ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK *PSEUDOMONAS AERUGİNOSA*'YA KARŞI BAZI ANTİBİYOTİKLERİN IN SILICO VE IN VITRO ÇALIŞMASI

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE tarafından hazırlanan **"Klinik *Pseudomonas aeruginosa*'ya Karşı Bazı Antibiyotiklerin In Silico ve In Vitro Çalışması"** adlı tez çalışması 01/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi. Filiz SARIKAYA PEKACAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Abdalkader Saaed LATIF

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. İsim SOYİSİM
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. İsim SOYİSİM
Biyoloji Anabilim Dalı
Yıldız Teknik Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsim SOYİSİM
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Klinik *Pseudomonas aeruginosa*'ya Karşı Bazı Antibiyotiklerin In Silico ve In Vitro Çalışması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (01/07/2022).

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KLİNİK *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'YA KARŞI BAZI ANTİBİYOTİKLERİN IN SILICO VE IN VITRO ÇALIŞMASI

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Abdalkader Saaed LATIF

Bu çalışmada çeşitli enfeksiyonlara yakalanmış 100 hastadan izole edilen örneklerin, VITEK BioMerieux dahil olmak üzere biyokimyasal ve kültürel testler sonrasında 89'unda *Pseudomonas aeruginosa* tanımlanmıştır. Buna ek olarak *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel ajanlar olarak ticari antibiyotikler ele alınmıştır. Antibiyotiklerin tasarımı ve taslağı Silico'da hesaplama metodolojileri ile gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın DNA topoizomeraz enziminin 3 boyutlu (3D) yapı modeli, homoloji modelleme yöntemi ile hedef protein olarak oluşturulmuştur ve aktif bölge görselleştirilmiştir. Hedef proteinin aktif bölgesinin tüm 3D bilgilerinden beş antibiyotiği incelemek (siprofloksasin, seftazidim, gentamisin, amikasin ve penisilin) için yararlanılmıştır. Buna göre, siprofloksasin molekülünün hedef proteinin aktif bölgesi ile en yüksek bağlanma puanına (-53,1 kcal/mol) sahip olduğunu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra seftazidim bağlanma puanı -32,5 kcal/mol, gentamisinin bağlanma puanı -7,7 kcal/mol, Amikasin bağlanma puanı ise. -1,3 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu arada penisilin molekülü, hedef protein ile en düşük bağlanma skorunu 71,2 kcal/mol gösterilmiştir. Beş antibiyotikten sadece ikisi (siprofloksasin, seftazidim) 16 µg/mL konsantrasyonda en yüksek antibakteriyel aktivite seviyesini gösterirken, gentamisin ve amikasin 32 µg/mL konsantrasyonda orta derecede aktivite göstermiştir. Bileşik penisilin, klinik *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı hiçbir antibakteriyel aktivite göstermemiştir.

2022, 70 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa,* In vitro, In silico, Topoizomeraz enzimi, Kinolon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IN SILICO AND IN VITRO STUDY OF SOME ANTIBIOTICS AGAINST CLINICAL *PSEUDOMONAS ARRUGINOSA*

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Abdalkader Saaed LATIF

In this study, *Pseudomonas aeruginosa* was identified in 89 of the samples isolated from 100 patients with various infections, after biochemical and cultural tests, including VITEK BioMerieux. In addition, commercial antibiotics have been discussed as antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. The design and drafting of antibiotics was carried out in Silico with computational methodologies. The 3D (3D) structural model of the DNA topoisomerase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* was created as the target protein by homology modeling method and the active site was visualized. All 3D information of the active site of the target protein was used to examine five antibiotics (ciprofloxacin, ceftazidime, gentamicin, amikacin, and penicillin). Accordingly, it was determined that the ciprofloxacin molecule had the highest binding score (-53.1 kcal/mol) with the active site of the target protein. In addition, the ceftazidime binding score is-32.5 kcal/mol, the gentamicin binding score is -7.7 kcal/mol, and the Amikacin binding score is. It was found as -1.3 kcal/mol. Meanwhile, the penicillin molecule showed the lowest binding score with the target protein of 71.2 kcal/mol. Only two of the five antibiotics (ciprofloxacin, ceftazidime) showed the highest level of antibacterial activity at a concentration of 16 µg/mL, while gentamicin and amikacin showed moderate activity at a concentration of 32 µg/mL. The compound penicillin showed no antibacterial activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa.*

2022, 70 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa,* In vitro, In silico Topoisomerase enzyme, Quinolone

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımdaki tüm zorluklara benimle göğüs geren, hayatımın her aşamasında bana destek olan, yakın ilgi ve önerileriyle her aşamada bana rehberlik eden en değerlilerim canım aileme teşekkür ederim.

