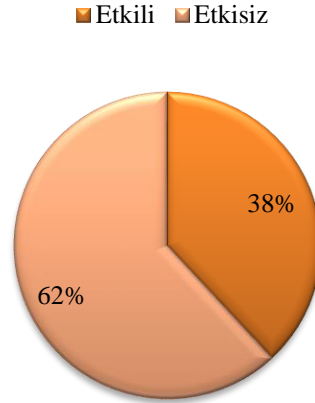
Grafik 4.2. Verapamil inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi

Tiyoridazin HCl İnhibitörü-Antibiyotik Kombinasyon Etki Sonuçları



Grafik 4.3. Tiyoridazin HCl inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi

PAβN İnhibitörü-Antibiyotik Kombinasyon Etki Sonuçları



Grafik 4.4. PAβN inhibitörünün antibiyotik kombinasyonu sonucu etki yüzdesi

5. TARTIŞMA

5.1. Efflux Pompalarının UV Altında Tespiti ve İnhibitör Etkileri

Yapılan bu araştırmada, klinik izole 11 adet farklı *E. coli* suşu kullanılmıştır. Bunların haricindeki 1 bakteri standart *E.coli* ATCC 25922 olup, kontrol suşu olarak cartwheel yönteminde 1 numaralı olarak pasajı yapılmıştır. 12 numaraya kadar olan her bir rakama ait farklı bir izolat pasajı yapılmış ve UV altında gözlemlenmiştir. Tüm bu verilere göre; Fotoğraf 4.1.'de görüntülenen efflux pompası tespitinde bazı numaralarda eksik kalan birtakım yerler gözlemlenmiştir. Ekim yapma aşamasında bu yerlerin ekilmediği, ancak bakteri üremesi sağlandıktan sonra ortaya çıkmış olup, pasajlama esnasında fark edilememiştir. Yapılan deney, iki paralel şekilde çalışıldığı için sonucu olumsuz bir şekilde etkilememiştir.

Farklı konsantrasyonlara sahip EtBr TSB Agara ekilen bakterilerin efflux pompasının aktifliği gözlemlendiğinde, her bakterinin aynı ölçüde floresans yapmadığı görülmüştür. Fotoğraflanan görüntülerde ilk bakışta bu durum hemen algılanamasa da, çıplak gözle dikkatli olarak incelendiğinde farkedilebilmektedir. Örneğin Fotoğraf 4.1.'de gösterilen resimde 3. petri 1,0 mg/L konsantrasyonunda EtBr içermekte olup, 5. numarasına ekilen izolatın efflux pompasının çalıştığı fakat aynı numaralı petrinin diğer numaralara ekilen bakterilerinin ise efflux pompasının çalışmayıp boyayı içeri hapsediği gözlemlenmiştir.

Deneyin UV altında EtBr varlığında efflux pompasının etkili olduğunu gözlemlenme aşamasından sonraki basamak olan MİK testi sonuçlarına göre; verapamil inhibitörü için MİK değeri 256 µg/mL değerinde olup, tiyridazin hidroklorür inhibitörü için 1. kuyucukta 64 µg/mL, diğer kuyucuklarda ise 128 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bileşenin sulu çözeltisi hazırlanırken toksisite problemi oluşturmaması açısından MİK değeri, en düşük değer olan, 64 µg/mL olarak ayarlanmıştır. PAβN inhibitörü içinde MİK değeri 64 µg/mL olarak baz alınmıştır. Hesaplanan MİK değerleri bir sonraki aşama olan inhibitör etkisinin gözlenmesi sırasında, inhibitör konsantrasyonu inhibitörlerin toksisiteye sebep olmaması için MİK/2 olarak ayarlanmıştır.

Deneyin son aşaması olan inhibitör etkisinin sonucunu gözlemlemek için Şekil 3.2.'de verildiği gibi antibiyotik diski + inhibitör + bakteri şeklinde yüklemeler yapılmış olup; verapamil, tiyoridazin HCl ve PAβN inhibitörlerinin, efflux pompasının inhibe ederek antibiyotiği hücre dışına atmadığı yorumu yapılabilmektedir.

Tablo 4.4'deki verilere göre; Bakteri 2'nin dirençli olduğu antibiyotikler AMP ve AMC'dir. AMP+bakteri kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup beklenen etki görülmüştür. AMP+inhibitör kombinasyonlarında ise; verapamil ve tiyoridazin, inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir. AMC+bakteri kombinasyonunda ise bakterinin ilaca karşı direnci söz konusu olduğu halde bakteri üremesini durdurmuştur. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski üzerinde yüklenmiş antibiyotik miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. AMP'nin inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır. Bu durumun tespiti için daha ileri denemeler yapılmalıdır.

Tablo 4.5.'deki verilere göre; Bakteri 3'ün dirençli olduğu antibiyotikler AMP, NOR, CIP, CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, SXT'dir. AMP+bakteri kombinasyonunda, bakteri ilaç direncine sahip olmasına rağmen, üremesi engellenmiştir. Bu etki de, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. AMP'nin inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır. NOR ve ATM antibiyotiklerinde, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteride üreme devam etmiş olup beklenen etki görülmüştür. İnhibitör ile olan kombinasyonlarında ise; verapamil ve tiyoridazin, inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir. CIP, CFM, CAZ, CRO, FEP ve SXT antibiyotiklerinin bakteri kombinasyonunda, bakterinin bu ilaçlara karşı direnci söz konusu olduğu halde bakteri üremesini durdurmuştur. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. İnhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi

antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır. FEP+inhibitör kombinasyonunda PAβN inhibitörü ise durdurucu etki göstermemiş olup, bakteri üremiştir. Bu etki de kullanılan inhibitör ile antibiyotik arasında ortaya çıkan antagonistik etki ile açıklanabilir.

Tablo 4.6.'daki verilere göre; Bakteri 4'ün dirençli olduğu antibiyotikler AMP, AMC, CIP ve NOR'dur. AMP, CIP ve NOR+bakteri kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup beklenen etki görülmüştür. AMP+inhibitör kombinasyonlarında ise; verapamil, tiyoridazin ve PAβN inhibitörü bakteri üremesini durdurmuş olup istenilen etkiyi göstermiştir. CIP ve NOR'un inhibitör kombinasyonlarında ise; verapamil ve tiyoridazin, inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir. AMC+bakteri kombinasyonunda; bakteri ilaç direncine sahip olmasına rağmen, üremeye devam etmiştir. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. AMC'nin inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır.

Tablo 4.7.'deki verilere göre; Bakteri 5'in dirençli olduğu antibiyotikler; CIP, NOR ve SXT'dir. Bu antibiyotiklerin bakteri kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, beklenen etki görülmüştür. CIP, NOR ve SXT'nin inhibitör kombinasyonlarında ise; verapamil ve tiyoridazin, inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir.

Tablo 4.8.'deki verilere göre; Bakteri 6'nın dirençli olduğu antibiyotikler; AMP, CIP, NOR ve SXT'dir. AMP+ bakteri kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, beklenen etki görülmüştür. AMP+inhibitör kombinasyonunda ise; verapamil ve tiyoridazin inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir. CIP ve NOR'un bakteri kombinasyonunda; bakteri ilaç direncine sahip olmasına rağmen, üremeye devam etmiştir. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. SXT+bakteri kombinasyonunda da, kullanılan antibiyotik miktarının, belirlenen MİK değerine göre az olmasına rağmen üreme olmamıştır. Bu

durumun sebebinin daha ileri çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir. CIP, NOR ve SXT'nin inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır.

Tablo 4.9.'daki verilere göre; Bakteri 7'nin dirençli olduğu antibiyotikler; AMC, TZP, AMP ve SXT'dir. Kullanılan antibiyotiklerin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup beklenen etki görülmüştür. Antibiyotiklerin inhibitör ile kombinasyonunda ise; verapamil ve tiyoridazin inhibe edici özellik göstermişken, PA β N inhibe edici özellik göstermemiştir.