Çalışmalarımda her türlü yardımdan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen, büyük bir anlayış gösteren ve bana yol gösteren değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR'a ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Abdalkader Saaed LATIF'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

Çankırı, Temmuz 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1 GİRİŞ **1**
2 LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 In Silico Çalışmalar **3**
2.1.1 İlaç keşfi **3**
2.1.2 In silico ilaç tasarımı **4**
2.1.3 Bilgisayar destekli ilaç tasarımı kategorisi **4**
2.2 Bakteriyel Çalışma **7**
2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* **7**
2.2.2 Antibiyotikler **26**
3 MATERYAL VE METOT **30**
3.1 Materyal **30**
3.1.1 Örnek toplama **30**
3.1.2 Malzemeler **30**
3.1.3 Kimyasallar **31**
3.1.4 Ortamlar **31**
3.1.5 Bakteri tanımlaması için kimyasallar ve çözeltiler **32**
3.2 Yöntemler **33**
3.2.1 Hesaplamalı çalışmalar **33**
4 BULGULAR VE TARTIŞMA **40**
4.1 In Siliko Çalışması **40**
4.1.1 Hedef hazırlama **40**
4.1.2 Molekül tasarımı **43**

4.1.3 Moleküler yerleştirme 44
4.2 Bakteriyel Çalışma 47
4.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve tanımlanması 47
KAYNAKLAR 56
EKLER 65
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı eksi
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O_2	Tekli oksijen
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	Açil homoserin lakton
CADD	Bilgisayar destekli ilaç tasarımı
DNA	Deoksiribonükleik asit
HTS	Yüksek verimli tarama
İYE	İdrar yolu enfeksiyonları
LBDD	Ligand tabanlı ilaç tasarımı
LPS	Lipopolisakkarit
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
PG	Peptidoglikan
SBDD	Yapı tabanlı ilaç tasarımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Yapıya dayalı ilaç tasarımı ligand (koyu yeşil), protein reseptörünün (kırmızı) ortosterik cebine (yeşil bulut) yerleştirilmesi (Wasko *et al.* 2015) 5
Şekil 2.2 Liganda dayalı ilaç tasarımı 6
Şekil 2.3 *Pseudomonas aeruginosa* fluorescens gram boyaması (Udaondo *et al.* 2018) 12
Şekil 2.4 Bakteriyel lipopolisakkaritlerin genel yapısı (Ohno and Morrison 1989) 16
Şekil 2.5 *Pseudomonas aeruginosa* genomunun dairesel şekli (Stover *et al.* 2000) 21
Şekil 2.6 DNA kapısının açılmasını gösteren Top II klevaj kompleksinin yapısı (Wu *et al.* 2011) 24
Şekil 2.7 Ciprofloksasinin kimyasal yapısı (Dong *et al.* 2014) 26
Şekil 3.1 0,5 McFarland standartları 38
Şekil 4.1 DNA giraz alt birimi A protein modellemesi Swiss-Model sunucu 41
Şekil 4.2 Güvenilir topoizomeraz alt birim A modeli için toplam Z-skoru 42
Şekil 4.3 Protein modelinin istatistiksel potansiyelleri Z-skoru 42
Şekil 4.4 Siprofloksasin'in moleküler yerleştirilmesi 45
Şekil 4.5 Seftazidim'in moleküler yerleştirilmesi 45
Şekil 4.6 Gentamisin'in moleküler yerleştirilmesi 45
Şekil 4.7 Amikasi'nin moleküler yerleştirilmesi 46
Şekil 4.8 Penisilin'in moleküler yerleştirilmesi 46
Şekil 4.9 *Pseudomonas aeruginosa*'nın enfeksiyon bölgesine göre dağılımı 49
Şekil 4.10 Besleyici agarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi 50
Şekil 4.11 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Setrimid agar içinde büyümesi 51
Şekil 4.12 Beyin kalp infüzyon agar içinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi 52
Şekil 4.13 Müller Hinton besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi 53
Şekil 4.14 Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi ve MIC değerinin belirlenmesi 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada kullanılan ekipmanlar 30
Çizelge 3.2 Kimyasalların listesi 31
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ortamlar 31
Çizelge 3.4 Laboratuvarda hazırlanan besiyeri 32
Çizelge 3.5 Metil kırmızısı göstergesi 32
Çizelge 4.1 Tasarlanan moleküllerin sembolleri ve kimyasal yapıları 43
Çizelge 4.2 Tasarlanan moleküllerin moleküler yerleştirme sonuçları 44
Çizelge 4.3 Bakteriyel izolatların biyokimyasal testleri 48
Çizelge 4.4 API20 E test sonuçları 48
Çizelge 4.5 Farklı klinik örneklerden alınan izolatlarda tespit edilen bakteri türleri ... 50

1 GİRİŞ

İlaç geliştirme süreci, ilaç endüstrisinde tartışmalı bir konudur çünkü yeni ilaç potansiyelleri geliştirmek zaman ve kaynak gerektirmektedir (Rao and Srinivas 2011). Yüksek Verimli Tarama (HTS) ve Sanal Tarama, ilaç endüstrisinde Hit'leri (VS) bulmak için yaygın olarak kullanılan iki araçtır. Kimyasal bileşikler, Yüksek Verimli Taramada hedef proteinlere veya hücre bazlı tahlillere karşı etki için sentezlenir ve test edilir. Tüm büyük ilaç pazarlarında bu teknik yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ilaç firmaları için, sentezlenen her bir bileşiğin mali kapsamı, in vitro araştırma ve düşük isabet oranı önemli parametrelerdir. İlaç endüstrisinde, zaman çizelgelerini ve fiyatları düşürmeye yönelik girişimlerde bulunulmaktadır (Wassermann *et al.* 2015). Aslında yeni ilaçları tespit etmek için In silico yöntemler kullanılır. Bu analizlerde bilgisayar veya bilgisayar simülasyonları kullanılmaktadır. Bu sayede kimyasal maddelerin etkileri ile ilgili hesaplamaların yapılması, verilerin bilimsel analizi ve organizasyonu yapılmış olur.

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD), geleneksel yüksek verimli tarama (HTS) ve kombinatoryal Kimya'dan daha seçici bir tarama kullandığından, yeni ilaç bileşiklerinin (CC) belirlenmesinde etkin bir rol oynar. CADD, sadece terapötik aktivitenin moleküler temelini açıklamayı değil, aynı zamanda aktiviteyi iyileştirecek olası türevleri tahmin etmeyi de amaçlar. CADD tipik olarak bir ilaç keşif kampanyasında, başlangıç moleküllerini bir seferde bir fonksiyonel grup "artırarak" veya parçaları yeni kemotipler halinde bir araya getirerek yeni bileşikler tasarlamak için kullanılır (Xie *et al.* 2016).

Aslında Yapıya dayalı ilaç tasarımı (SBDD) ve ligand tabanlı ilaç tasarımı (LBDD) CADD'ın iki türüdür. Yapıya dayalı ilaç tasarımında etkileşimi ölçmek için hedef protein yapısı bilgisini kullanılırken Ligand bazlı ilaç tasarımında aktif ve aktif olmayan moleküllerin kimyasal benzerlikleri ve istatistiksel modeller kullanır (Xie *et al.* 2016).

Bu araştırmada, klinik *Pseudomonas aeruginosa* oluşumunu engelleyen bileşikleri tahmin etmek ve tasarlamak için Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı yaklaşımı kullanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa*, bağışıklığı baskılanmış kişilerde veya altta yatan üriner sistem,

solunum yolu veya cilt enfeksiyonları gibi tıbbi durumları olan kişilerde önemli morbidite ve mortaliteye neden olan fırsatçı bir patojendir ve hastane enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Buna ek olarak antibiyotikler ve dezenfektanlar genellikle *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkisizdir (Stover *et al.* 2000).

DNA Topoizomeraz enzimleri, DNA çift sarmalları üzerinde işlev görür ve *Pseudomonas aeruginosa* genomundaki önemli ve farklı genler tarafından kodlanır. Gram negatif bakterilerde GyrA ve GyrB genleri DNA giraz enzimini kodlarken, ParC ve ParE genleri Topoizomeraz IV enzimini kodlar (Deweese *et al.* 2009). DNA Giraz ve Topoizomeraz IV, DNA'nın topolojik durumunu modüle ederek bakteriyel kromozomdaki düğümleri kaldırmaya ve alt sargılı DNA seviyelerini düzenlemeye yardımcı olur. Bu enzimler, çoğu nükleik asit işleminde önemli roller üstlenirler, alt sargılı DNA seviyelerinin kontrol edilmesine yardımcı olur ve bakteri kromozomundan düğümleri ve karışıklıkları giderir. Gram negatif bakterilerdeki DNA Giraz ve topoizomeraz IV, A ve B heterotetramerleri adı verilen iki fonksiyonel alt birimden oluşur (Tretter and Berger 2012).