Tablo 4.10.'daki verilere göre; Bakteri 8'in dirençli olduğu antibiyotikler; CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, AMP, AMC, TZP, CIP ve SXT'dir. CFM, CAZ, CRO ve AMC'nin antibiyotik ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, beklenen etki görülmüştür. CFM, CAZ, CRO ve AMC'nin inhibitör ile kombinasyonunda ise; verapamil, tiyoridazin ve PA β N inhibe edici özellik göstermiştir. AMP, CIP ve SXT antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiştir. AMP, CIP ve SXT'nin inhibitör ile kombinasyonunda ise; verapamil ve tiyoridazin inhibe edici özellik göstermişken, PA β N inhibe edici özellik göstermemiştir. FEP, ATM ve TZP antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direnci olmasına rağmen üreme durmuştur. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. FEP, ATM ve TZP'nin inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır.

Tablo 4.11.'deki verilere göre; Bakteri 9'un dirençli olduğu antibiyotikler; CN, CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, AMP, AMC, CIP ve NOR'dur. CN, CFM, CAZ, FEP, AMP, CIP ve NOR antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, beklenen etki görülmüştür. CN, CFM, CAZ, FEP, AMP, CIP ve NOR'un inhibitör ile

kombinasyonunda ise; verapamil ve tiyoridazin inhibe edici özellik göstermişken, PAβN inhibe edici özellik göstermemiştir. ATM+bakteri kombinasyonunda, bakteri üremeye devam etmiş olup, istenilen etki görülmüştür. ATM'nin verapamil ile kombinasyonun da inhibitör etkisi görülürken, tiyoridazin ve PAβN inhibitöründe durdurucu etki görülmemiş olup, bakteri üremesi devam etmiştir. AMC'nin bakteri ile kombinasyonunda, bakteri üremeye devam etmiş olup, istenilen etki görülmüştür. AMC'nin verapamil, tiyoridazin ve PAβN inhibitör ile olan kombinasyonunda inhibitör etkisi görülmüş olup, bakteri üremesi durmuştur.

Tablo 4.12.'deki verilere göre; Bakteri 10'un dirençli olduğu antibiyotikler; CFM, CAZ, CRO, ATM, AMP, AMC, CIP ve NOR'dur. CFM, CRO, ATM, AMP ve AMC antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda; ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, verapamil ve tiyoridazin inhibitörleri kombinasyonunda inhibe edici özellik görülmüşken, PAβN için inhibe edici özellik görülmemiştir. CAZ'ın bakteri ile kombinasyonunda; ilaç direncinden dolayı beklenen üreme görülmüştür. Verapamil, tiyoridazin ve PAβN inhibitörleri kombinasyonunda inhibe edici özellik gözlemlenmiştir. CIP ve NOR antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direnci olmasına rağmen üreme durmuştur. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. CIP ve NOR'un inhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır.

Tablo 4.13.'deki verilere göre; Bakteri 11'in dirençli olduğu antibiyotikler; ETP ve FEP'dir. Bu antibiyotiklerin bakteri ile kombinasyonunda, bakterinin ilaç direnci olmasına rağmen üreme durmuştur. Bu etki, kullanılan antibiyotik diski miktarının MİK sınırından fazla oluşu yönü ile açıklanabilir. İnhibitörler ile ilgili kombinasyonlarında ise üreme gözlemlenmemiş olup, üreme olmayışının sebebi antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı oluşu net bir biçimde yorumlanamamaktadır.

Tablo 4.14.'deki verilere göre; Bakteri 12'nin dirençli olduğu antibiyotikler; CFM, CAZ, CRO, FEP, ATM, AMP ve AMC'dir. CAZ, FEP, ATM, AMP ve AMC

antibiyotiklerinin bakteri ile kombinasyonunda; ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş olup, verapamil ve tiyoridazin inhibitörleri kombinasyonunda inhibe edici özellik görülmüşken, PAβN için inhibe edici özellik görülmemiştir. CFM antibiyotiğinin bakteri ile kombinasyonunda; ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş ve beklenen etki görülmüş olup; verapamil, tiyoridazin ve PAβN inhibitörleri kombinasyonunda inhibe edici özellik görülmüş ve bakteri üremesi durmuştur. CRO antibiyotiğinin bakteri ile kombinasyonunda; ilaç direncinden dolayı bakteri üremesi devam etmiş ve beklenen etki görülmüş olup, sadece tiyoridazin inhibitörü etki göstermiş ve üremesini durdurmuştur. Verapamil ve PAβN inhibitörleri kombinasyonunda ise inhibitörler etki göstermemiştir.

Elde edilen tüm bu verilere göre; inhibitör kullanılmadan sadece antibiyotik+bakteri kombinasyonu ile elde edilecek sonuçta beklenti, bakteri üremesinin devam ediyor olması yönündedir. Çünkü antibiyotik+bakteri kombinasyonları seçilirken özellikle bakterilerin direnç gösterdiği antibiyotikler göz önüne alınmıştır. Örneğin Bakteri 9; 19 antibiyotikten 10 antibiyotiğe karşı dirençlidir. Antibiyotik+bakteri kombinasyonunda üreme olmamasının sebebi, deney aşamasında kullanılan antibiyotik disklerinin dozajlarının, antibiyotik MİK değerlerinden fazla olmasından kaynaklanıyor olmasıdır. Bu ayarlamayı yapabilmek için antibiyotik diskleri ile değil, toz antibiyotikler ile çalışılarak doğru dozajlama yapılmalıdır. Antibiyotik ile bakteri kombinasyonunda üreme olmadığı bir durumda, bakterinin inhibitör+antibiyotik ile kombinasyonunda da üreme olmadığı takdirde, inhibitör etkisini yorumlamak oldukça zordur. Çünkü etkinin antibiyotikten mi yoksa inhibitörden mi kaynaklı olduğu net bir şekilde yorumlanamamaktadır. Eğer bakteri+antibiyotik kombinasyonunda üreme yoksa ve inhibitörler etki etmiş ise burada da antagonist etki söz konusu şeklinde yorum yapılabilir. Nitekim Bakteri 3'de FEP antibiyotiğinde bu durum söz konusudur. FEP antibiyotiği bakteri üremesini durdurmuştur. Verapamil ve tiyoridazin inhibitörlerinin kombinasyonunda (bu inhibitörlerin etki etmiş olduğu düşünülürse) bakteri üremesi gerçekleşmemiştir. Fakat, PAβN ile kombinesinde bakteri üremeye başlamış ve beklenenden farklı bir etki görülmüştür. Bu beklenmeyen etki, antagonist etki ile açıklanabilmektedir. Kullanılan iki kimyasal bileşen sonucu (antibiyotik+inhibitör) bu etki gerçekleşmiş

olabilmektedir. PAβN inhibitörü FEP antibiyotığının MİK değerini düşürmüş ve antibiyotiği dirençli olan bakteri de etkili hale getirmiştir.

Yapılan tez çalışmasına benzer bir çalışma literatürde bulunmadığı için, ancak bazı veriler kullanılarak aşağıda verilen tartışmalar yapılabilmektedir.

Özer'in (2013) yapmış olduğu çalışmasında kullanmış olduğu bakterilerden biri de *E. coli*'dir. Bisbenzimidin kimyasalını kullanarak florometrik ölçüm yapmış ve florans miktarına göre efflux pompasının bu maddeyi dışarı atıp atmadığını nicel veriler ile gözlemlemiştir. Bisbenzimidin + bakteri değerleri ile kuyucuklu plakalara inhibitörler eklemiş ve florans değerlerine göre efflux pompası etkisini yorumlamıştır. CCCP inhibitörünü 4 µL ve 10 µL olarak kullanmıştır. Bu inhibitörün *E. coli* üzerinde kuyucukların değerleri arasında oldukça manidar bir farklılık olduğunu tespit etmiştir ($P < 0,0001$). 10 µL CCCP inhibitörü eklenen kuyucuklarda bulunan verilerin, 4 µL eklenmiş olan kuyucuklara oranla daha düşük değere sahip olduğunu saptamıştır. *E. coli* bakterisinde PAβN inhibitörünün ise bisbenzimid maddesinin bakterinin hücre içinde kaldığını ve atılmayıp bakterinin nükleik asit yapısına bağlandığı sonucuna ulaşmış olup, 4 µL değeri *E. coli* için en yüksek miktar olarak belirlemiştir. Tiyoridazin inhibitörü de kullanmış olup, efflux pompasını aktive etmediği gözlemlemiştir.

Bu tez çalışmasında ise, yukarıda yapılan çalışmaya benzer bir şekilde, gram negatif bakterilerden olan *E. coli* suşları kullanılmıştır. Kimyasal madde olarak ise florasan özelliğe sahip EtBr kimyasalı kullanılmış olup, UV altındaki gözlemlere dayanılarak efflux pompası varlığının tespiti yapılmıştır. Kullanılan bakterilerin direnç göstermiş olduğu antibiyotikler ve inhibitörler kullanılmıştır. Kullanılan inhibitörler verapamil, PAβN ve tiyoridazin hidroklorür maddeleridir. Verapamil için kullanılan konsantrasyon 128 µg/mL olarak belirlenirken, tiyoridazin HCl ve PAβN inhibitörleri için bu değer 32 µg/mL'dir. Yukarıdaki çalışmada bisbenzimidin + inhibitör + bakteri kullanılmışken, bu tez çalışmasında antibiyotik diskleri + inhibitör + bakteri kullanılmıştır. Kullanılacak antibiyotik diskleri belirlenirken, suşları dirençli olduğu antibiyotiklere bakılmıştır. Kullanılan antibiyotikler, Sefiksım (CFM) (5µg), Seftazidim (CAZ) (10µg), Seftriakson (CRO) (30µg), Sefepim (FEP) (30µg),

Aztreonam (ATM) (30µg/mL), Ampisilin (AMP) (10µg), Amoksisilin-Klavulanat (AMC) (30µg), Siprofloksasin (CIP) (5µg), Norfloksasin (NOR) (10µg/mL) Piperasillin-Tazobaktam (TZP) (36µg) Gentamisin (CN) (10µg), Trimetoprim-Sülfametoksazole (SXT) (25µg) ve Ertapenem'dir (ETP) (10µg). Yukarıdaki çalışmaya benzer olarak kullanılan PAβN inhibitörü; yapılan bu tez çalışmasında da etki göstermiş olup, efflux pompasını inhibe ederek antibiyotiğin hücre dışına atılmasını engellemiştir. Böylece bakteri üremesi gerçekleşmemiştir.

PAβN inhibitörü; deney aşamasında kullanılan 11 adet MDR *E. coli* suşunda toplamda 63 adet farklı antibiyotik+inhibitör kombinasyonu kullanılmış ve bazılarında etki görülmüştür. 63 adet kombinasyonun (antibiyotik + inhibitör) 24 adetinde inhibitör etkisi (%38,10) gözlemlenirken, 39 adetinde inhibitör etkisi yoktur (%61,90). Yukarıdaki çalışmada tiyoridazin inhibitörünün efflux pompasına aktive etmediği gözlemlenirken, bu tez çalışmasında inhibe aktivitesi görülmüştür.

Tiyoridazin HCl inhibitörü için kullanılan konsantrasyon 32 µg/mL olarak belirlenmiş olup, 11 bakteri suşundan toplamda 63 adet farklı antibiyotik + inhibitör kombinasyonu kullanılmış ve bunlardan 61 kombinasyonda etki gözlemlenirken (%96,82), 2 tanesinde (Bakteri 9 suşu) (CRO + tiyoridazin HCl ve ATM + tiyoridazin HCl kombinasyonu) inhibitör etkisi gözlenmemiştir (%3,17).

Çetinkaya (2007) yapmış olduğu çalışmasında MDR'ye sahip G(-) ve G(+) bakteriler kullanmış olup, bu bakterilerde efflux pompası inhibitörlerin etkilerini araştırmıştır. Çalıştığı suşların Siprofloksasin'e karşı oldukça dirençli olduğunu belirtmiştir. G(-) bakteri türü olan *E. coli* bakterisi de kullandığı suşlar arasındadır ve çalışmada MİK değerlerine göre inhibitörler kullanmıştır. *E. coli* bakterisi için PAβN inhibitörünü kullanılmış, PAβN inhibitörünü konsantrasyonu 25 mg/L ve 100 mg/L olarak MİK verilerine göre ayarlamıştır. 25 mg/L PAβN inhibitörünü kullandığında suşlarının Siprofloksasin MİK'lerinin %42,2'sinde yaklaşık 4 kat ve üzeri, %30,9'unda ise 2 kat ve üzeri azalma olduğunu gözlemlerken, %26,9'unda ise bir azalma olmadığını belirtmiştir. 100 mg/L PAβN inhibitörü kullandığında ise; bakteri suşlarının MİK'lerinin %83,6'sında 4 kat ve üzeri, %13,4'ünde 2 kat azalma olduğu belirtilirken, %3'ünde ise bir azalma olmadığını gözlemiştir. Net bir şekilde ifade

edildiğinde, *E. coli* için kullanılan PAβN inhibitörünün varlığı sayesinde Siprofloksasin MİK değerlerinde bir azalma olduğu, azalan bu MİK değerlerinin efflux pompa inhibisyonu sonucu olduğunu düşünmektedir.

Bu tez çalışmasında ise, yukarıdaki çalışmaya benzer bir şekilde *E. coli* bakterisi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan dirençli suşlar arasında Siprofloksasin antibiyotigine karşı da direnç gösterenler bulunmaktadır. Yukarıdaki çalışmaya benzer bir şekilde kullanılan inhibitörlerden bir tanesi de PAβN'dir. Toplamda kullanılan 11 adet MDR *E. coli* suşlarından Siprofloksasin'e karşı dirençli olan bakteri sayısı 7 olup 6 tanesinin antibiyogram testine göre MİK değerleri > 1 (µg/mL) ile dirençli, diğer 1 tanesinin MİK değeri 0,5 (µg/mL) ile orta dirençlidir. Siprofloksasin + PAβN kombinasyonunda inhibitör etkisi bazılarında gözlenmiş olup; 7 bakteriden 3 adetinde etkili olurken (%42,85), 4 adetinde etki olmadığı (%57,14) gözlemlenmiştir. İki çalışma arasında etki yüzdeleri açısından fark bulunmasının sebebi, her iki çalışmada kullanılan *E. coli* suşlarının birbirinden farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çoban, Birinci, Ekinci ve Durupınar (2004) yapmış oldukları çalışmada, florokinolona karşı dirençli olan *E. coli* suşlarını kullanmışlardır. Kullanmış oldukları antibiyotik Siprofloksasin, inhibitörler ise verapamil, lansoprazol, PAβN (MC-207, 110) ve omeprazol'dür. Müeller-Hinton sıvı besiyerinde NCCLS standartlarına göre MİK değerlerini mikrodilüsyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Kullanmış oldukları inhibitörlerin miktarları; 20 µg/mL verapamil (Sigma), lansoprazol (İlsan, İltaş), PAβN (MC-207,110) (Sigma) ve omeprazol (Sigma) şeklindedir. Siprofloksasin'e karşı direnç MİK aralığını 16-512 µg/mL olarak hesaplamışlardır. 20 µg/mL omeprazol inhibitörü için Siprofloksasin'nin MİK değerinde değişiklik belirtmişlerdir. 20 µg/mL lansoprazol ve verapamil inhibitörleri için ise MİK değerlerinin iki bakteride 2 kat arttığını, 20 µg/mL PAβN için ise altı bakteride 2 kat ve iki bakteride de 4 kat azalmış olarak saptamışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmanın sonucunda kullanılan inhibitörlerin önemli bir etkisinin olmadığı kanısına varmışlardır.