Birçok ilaç sınıfı, özellikle Kumarin ve Kinolonlar enzim DNA parçalama komplekslerinin konsantrasyonunu artırarak, potansiyel olarak öldürücü ve öldürülmüş hücreler haline gelmektedir (Grossman *et al.* 2007). Bu ilaçlar DNA Giraz ve Topoizomeraz IV'ü hücresel toksinlere çevirdikleri için "Topoizomeraz zehirleri" olarak bilinmektedir (Aldred *et al.* 2014).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmada, daha fazla inhibisyon kapasitesi sağlamak için antibiyotik ve enzim arasındaki ilişkinin belirlenmesi, antibiyotiklerin hedef protein üzerinde incelenmesi ve uygulanması ile *in silico* ile *in vitro* antibiyotik çalışmalarının karşılaştırılması amaçlanmıştır

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 In Silico Çalışmalar

2.1.1 İlaç keşfi

İlaçlar, hastalığı önlemeye veya hasta bir kişiye sağlığını geri vermeye yardımcı olan kimyasallardır. Tıbbi kimya, gözlem veya tasarım yoluyla bu ilaçların yaratılmasından sorumlu araştırma alanıdır. Antik çağın klasik ilaçları, esas olarak doğada bulunan bileşiklerin kullanıldığı bilimsel deneyler yoluyla keşfedilmiştir. Mevcut ilaç geliştirme kalıpları; keşiften tasarıma geçiş, hastalığın biyokimyasının reseptörler ile incelenmesi, hastalığa neden olan proteinlerin keşfedilmesi ve buna bağlı olarak bileşiklerin geliştirilmesini kapsamaktadır. Bu sıralama biyoeczacılık endüstrisinde standart prosedür haline gelmiştir. Hem deneysel hem de hesaplamalı yaklaşımlar ilaç keşfi ve üretiminde önemli rol oynamaktadır (Bajorath 2002).

İlaç keşfine yönelik geleneksel yaklaşımlar, potansiyel bir adayı belirlemek için çok sayıda bileşiğin aşamalı sentezine ve taranmasına dayanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar; ilaç keşfi, tasarımı, geliştirmesi ve optimizasyonunu kolaylaştırmak için birleşik kimyasal ve biyolojik alan hesaplama yöntemlerinin önemini ortaya çıkarmıştır (Kapetanovic 2008). Hesaplamalı yaklaşımların, hedef makromolekülün temel moleküler tanıma aktivitelerini tanımada kritik bir rol oynaması ve hedef için daha iyi yolların geliştirilmesine yol açması beklenmektedir (Shaikh *et al.* 2007).

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (*In silico*) yaklaşımları, ilaç geliştirmenin Hit, Lead Tanımlama ve Lead Optimizasyon aşamalarında çeşitli hedeflere yönelik olarak yıllar içinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel ilaç keşif yöntemlerine kıyasla akılcı ilaç tasarım yöntemleri, ilaç geliştirme sürecindeki zaman ve maliyeti azaltmaktadır. Yeni inhibitörleri tanımlamak / tasarlamak veya çeşitli kaynaklardan tanımlanmış moleküllerin absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite profilinin optimizasyonu için kullanılabilir (Chen *et al.* 2012, Bäckhed *et al.* 2003).

2.1.2 In silico ilaç tasarımı

"*In silico*" terimi "bilgisayar destekli" anlamına gelir. 1989'da kelime, Latince *in vivo, in vitro* ve *in situ* terimlerinden bir kelime oyunu olarak türetilmiştir. *In silico*, ilaçların analitik yöntemler kullanılarak oluşturulması ve rasyonel bir süreç anlamına gelmektedir. İlaç araştırma ve üretim yöntemleri hem pahalı hem de zaman alıcıdır. Tek bir yeni ilacı üretmenin ve pazara sunmanın maliyeti 1 milyar doları aşmaktadır. Her bir ilacın sadece ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanması ve prosedürün tamamlanması ortalama 12 yıl sürmektedir (Khanna 2012).

Klinik öncesi değerlendirmenin maliyeti, ilaç tasarımlarının toplam maliyetinin %32'si olarak hesaplandığından (Wasko *et al.* 2015), istenen sonuçları elde etmek için Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD) kullanılması gerekli hale gelmiştir. CADD, deneysel bulgu ve etki mekanizması hakkında değerli bilgiler, moleküler yapıların sentezlenmesi için yeni öneriler sağlar. Bu da senteze başlamadan önce uygun maliyetli kararlar alınmasına yardımcı olabilir. CADD yöntemleri kullanılarak keşfedilen ve/veya optimize edilen çok sayıda bileşik, klinik çalışma düzeyine ulaşmış ve hatta Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (ABD FDA) onayı ile kazanmıştır (Liao *et al.* 2011).

2.1.3 Bilgisayar destekli ilaç tasarımı kategorisi

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı iki genel kategoride sınıflandırılabilir: Yapı bazlı ilaç tasarımı ve Ligand bazlı ilaç tasarımı.