Bu tez çalışmasında ise, yukarıdaki çalışmaya benzer bir şekilde çoklu ilaca dirençli *E. coli* bakterisi kullanılmıştır. Yine benzer bir şekilde, kullanılan inhibitörlerden verapamil ve PAβN inhibitörleri ortaktır. Bu tez çalışmasında toplamda 13 adet antibiyotik kullanılmış olup yukarıdaki çalışmaya benzer bir biçimde, Siprofloksasin antibiyotiği de kullanılmıştır (MİK > 1 µg/mL) ve verapamil için MİK değeri > 64 µg/mL, PAβN için ise 32 µg/mL'dir. Siprofloksasin + PAβN kombinasyonunda inhibitör etkisi gözlenmiş olup; 7 adet Siprofloksasin + PAβN kombinasyonundan, 3 adedinde etkili olurken (%42,86), 4 adedinde etki olmadığı (%57,14) gözlemlenmiştir. Siprofloksasin + Verapamil kombinasyonunda inhibitör etkisi gözlenmiş olup; 7 adet MDR suşunda kullanılan Siprofloksasin etkisinin tamamında inhibitör etkisi (%100) görülmüştür. Verapamil inhibitörünün, çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklerle kombinasyonu ise %98,41'dir, yani 63 adet kombinasyondan 62 tanesinde inhibitör etkisi gözlemlenmiştir. İki çalışma arasında etki yüzdeleri açısından fark bulunmasının sebebi, kullanılan *E. coli* suşlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tuncer (2016) yapmış olduğu çalışmasında izoniazid direncine sahip olan 50 adet *Mycobacterium tuberculosis* bakterisini kullanmıştır. Efflux pompasının varlığını göstermek için ise EtBr kimyasal boyasını kullanılmış, agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerini belirledikten sonra efflux pompasını inhibe etmek amaçlı rezepin, verapamil ve klorpromazin inhibitörlerini uygulamıştır. MİK değerlerinin ¼ oranında olacak şekilde plaklar hazırlayarak inhibitörler kullanılmıştır. *M. tuberculosis*'in izoniazid konsantrasyonunun en düşük MİK değerini 4 µg/mL, maksimum değerini ise >512 µg/mL olarak belirlemiştir. Klorpromazin MİK değeri için en düşük değer 2,5 µg/mL olup, maksimum değerini ise 40 µg/mL olarak saptamıştır. İzole edilenlerin 24 tanesinde ise klorpromazinin MİK değerini 10 µg/mL olarak belirlemiştir. Verapamilin MİK değer sonuçlarını ise minimum 62,5 µg/mL, maksimum 250 µg/mL olarak bulmuştur. *M. tuberculosis* bakterisinin 36'sında MİK değer sonucunu 125 µg/mL olarak saptamıştır. Klorpromazin inhibitörü ve izoniazid kombinesi ile oluşan izolatların 34'ünün MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşüşü, verapamil inhibitörü ile izoniazid kombinasyonu ile oluşan izolatların 18 tanesinin MİK değerlerinde ≥ 1 dilüsyon düşüş ve rezepin inhibitörü ile izoniazid kombinasyonu ile meydana gelen izolatların 18 adedinin MİK değerinde de ≥ 1

dilüsyon düşüşü meydana geldiğini saptamıştır. Genel olarak MİK değerleri sonuç olarak belirtildiğinde; MİK değerlerinin 4 µg/mL'den başlamış olup >512 µg/mL'ye kadar yükseldiğini saptamış ve %90 izolataın MİK değerinin sonucunu ise ≥ 16 µg/mL olarak belirlemiştir. Çalışmasında kullandığı 50 adet dirençli *M. tuberculosis*'in 38 tanesinde (%76) kullanılan inhibitörlerin herhangi birinin varlığında izoniazid MİK değerinde bir azalma olduğunu saptamıştır. MİK değerlerinde azalma gösteren 21 tane izole bakterinin, efflux pompası varlığını ortaya koymak için EtBr'yi kullanmıştır. 11 tane izolatta, inhibitör içeren ve içermeyenleri floresans yoğunluğuna göre gözlemleyerek, efflux pompası varlığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında ise, çoklu ilaca dirençli *E. coli* bakterisi ile birlikte EtBr kimyasal boyası, efflux pompası varlığını belirlemek amaçlı kullanılmıştır. MİK değeri için dilüsyon yöntemi uygulanmış ve belirlenen MİK değeri, yukarıdaki çalışmada ¼ oranında alınırken, bu tez çalışmasında ise Martins, Couto, Viviros ve Amaral (2010) kaynağına uygun olarak ½ olarak alınmıştır. Yukarıdaki çalışmaya benzer olarak verapamil inhibitörü kullanılmıştır ve MİK değeri > 128 µg/mL'dir. Bu tez çalışmasında kullanılan suşlar *M. tuberculosis* olmayıp, Gram negatif bakteri olan *E. coli* olduğu için sonuçlar farklılık gözlenmiş olması gayet normaldir. Yapılan çalışmanın sonucunda verapamil inhibitörünün kullanıldığı kombinasyonlardan sadece bir tanesinde (Bakteri 12 için CRO + verapamil kombinasyonu) etki gözlenmemişken, verapamil diğerlerin hepsinde (%98,41) efflux pompa inhibitörü olarak etkili olmuştur. Bakteri 12'de CRO + verapamil kombinasyonu için etkinin görülmemesinin sebebi, verapamil ile CRO antibiyotiği arasındaki antagonistik etkileşim ihtimali ile açıklanabilir. Ancak bu durumun ispat edilebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Martins ve arkadaşları, (2010) yapmış oldukları çalışmada; MDR olan klinik izolatlı bakterileri kullanmış ve EtBr'li agarda cartwheel yöntemi ile efflux pompalarının varlığını belirlemişlerdir. Dirençli *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları kullanılmıştır. Efflux pompalarının varlığını gözlemlemek üzere cartwheel yöntemiyle bakteri pasajını EtBr kimyasal boyasını içeren TSB agarları üzerine yapmışlardır. 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L ve 2,5 mg/L olacak

şekilde konsantrasyonlarını ayarlamışlardır. UV altında gözlemi yaptıktan sonra, 0,5 mg/L konsantrasyonda efflux pompasının tüm bakterilerde aktif olduğunu, 1,0 mg/L'de her bakterinin efflux pompasının çalışmadığını gözlemlemişlerdir. 1,5 mg/L, 2,0 mg/L, 2,5 mg/L olan konsantrasyonlarda EtBr kimyasalının fazla miktarda olmasından dolayı EtBr'nin dışarı atılamadığı için bakteri içinde kaldığını saptamışlardır. Pompa varlığını belirledikten sonra çalışmanın ikinci aşamasında, dirençli bakterilere karşı antibiyotik diskleri ve bazı inhibitörler kullanmışlardır. Kullanmış oldukları inhibitörler PAβN, CCCP, klorpromazin (CPZ) ve tioridazin'dir (TZ) (Sigma Aldrich). Yapılan çalışmada iki adet *E. coli* suşu için iki adet antibiyotik (tetrasiklin ve ofloksasin) kullanılmış olup, bu suşların her ikisinde de tetrasiklin ile birlikte kullanılan PAβN, inhibitör etkisi gösterirken; bu suşlardan sadece birinde tetrasiklin ile birlikte kullanılan tioridazin inhibitör olarak etki göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, yukarıdaki çalışmaya benzerlik olarak, dirençli *E. coli* suşları kullanılmıştır. EtBr varlığında (0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L, 2,5 mg/L) konsantrasyonlarda efflux pompaları UV altında belirlenmiştir. 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L konsantrasyonlarında efflux pompasının çalıştığı UV altında belli olmuştur. Yukarıdaki çalışmaya benzer olarak kullanılan inhibitörler tioridazin HCl ve PAβN'dir. Kullanılmış olan antibiyotikler ise farklılık göstermiştir. PAβN ve tioridazin ile antibiyotik kombinasyonunda inhibitör etkisi gözlenmiş olup, bu tez çalışmasında da uygulanmış olan PAβN ve tioridazin inhibitörlerinde aynı etki görülmüştür.