2.1.3.1 Yapı bazlı ilaç tasarımı (SBDD)

Yapı tabanlı ilaç tasarımı (SBDD), reseptör yapısının bu yöntem için bir ön koşul olduğu durumlarda, inhibitörünün geliştirilmesi için ilaç hedefinin yapısal bilgisinin kullanıldığı yaklaşımdır. Reseptörün en yaygın yapısı, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi X-ışınının kristografisi veya Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi (NMR) gibi deneysel tekniklerle belirlenir (Wasko *et al.* 2015)



Şekil 2.1 Yapıya dayalı ilaç tasarımı ligand (koyu yeşil), protein reseptörünün (kırmızı) ortosterik cebine (yeşil bulut) yerleştirilmesi (Wasko *et al.* 2015)

Protein ilacı hedefinin yapısı bilinmiyorsa, yapıyı tahmin etmek için iplik geçirme (katlama olarak da bilinir) ve homoloji modelleme gibi istatistiksel yaklaşımlar kullanılabilir. Kristal yapının yokluğunda, homoloji modelleme hedefin üç boyutlu (3D) görüntüsünü elde etmek için birincil ilgili protokol haline gelmiştir (Cavasotto and Phatak 2009). Yapıya dayalı ilaç geliştirmenin iki türü vardır.

De novo ilaç tasarımı

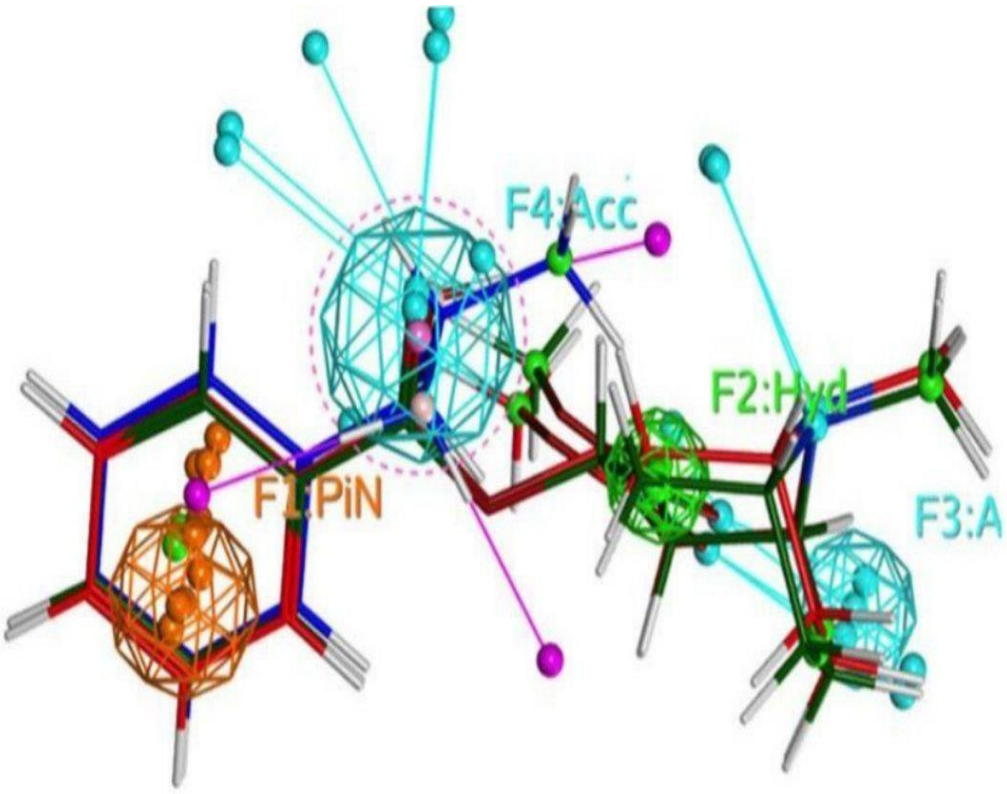
De novo, "başlangıçtan itibaren" anlamına gelen Latince bir kelimedir. Bir ilaç hedefinin aktif bölgesi yapısal olarak karakterize edildiğinden, bağlanma özelliklerini ortaya çıkarır. Aktif bölge yapısı ve bağlanma bölgesindeki farklı amino asitlerin oryantasyonu, bu hedefe özgü ligandları üretmek için kullanılabilir. De novo tasarım yaklaşımları için protein aktif bölgelerini analiz edebilen ve yeni bileşikler önerebilen hesaplama teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yapı bazlı sanal tarama

Yapıya dayalı sanal tarama, kurşun tanımlama aşamasında yaygın bir yöntemdir ve ilaç keşfi ve üretim sürecini hızlandırmak ve kolaylaştırmak için deneysel Yüksek Verimli Taramaya (HTS) ek olarak kullanılır (Ghosh *et al.* 2006). Taranan veri tabanlarındaki bileşikler, belirli bir reseptör için uygun olduğu düşünülen biyolojik aktivite için küçük bir alt kümenin seçilmesi ve değerlendirilmesi amacıyla derecelendirilir (Kroemer 2007).