Dal (2009) yapmış olduğu çalışmasında, gram negatif bir bakteri türü olan *Acinetobacter baumannii*'yi kullanmıştır. Çoklu ilaç direncine sahip olan bu suşların AdeABC pompasının aktivitesini araştırmayı amaçlamıştır. *E. coli* bakterisinde bulunan AcrAB-TolC'un RND protein ailesine üye olan AdeABC pompa sisteminde etkin rol oynadığı için, sıvı mikrodilüsyon testinde *E. coli* ATCC 25922 bakterisini kontrol suşu olarak kullanmıştır. Kullanmış olduğu bu suşlar için eritromisin, gentamisin, siprofloksasin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim antibiyotiklerini, inhibitörler olarak ise NMP ve PAβN bileşenlerini kullanmıştır. MİK değerlerini belirlerken sıvı mikrodilüsyon yöntemini kullanmıştır. İzole edilen

suşların antibiyotiklerinin MİK değerleri 0,25 ile ≥ 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında değişkenlik gösterdiğini belirtmiştir. Grup I olarak çalıştığı bakterilerin antibiyotiklerinin MİK değerlerinde; PA β N'inde 0-2,66 kat yani ortalama 1,4 düşüş gözlemlenirken, NMP'ninde ise 1,66-6 kat yani ortalama 3,74 düşüş olduğunu belirtmiştir. Grup II olarak çalıştığı bakterinin %42,9'unda NMP ve PA β N inhibitör bileşenlerinin antibiyotik MİK değerlerinde herhangi bir etkisinin saptanmadığını belirtmiştir. NMP inhibitörünün PA β N inhibitörüne göre daha belirgin oranda düşüşe sebebiyet vermesi, pompa inhibitörünün RND tipi efflux pompasının inhibe edilmesinde daha etkili olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Yukarıdaki çalışmada gram negatif bakteri olan *Acinetobacter baumannii* suşu kullanırken, bu tez çalışmasında gram negatif bir bakteri olan çoklu ilaç direncine sahip *E. coli* suşları kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotiklere benzerlik olarak siprofloksasin ve gentamisin, inhibitör olarak ise PA β N'dir. PA β N için MİK değeri 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Siprofloksasin + PA β N kombinasyonunda %42,86 inhibitör etkisi görülürken, %57,14'ünde inhibitör etkisi görülmemiştir. Yani 7 adet bakteriden 3 tanesinde inhibitör etkisi mevcutken, 4 tanesinde bu etkinin olmadığı görülmüştür. İzole edilen 11 bakteriden sadece 1 adet bakteride Gentamisin antibiyotiğine karşı direnç bulunmaktadır. Gentamisin + PA β N kombinasyonunda ise inhibitör etkisi görülmemiştir. Sonuçlar arasındaki farklılık kullanılan bakteri suşlarından kaynaklanmaktadır.

Özkanca (2018) yapmış olduğu çalışmasında, direnç sorunu nedeni ile klinik kullanımında problem doğurduğu için tedavide kullanılmayan antibiyotiklerin, tekrar etkin hale getirilebilmeleri için farklı bitki türlerinden hazırlanmış olan ekstraktların direnç gelişimi müddetindeki etkilerinin belirlenmesini amaçlamıştır. *E. coli* ile *S. aureus* bakterilerini kullanıp, siprofloksasin ile meropenem antibiyotiğine karşı direnç gelişimlerini kontrol ederek; direncini yavaşlatma veya durdurma amacıyla değişik bitki metabolitlerinin etkilerini gözlemlemiştir. Özellikle yeşil çayda efflux pompa inhibisyonu ile ilgili oldukça pozitif bir sonuca ulaşılmıştır. Buna göre, yeşil çayın bakteri hücre duvarında yer alan PBP'lere bağlanabilme ve inhibe etme özelliği bulunmakla beraber, efflux pompalarını da inhibe edici özelliği bulunmakta ve dışa atımı engelleyebilmektedir. Sahip olduğu bu özelliklerden ötürü

siprofloksasin ve penisilin grubu antibiyotiklerin hücre içerisine alınmasını kolay hale getirdiği ileri sürülmüştür.

Bu tez çalışmasında ise; yukarıdaki çalışmaya benzer bir şekilde dirençli *E. coli* bakterileri kullanılmıştır. Çalışmaya benzer bir şekilde siprofloksasin antibiyotiği de kullanılmış olup, bakterilerin direncini inhibe etmek amaçlı bitkisel bileşenler değil, kimyasal bileşenler kullanılmıştır. Yukarıdaki çalışmada direnç mekanizması ayrımı yapılmamış olup, bu tez çalışmasında efflux pompası direnç mekanizmasına yönelik bir çalışma yürütülmüştür. Yukarıdaki çalışmaya benzerlik olarak Siprofloksasin antibiyotiğine karşı dirençli olan bakterileri inhibe etmek amaçlı kullanılan kimyasal bileşenler verapamil, tiyridazin HCl ve PAβN'dir. 11 adet bakteri suşundan 7 âdeti Siprofloksasine karşı dirençlidir. Tiyridazin HCl ve verapamil inhibitörleri bu bakterilerin CIP direncini %100 inhibe ederken, PAβN sadece %42,86'sında inhibisyon etkisi göstermiştir. Böylece, bu antibiyotiği kullanırken verapamil ve tiyridazin HCl inhibitörleri ile kombine edildiğinde efflux pompası kapanmakta ve bakteri, antibiyotiği dışarı atamamaktadır. Bu inhibitörlerin etkilerinin daha fazla olduğu yorumlanabilir iken, PAβN inhibitörü için bu etkinin biraz daha az olduğu söylenebilir.

6. SONUÇLAR

Günümüzde çok sık karşılaşılan problemlerden biri olan antibiyotik direnci, tedavi sürecini zorlaştırmakta ve iyileşme dönemini geciktirmektedir. Bakterilerin kendi doğal yapısında olan direnç mekanizması; bilinçsiz antibiyotik kullanımı gibi birtakım sebeplerden dolayı bakterilerin daha da dirençli konuma gelmesine sebebiyet vermektedir. Antibiyotik direncini inhibe etmek için pek çok çalışma yapılmaya devam etmektedir. Yapılan bu çalışmalardan biri de, bakterilerin direnç mekanizmalarından olan efflux pompa sistemlerinin inhibe edilebilmesidir.

Bu tez çalışmasında; bakterilerin sahip olduğu efflux pompalarının, bazı kimyasal bileşenler kullanarak inhibe edilebilmesi amaçlanmıştır. Antibiyotik direncine en fazla sahip olan bakteriler, gram negatif bakteriler olarak bilinmektedir ve bu çalışmada da çoklu ilaç direncine sahip 11 adet *E. coli* suşu kullanılmıştır.

Çalışma sonucuna göre; kullanılan verapamil, tioridazin HCl ve PAβN inhibitörleri, antibiyotik kombinasyonları ile birlikte kullanıldığında, bakterilerin efflux pompasını inhibe ettikleri gözlemlenmiştir. Verapamil ve tioridazin HCl inhibitörlerinin, PAβN inhibitörüne göre daha fazla etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Toplamda 63 adet antibiyotik+inhibitör kombinasyonu kullanılmış olup; verapamil için etki sonucu %98,41; tioridazin HCl için %96,82 ve PAβN için ise %38,09'dur.

7. ÖNERİLER

Bakterilerin doğal yapısında direnç mekanizmaları mevcut olup, bunlardan biri de efflux pompa sistemleridir ve efflux pompası sistemi için yeterli çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada, efflux pompa sistemlerinin inhibesini sağlamak amaçlı kimyasal bileşenler kullanılmıştır. Bu kullanılan kimyasal bileşenler, toksisite problemlerinden dolayı klinik kullanımları günümüzde yaygın değildir. İleriki çalışmalarda daha fazla bileşen örneği çalışmaları yapıp, özellikle bitkisel ekstraktlar kullanılarak çalışmalar yürütülüp, klinik kullanıma katkı sağlaması ve efflux pompası için daha fazla çalışmaların yapıp, pompa tipine göre inhibitörlerin keşfinin sağlanması gerekmektedir. Böylece, antibiyotik ile inhibitörlerin kombine kullanımları sonucu efflux pompaları inhibe edilmesi suretiyle antibiyotiklerin hücre dışına atılımı engellenmiş, dolayısıyla direnç geliştirilmiş antibiyotiklerin de mikroorganizmalara karşı tekrar kullanımı sağlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abongwa, M., Martin, R. J., & Robertson, A. P. (2017). A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta veterinaria*, 67(2), 137-152.
- Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., & Florey, H. W. (1941). Further observations on penicillin. *The Lancet*, 238(6155), 177-189.
- Aktuğlu Y. (1997). Giriş ve Genel Bilgiler. Y. Aktuğlu (Eds.), *Pratikte Antibiyotik Kullanımı* (pp. 11-53). İstanbul: Sempozyum Dizisi, Yayın No 1.
- Altuner, E. M. (2008). Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.
- Avşar, B. (2007). Görünür bölge güneş ışınlarının antibiyotik direnci geliştirmiş bakterilerde direnç devamlılığı üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.
- Aygül, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyolbul*, 49(2), 278-291.
- Bambeke, V. F., Balzi, E. & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*, 60(4), 457-470.
- Bambeke, V. F., & Lee, V. J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1(2), 157-175.
- Bay, D. C., Rommens, K. L., & Turner R. J. (2007). Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (2008), 1814–1838. Doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.015
- Bakos, É., Hegedüs, T., Holló, Z., Welker, E., Tusnády, G. E., Zaman, G. J., Flens, M. J., Váradi, A., & Sarkadi, B. (1996). Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12322-12326.
- Bauernfeind, A. (1997). Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 40(5), 639-651.

- Bhardwaj, A. K., & Mohanty, P. (2012). Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 7(1), 73-89.
- Bilgehan, H. (2000). Escherichia. H. Bilgehan (Eds.), *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları* (pp. 3-17). İzmir: Barış Yayınları.
- Biswas, A., Rao, G., Kondaiah, N., Anjaneyulu, A., Mendiratta, S., Prasad, R. & Malik, J. 2007. A simple multi-residue method for determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in export buffalo meat by HPLC-photodiode array detector. *J. Food Drug Anal.* 15, 278-284.
- Bohnert, J. A., & Kern, W. V. (2005). Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in Escherichia coli overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 849-852.
- Borges, M. I., McKeegan K.S., & Walmsley, A.R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J*, 376, 313–338.
- Brincat, J. P., Carosati, E., Sabatini, S., Manfroni, G., Fravolini, A., Raygada, J. L., & Cruciani, G. (2010). Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus. *Journal of medicinal chemistry*, 54(1), 354-365.
- Burns, J. L. (1995). Mechanisms of bacterial resistance. *Pediatric Clinics*, 42(3), 497-507.
- Chambers F. H. (2001). Antimicrobial Agents. L. S. Goodman & A. Gilman (Eds.), (pp. 1143-1169). *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*. USA: The McGraw-Hill Company.
- Cherak, S. J., Gugala, N., & Turner, R. J. (2016). *Membrane Transport*. (www.austinpublishinggroup.com/ebooks). Erişim tarihi: 20/06/2019
- Choi, Y. H., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Rahman, M. S., Choi, Y. S., Kim, C. S., & Yoo, J. C. (2017). A novel multifunctional peptide oligomer of bacitracin with possible bioindustrial and therapeutic applications from a Korean food-source *Bacillus* strain. *PloS one*, 12(5), e0176971.
- Chung, Y. J., & Saier, J. M. (2001). SMR-type multidrug resistance pumps. *Current opinion in drug discovery & development*, 4(2), 237-245.
- Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. *Science*, 257(5073), 1050-1055.
- Cohen, S. P., McMurry, L. M., & Levy, S. B. (1988). marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 170(12), 5416-5422.

- Core R Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> Erişim tarihi: 15/12/2017.
- Çağlar, K. (2005). Dezenfektanlara direnç gelişim mekanizmaları dezenfeksiyon işlemini ne kadar tehdit etmektedir? 4. *Ulusal sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi kitabı*, 702-714, Samsun.
- Çetinkaya, E. (2007). Çok ilaca dirençli gram negatif ve gram pozitif bakterilerin direnç inhibisyonuna efluks pompa inhibitörlerinin etkilerinin in vitro araştırılması. Uzmanlık Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Samsun.
- Çevikbaş, A. (1990). Antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi. *Antibiyotikler*, 164-174.
- Çiftçi, A., & Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Türkiye klinikleri j vet sci pharmacol toxicol special topics*, 1(2), 1-10.
- Çoban, A.Y, Birinci, A., Ekinci, B., & Durupınar, B. (2004). Yüksek düzey florokinolon dirençli E.coli klinik izolatlarında efluks pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 38: 21-25.
- Dal, T. (2009). *Acinetobacter baumannii*'nin klinik izolatlarının çoklu ilaç direncinde AdeABC aktif pompasının rolü. Uzmanlık Tezi, *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, İstanbul.
- Dal, T., Dal, M. S., & Ağır, İ. (2012). *Acinetobacter baumannii*'de antibiyotik direnci ve AdeABC aktif pompa sistemleri literatürün gözden geçirilmesi. *Van tıp dergisi*, 19(3), 137-148.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264(5157), 375-382.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 417-433.
- Deng, D., Sun, P., Yan, C., Ke, M., Jiang, X., Xiong, L., Ren, W., Hirata, K., Yamamoto, M., Fan, S. & Yan, N. (2015). Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature*, 526(7573), 391.
- Denis, O., Rodriguez-Villalobos, H., & Struelens, M. J. (2011). The problem of resistance (pp. 24-48). *Antibiotic and Chemotherapy*, 9.
- Durupınar, B. (2001). Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik dergisi*, 14(2), 47-56.
- Ehrlich, P. (1907). Chemotherapeutische trypanosomen-studien. *Berl Klin Wochenschr*, 44, 233-6, 280-3, 310-4, 341-4.