2.1.3.2 Ligand bazlı ilaç tasarımı (LBDD)

Ligand bazlı ilaç tasarımı (LBDD), reseptör hakkında 3B bilginin yokluğunda ilgili biyolojik hedefe bağlanan moleküllerin farkındalığına odaklanan bir tekniktir. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi ligand bazlı ilaç tasarımında en önemli ve yaygın olarak kullanılan yöntemler 3D kantitatif yapı aktivite ilişkileri (3D QSAR) ve Farmakofor modellemedir (Gutsmann *et al.* 2001).



Şekil 2.2 Liganda dayalı ilaç tasarımı

2.2 Bakteriyel Çalışma

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa'nın* genel özellikleri

Pseudomonas, Pseudomonadaceae familyasında bulunan bir cinstir. Farklı katabolik ve metabolik özellikler sergileyen çok sayıda türden (Gram-negatif bakteri türleri) oluşur. *Pseudomonas* cinsinin üyeleri, bu çeşitlilik nedeniyle inekler, köpekler, atlar gibi birçok hayvan türünde ve çeşitli ekolojik nişlerde bulunabilir. Fırsatçı patojenler olarak bilinen bu bakteriler, insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde enfeksiyonlara ve hastalıklara neden olduğundan tıbbi araştırmalarda çok ilgi görmektedir (Spiers *et al.* 2000).

2.2.1.2 *Pseudomonas*'ın bazı türleri

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas cepacia*
- *Pseudomonas gladioli*
- *Pseudomonas facilis*
- *Pseudomonas pickettii*
- *Pseudomonas maltophilia*

2.2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın patojenitesi

Pseudomonas türleri; su, toprak ve bitki yüzeylerinde bulunabilen serbest yaşayan organizmalardır. Sağlıklı insanlarda enfeksiyonlar nadirdir, ancak ortaya çıktıklarında genellikle hafif etkiye sahiptir. Başka bir enfeksiyona sahip olan, hastanede yatan (nozokomiyal enfeksiyon) ve bağışıklık sistemi zayıf olan diğer hastalarda semptomlar daha şiddetlidir (Anderson *et al.* 2020). *Pseudomonas* enfeksiyonları özellikle aşağıdaki gruplar için zararlıdır:

- Diyabet hastaları
- Ağır yanıkları olan hastalar
- Kistik fibrozlu hastalar
- HIV/AIDS'li veya otoimmün bozukluğu olan hastalar
- Kemoterapi gören hastalar

Pseudomonas türleri, konakçının bağışıklık sistemi zayıfladığında hastalığa neden olan fırsatçı patojenlerdir. *Pseudomonas* cinsi 140'tan fazla tür içerirken, yaklaşık 25'i insanlarla ilişkilendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas putrefaciens* ve *Pseudomonas fluorescens* insanlarda görülen en yaygın patojenler arasındadır. Aynı zamanda insanlarda etkili olan *Pseudomonas mallei* (şimdi ve *Pseudomonas pseudomallei* türleri, sistematikçiler tarafından yapılan çalışmalarda *Burkholderia mallei* ve *Burkholderia pseudomallei* olarak yeniden adlandırılmıştır.

İnsanlarda klinik ortamlarda görülen enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden biri *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Bunun nedeni, gezegendeki en yaygın serbest yaşayan bakterilerden biri olmasıdır. *Pseudomonas* türleri su, toprak ve bitkilerde bulunabildikleri için insanlara temas yoluyla çok rahat olarak geçmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* deri üzerinde, koltukaltı ve vücudun özel olarak nemli bölgelerinde bulunabilir. Bireyin bağışıklık sistemi tehlikeye girerse, bu da bakterilerin enfeksiyon geliştirmesini mümkün kılar. Bakterilerin, hastane ortamında nemlendiriciler ve kateterler de dahil olmak üzere çeşitli tıbbi aletlerde iyi büyüdüğü bilinmektedir. Uygun önlemler alınmazsa, bakteriler konakçının vücuduna kolayca sızabilir ve hastalığa neden olabilir. Daha önce belirtildiği gibi, bakteriler vücuda yaralar (ameliyattan kaynaklananlar gibi), yanık yaraları veya tıbbi cihazlar yoluyla girebilir.