- Eliopoulos, G. M. (1992). Infectious Diseases. S. L. Gorbach, J. G Bartlett & N. Blacklow (Eds.), *Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs* (pp. 280-286). WB Saunders Co: Philadelphia.
- Elkins, C. A., & Nikaido, H. (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of Escherichia coli is determined predominately by two large periplasmic loops. *Journal of bacteriology*, *184*(23), 6490-6498.
- Elkins, C. A., & Nikaido, H. (2003). 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of Escherichia coli likely captures substrates from periplasm. *Drug resistance updates*, *6*(1), 9-13.
- Fraimow, H. S., & Abrutyn, E. (1995). Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious disease clinics of North America*, *9*(3), 497-530.
- Fujihira, E., Tamura, N., & Yamaguchi, A. (2002). Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in Escherichia coli. *The Journal of Biochemistry*, *131*(1), 145-151.
- Gadhe, C. G., & Cho, S. J. (2013). Investigation of Binding Modes of the Verapamil and Curcumin into Human P-glycoprotein (P-gp). *Journal of the Chosun Natural Science*, *6*(4), 205-210.
- Georges, E., Tsuruo, T., & Ling, V. (1993). Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(3), 1792-1798.
- Gill, M. J., Brenwald, N. P., & Wise, R. (1999). Identification of an Efflux Pump Gene, pmrA, Associated with Fluoroquinolone Resistance in Streptococcus pneumoniae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *43*(1), 187-189.
- Gold, H. S., & Moellering Jr, R. C. (1996). Antimicrobial-drug resistance. *New England journal of medicine*, *335*(19), 1445-1453.
- Gökçe, T. (2017). Birinci basamak sağlık kuruluşuna başvuran hastaların antibiyotik kullanımı konusundaki davranış ve bilgi düzeylerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Denizli.
- Gülay, Z. (2001). Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, (5), 210-229.
- Haas, W., Sanfilippo, C. M., Hesje, C. K., & Morris, T. W. (2013). Contribution of the R8 substituent to the in vitro antibacterial potency of besifloxacin and comparator ophthalmic fluoroquinolones. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, *7*, 821.

- Hasdemir, U. (2007). The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. *Mikrobiyoloji bulteni*, 41(2), 309-327.
- Jack, D. L., Yang, N. M., & H. Saier Jr, M. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 268(13), 3620-3639.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (1995). *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (pp. 137-167) Appleton & Lange.
- Jiang, L., Watkins, D., Jin, Y., Gong, C., King, A., Washington, A. Z., Green, K. D., Tsodikova, S. G., Oyelere A. K. & Arya, D. P. (2015). Rapid synthesis, RNA binding, and antibacterial screening of a peptidic-aminosugar (PA) library. *ACS chemical biology*, 10(5), 1278-1289.
- Joklik, W. K., Willett H. P. & Amos D. B. (1992). *Zinsser microbiology*. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange.
- Jumaa, S. & Karaman R. (2015). Antibiotics. R. Karaman (eds.) *Commonly Used Drugs*. (pp. 41-69). Nova Science Publishers.
- Kaatz, G. W. & Seo, S. M. (1995). Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(12), 2650-2655.
- Kara, Z. P., Öztürk, N., Öztürk, D., & Okyar. A. (2013). ABC taşıyıcı proteinleri: sirkadiyan ritimler ve cinsiyete bağlı farklılıklar. *MÜSBED*, 3(1), 1-13. doi:10.5455/musbed.20130306115105.
- Karn, A. K., Sharon, M., Kumar, R., & Sharon, M. (2014). Naphthyl Iso-quinoline alkaloids Extracted from Stem of *Ancistrocladus heyneanus* Exhibits Bactericidal Activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 1699-1707.
- Kim, W. K., Karabasil, N., Bulajic, S., Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Poole, T. L., Ricke, S. C., Anderson, R. C. & Nisbet, D. J. (2005). Comparison of spontaneous antibiotic resistance frequency of *Salmonella Typhimurium* growth in glucose amended continuous culture at slow and fast dilution rates. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 40(3), 475-484.
- Kolaczowski, M., & Goffeau, A. (1997). Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacology & therapeutics*, 76(1-3), 219-242.
- Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 763-768.

- Kwiatkowska, B., Maslinska, M., Przygodzka, M., Dmowska-Chalaba, J., Dabrowska, J., & Sikorska-Siudek, K. (2013). Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(04), 91.
- Levy, S. B. (1992). *The Antibiotic Paradox. How Miracle Drugs Are Destroying the Miracle?* New York-London: Plenum Press,.
- Levy, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology*, 92, 65S-71S.
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995). Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9), 1948-1953.
- Li, X. Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 69(12), 1555-1623.
- Lin, J., Michel, L. O. & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), 2124-2131.
- Loannou, Y. A. (2001). Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 657–668.
- Lomovskaya, O., & Bostian, K. A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. *Biochemical pharmacology*, 71(7), 910-918.
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M. A. Y., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., & Lee V. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 105-116.
- Loo, T. W., & Clarke, D. M. (2001). Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14972-14979.
- Lovering, A. L., Gretes, M. C., Safadi, S. S., Danel, F., De Castro, L., Page, M. G., & Strynadka, N. C. (2012). Structural insights into the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of ceftobiprole. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 32096-32102.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2010). *Brock mikroorganizmaların biyolojisi* C. Çökmüş (Eds.). Ankara: Palme.

- Maestro, B., Novaková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J. M. & Branny, P. (2011). Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS letters*, 585(2), 357-363.
- Mao, W., Warren, M. S., Black, D. S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N., & Lomovskaya, O. (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Molecular microbiology*, 46(3), 889-901.
- Markham, P. N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M. E., & Neyfakh, A. A. (1999). Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(10), 2404-2408.
- Martins, M., Couto, I., Viveiros, M., & Amaral, L. (2010). Identification of efflux-mediated multi-drug resistance in bacterial clinical isolates by two simple methods. In *Antibiotic resistance protocols* (pp. 143-157). Humana Press.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., & Nishino, T. (1999). Interplay between Chromosomal β -Lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 400-402.
- Mayer, K. H., Opal, S. M., & Medeiros, A.A. (1995). Mechanisms of antibiotic resistance. G. L. Mandell., J. E. Bennett & R. Dollin (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 212-225). New York: Churchill Livingstone.
- McDermott, W., & Rogers, D. E. (1982). Social ramifications of control of microbial disease. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 151(6), 302.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., & Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 77(7), 3974-3977.
- Mehlhorn, A., Rahimi, P., & Joseph, Y. (2018). Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: a review. *Biosensors*, 8(2), 54.
- Mohd-Setapar, S. H., Mat, H., & Mohamad-Aziz, S. N. (2012). Kinetic study of antibiotic by reverse micelle extraction technique. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(5), 685-695.
- Mullin, S., Mani, N., & Grossman, T. H. (2004). Inhibition of antibiotic efflux in bacteria by the novel multidrug resistance inhibitors biricodar (VX-710) and timcodar (VX-853). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(11), 4171-4176.

- Muppidi, K., Pumerantz, A. S., Wang, J., & Betageri, G. (2012). Development and stability studies of novel liposomal vancomycin formulations. *ISRN pharmaceuticals*, 2012.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419(6907), 587-593.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382-388.
- Nikaido, H. (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases*, 27(Supplement_1), S32-S41.
- Nikaido, H. (2000a). Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clinical microbiology and infection*, 6, 22-26.
- Nikaido, H. (2000b). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cellular and developmental biology* 12(3), 215-33.
- Nys, M., Wijckmans, E., Farinha, A., Yoluk, Ö., Andersson, M., Brams, M., Spurny, R., Peigneur, S., Tytgat, J., Lindahl, E. & Ulens, C. (2016). Allosteric binding site in a Cys-loop receptor ligand-binding domain unveiled in the crystal structure of ELIC in complex with chlorpromazine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), E6696-E6703.
- Onken, D. (1985). *Antibiotika: chemie und Anwendung*. Akademie Verlag.
- Opperman, T. J., & Nguyen, S. T. (2015). Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Frontiers in microbiology*, 6, 421.
- Oryaşın, E. (2012). *ermTR* geninin eritromisine hassas *Streptococcus pyogenes* NZ131 ve *Staphylococcus aureus* RN4220 suşlarındaki etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aydın.
- Özer, C. (2013). Bakterilerde dışa atım pompası yolu ile antimikrobiyal direnç gelişimini saptamada mikrodilüsyon yöntemi ve bisbenzimidin kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.
- Özkanca, C. (2018). *Staphylococcus Aureus* ve *Escherichia Coli* Bakterilerinde Kademeli Olarak Oluşturulan Antibiyotik Direncinin Bitkisel Maddeler İle Engellenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.