2.2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları

1. **Folikülit**

Folikülit veya saç köklerinin iltihabı, en yaygın cilt bozukluklarından biridir. Bakteriler kirli suya maruz kalmanın bir sonucu olarak saç köklerini kolonize ettiğinde, Pseudomonas foliküliti (genellikle Pseudomonas aeruginosa'nın çeşitli suşlarının neden olduğu) meydana gelir (örneğin bir yüzme havuzunda, banyo küvetlerinde ve su kaydıraklarında vb.). Şişme yüzme oyuncakları veya diğer banyo nesneleri gibi kirli nesnelerle cilt etkileşimi buna neden olabilir.

2. **Dış kulak iltihabı**

Yüzücü kulağı olarak da bilinen dış kulak iltihabı, dış kulak kanalının iltihaplanmasıdır. En sık görülen enfeksiyon kaynağı, banyodan sonra kulakta enfekte su kaldığında ortaya çıkması en muhtemel olan *Pseudomonas*'tır. Bu durumlarda su, bakterilerin yayılması ve çoğalması için mükemmel bir yaşam alanı sağlar. Enfeksiyon, etkilenen kulakta aşırı ağrı, kraniyal sinir felçleri ve ciddi vakalarda (diyabet hastalarına bağlı kötü huylu dış kulak iltihabı) işitme kaybı ile karakterizedir. Öte yandan, kulak çevresinde kaşınma ve hassasiyet, akut dış kulak iltihabının belirtileridir (Anderson *et al.* 2020).

3. **Ektima gangrenozum**

Bu, nötrofil sayısı düşük hastalarda ve *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında (bakterilerin kanı enfekte ettiği) görülen bir deri lezyonu şeklidir. Kolayca püstüllere ve nekrotik ülserlere dönüşen kabarcıklar, Ektima gangrenozum'un bazı belirtileridir (Anderson *et al.* 2020).

4. **Zatürre ve solunum yolu enfeksiyonları**

Pseudomonas sağlıklı insanlarda hafif enfeksiyona neden olabilirken, sağlık sorunları olan, altta yatan akciğer hastalıkları (ya da diğer solunum koşulları) bulunan hastalarda daha ciddi enfeksiyonlara neden olur. Bakteri, HIV pozitif hastalarda sinüzit ve pnömoninin önde gelen nedenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyon ise solunum cihazlarının neden olduğu zatürre ve bronşit ile ilişkilendirilmiştir. Tıkanıklık, şiddetli

öksürük ve göğüs ağrıları bu enfeksiyonların en sık görülen semptomlarından bazılarıdır (Spiers *et al* 2000).

5. İdrar yolu enfeksiyonu

Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, *Pseudomonas aeruginosa* idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) en sık nedenlerinden biridir. İYE'ler insanlarda en sık görülen hastalıktır ve en yaygın nedeni kateterizasyondur. Üropatojenik İYE'lere neden olan *Pseudomonas aeruginosa* suşları, enfeksiyon yükünün %12'sinden sorumlu olan hastane kaynaklı İYE'lerin en çok karşılaşılan nedenidir. *Pseudomonas aeruginosa,* idrar yolu kolonizasyonunu teşvik eden birçok virülans faktörü ile İYE'ye neden olmak için çok yönlü bir strateji kullanır. Bunlardan en önemlisi biyofilm oluşumudur. Yapılan çalışmalarda, insan idrarındaki ürenin biyofilm oluşumunu teşvik ettiği ortaya çıkmıştır Üre, biyofilmin yapışmasını ve stabilizasyonunu geliştiren DNA'nın salınmasını teşvik eder. Bunlara ek olarak üre, biyofilmlerde tip III salgılama mekanizmasındaki değişiklikler ve QS gibi diğer genetik modifikasyonlara neden olur (Cole *et al.* 2014). Aljinat, flagella ve pili gibi diğer virülans faktörleri de *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer türlerin İYE geliştirmesinde önem arz etmektedir. Özellikle çocuklar arasında İYE izolatlarında antibiyotik direnci de daha yüksektir (Pobiega *et al.* 2016).

6. Gastrointestinal sistem enfeksiyonu

Bağırsakta *Pseudomonas aeruginosa* kolonizasyonu bazı hastalarda enterite neden olabilir. Buna bağlı olarak gelişen ishal ve baş ağrısı olası semptomlar arasında gelmektedir.

7. Kornea ülserleri

Bu hastalık kirli kontakt lens takmanın bir sonucu olarak gelişen açık bir yara olarak tanımlanmaktadır. Genellikle göz kızarıklığı ve çarpık görme gibi semptomlar ile kendini belli eder.