- Pagès, J. M., & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826-833.
- Pagès, J. M., Masi, M., & Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in molecular medicine*, 11(8), 382-389.
- Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier Jr, M. H., Turner, R. J., Weiner, J. H., Goldberg E.B., & Grinius, L. L. (1996). The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular microbiology*, 19(6), 1167-1175.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 60(4), 575-608.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., & Saier Jr, M. H. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *Journal of molecular biology*, 277(3), 573-592.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A., & Saier, M. H. (1998). Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 430(1-2), 116-125.
- Pawar, S. K., Punith, R., Naik, R. S., & Seetharamappa, J. (2017). Spectroscopic and molecular modeling approaches to investigate the binding of proton pump inhibitors to human serum albumin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(15), 3205-3220.
- Perović, I., Malenović, A., Vemić, A., Kostić, N., & Ivanović, D. (2014). Razvoj hromatografskih metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa u sirupu. *Arhiv za farmaciju*, 64(2), 112-127.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrugresistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 382-402. doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- Ribera, A., Ruiz, J., Jimenez de Anta, M. T., & Vila, J. (2002). Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 697-698.
- Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), 2233-2241.

- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.
- Porto, C. E. D., Maia, P. P., Freitas, D. F. D., Araújo, R. C. C., Siqueira, M. E. P. B. D., Martins, I., & Santos-Neto, Á. J. D. (2012). Liquid-phase microextraction for simultaneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. *Química Nova*, 35(1), 72-76.
- Pumbwe, L., & Piddock, L. J. (2002). Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 185-189.
- Rineh, A., Dolla, N. K., Ball, A. R., Magana, M., Bremner, J. B., Hamblin, M. R., Tegos, G. P. & Kelso, M. J. (2017). Attaching the NorA efflux pump inhibitor INF55 to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *ACS infectious diseases*, 3(10), 756-766.
- Saier Jr, M. H., & Paulsen, I. T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 12, No. 3, pp. 205-213). Academic Press.
- Saier Jr, M. H., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., Jack, D. L., Jähn, P. S., Lew K., Liu, J., Pao, S. S., Paulsen I. T., Tseng T. T., & Virk P. S. (1999). The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1(2), 257-279.
- Santos, L., & Ramos, F. (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in food science & technology*, 52, 16-30.
- Schuldiner, S., Granot, D., Mordoch, S. S., Ninio, S., Rotem, D., Soskin, M., Tate, C. G., & Yerushalmi, H. (2001). Small is mighty: EmrE, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *Physiology*, 16(3), 130-134.
- Schweizer, H. P. (2012). Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 7(7), 633-642.
- Sickert, K. B., Stone, T. A., Poulsen, B. E., & Deber, C. M. (2015). Efflux by small multidrug resistance proteins is inhibited by membrane interactive helix stapled peptides. *The journal of biological chemistry*, 290(3), 1752-1759.
- Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223-229.
- Stavri, M., Piddock, L. J., & Gibbons, S. (2006). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(6), 1247-1260.

- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.
- Tamura, N., Konishi, S., Iwaki, S., Kimura-Someya, T., Nada, S., & Yamaguchi, A. (2001). Complete cysteine-scanning mutagenesis and site-directed chemical modification of the Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20330-20339.
- Taşdemir, C. (2009). Toplum Ve Hastane Kaynaklı İnfeksiyonlardan İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Fenotiplerinin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi*. İstanbul.
- Tegos, P. G., Haynes, M., Strouse, J. J., Khan, Md. T. M., Bologa, G. C., Oprea, I. T., & Sklar, A. L. (2011). Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Current pharmaceutical design*, 17(13), 1291-1302.
- Tenover, F. C., & Hughes, J. M. (1996). The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *Jama*, 275(4), 300-304.
- TEPAV. (2017). *Türkiye’de antimikrobiyal direnç ekonomik değerlendirme ve öneriler*. https://www.tepav.org.tr/upload/files/1504774735-1.Turkiye___de_Antimikrobiyal_Direnc___Ekonomik_Degerlendirme_ve_Oneriler.pdf, Erişim Tarihi: 10/06/2019.
- Tortora, G. J. & Derrickson, B. (2012). Transport across the plasma membrane. USA: John Wiley & Sons.
- Töreci, K. (2002). Escherichia türleri. W.A. Topçu, G., Söyletir., M. Doğanay (Eds.) *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (pp. 1564-1574) 2, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Töreci, K. (2003). Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. *Flora*, 8(2), 89-110.
- Tuncer, Ö. (2016). *Mycobacterium Tuberculosis* Kompleks Klinik İzolatlarında İzoniazid Direncine Neden Olan Dışa Atım Pompalarının Saptanması. Uzmanlık Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*. İstanbul.
- Tunçtan B, Buharalıoğlu K. (2005). Farmakoloji Terimleri Sözlüğü. *Sendrom III Tıp Terimleri Sözlüğü*, 3(2): 3-44.
- Ughachukwu, P. O., & Unekwe, P. C. (2012). Efflux Pump. Mediated Resistance in Chemotherapy. *Annals of medical and health sciences research*, 2(2), 191-198.

- URL-1. Antibiyotiklere dirençlilik mekanizması, 09/10/2018 tarihinde <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF0B58620D24E3B60E> adresinden alınmıştır.
- Vanderbroucke-Grauls, C. M. (1993). The threat of multiresistant microorganisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12(Suppl 1), 27-30.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzler, M. E. (2009). *Nematoda-Essentials of Glycobiology*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Walsh, D. M., Shah, S. H., Simpson, M. A., Morgan, N. V., Khaliq, S., Trembath, R. C., Mehdi, S. Q. & Maher, E. R. (2012). A novel ABCA12 mutation in two families with congenital ichthyosis. *Scientifica*, 2012. doi: 10.6064/2012/649090.
- Watkins, D., Jiang, L., Nahar, S., Maiti, S., & Arya, D. P. (2015). A pH sensitive high-throughput assay for miRNA binding of a peptide-aminoglycoside (PA) library. *PLoS one*, 10(12), e0144251.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11..
- Webber, M. A., & Coldham, N. G. (2010). Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. S. H. Gillespie, T. D. McHugh TD (Eds.), *Antibiotic resistance protocols* (pp. 173-180). New York: Humana Press. Springer Publishing.
- Yang, X., Domalaon, R., Lyu, Y., Zhanel, G., & Schweizer, F. (2018). Tobramycin-linked efflux pump inhibitor conjugates synergize fluoroquinolones, rifampicin and fosfomycin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical medicine*, 7(7), 158.
- Yapar, N., & Erdenizmenli, M. (2002). Antimikrobiyal ilaçlara direnç. *Antimikrobiyal ajanlar ve klinik kullanımları* (pp.11-12). 1, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., & Schuldiner, S. (1995). EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6856-6863.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., & Schuldiner, S. (1996). Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31044-31048.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik dergisi*, 14(2), 41-46.

Zarakolu, P. (2003). Mikroorganizmalarda direnç mekanizması olarak aktif pompa sistemleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 131-36.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eda ALTINÖZ
Doğum Yeri ve Yılı : Kastamonu, 1989
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : altinozedaa@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Kastamonu Aytaç Eruz Anadolu Lisesi
Lisans : İstanbul Fatih Üniversitesi
Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Organik Laboratuvar Malzemeleri, İstanbul 2015

Yayınları

Altinoz, E., & Altuner, E. M. (2019). Antibiotic Resistance and Efflux Pumps, *2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) (28-29 June 2019)*, p.157, Ankara, Turkey.

Altinoz, E., & Altuner, E. M. (2019). Antibiotic Resistance and Efflux Pumps, *2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) (28-29 June 2019)*, p.157, Ankara, Turkey. Tam Metin (İncelemede).