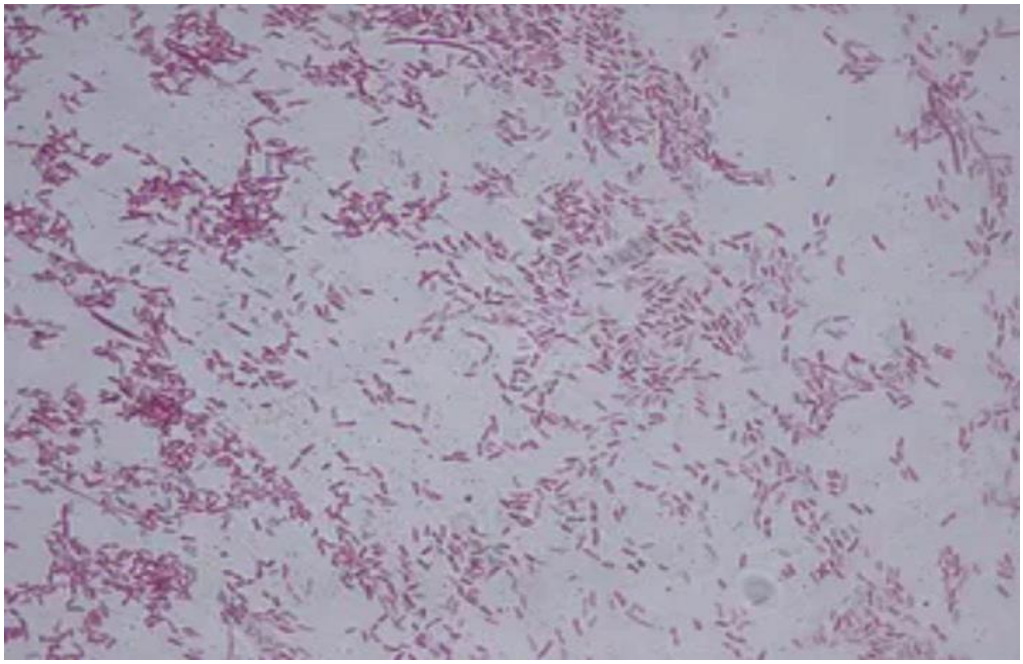
8. Bakteriyemi

Bakteriyemi, enfekte sıvıların kullanımından veya diğer nedenlerden kaynaklanmaktadır. Kısaca kanda bakteri varlığı olarak tanımlanmaktadır (Cole *et al.* 2014).

2.2.1.5 Morfoloji ve yapı

Pseudomonas türleri çubuk şeklindedir bazen düz, kuvvetli bükülmüş veya sarmal şeklinde olabilir. Bu cinsteki en yaygın türlerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* hafif kavisli bir şekle sahiptir. Genel görünümlerindeki bazı varyasyonların yanı sıra, çap olarak 0,5 ile 1,0 µm ve uzunluk olarak 1,5 ile 5,0 µm arasında değişen boyutlarda bulunabilirler. *Pseudomonas* türlerinin diğer bir morfolojik özelliği de Bir veya daha fazla kamçının görünümüne sahip olmasıdır. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* tek hücreli kılıfsız (dışarı membranöz kılıftan yoksun) bir kutup ucuna sahiptir. Yapının yüzme hareketliliği, yapışma ve biyofilm oluşturma gibi çeşitli işlevleri vardır. Flagellum veya diğer türlerdeki flagella, türe bağlı olarak farklı içeriklere sahip polimerize flagellin proteinlerinden oluşur (Persat *et al.* 2015).

*Pseudomonas aeruginosa'*nın bazı suşlarının sadece bir kamçıya sahip olmasına rağmen, diğerlerinin iki veya üç kamçıya sahip olduğu tepit edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa'*nın yüzeyinde kamçıya ek olarak pili vardır. *Pseudomonas aeruginosa*, polar tip IV'ün sahip olduğu Pili yapışma için kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yapıların (pili Tip IV (T4P)) patojenezde ve DNA alımında kritik olduğu ve bakteriyel virülansı beslediği bulunmuştur. Tip IV pili'nin dört farklı çeşidi vardır. IVa, IVb ve Tad bunlardandır. Pili esas olarak hareket ve bağlanma ile ilgili olmasına rağmen, bazı araştırmalar klinik izolatlarda da antifagositik rollere sahip olabileceğini göstermiştir (Udaondo *et al.* 2018)



Şekil 2.3 *Pseudomonas aeruginosa* fluorescens gram boyaması (Udaondo *et al.* 2018)

2.2.1.6 Hücre yapısı

Pseudomonas türleri diğer birçok bakteri gibi zarla çevrili organelleri olmadığı için basit bir hücre yapısına sahiptir. Bununla birlikte, klinik izolatlarda bir dizi faydalı özellik ile ilişkili olan kromozomal DNA ve plazmitlere sahiptirler (Laverty *et al.* 2014).

Yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas aeruginosa* gibi türler de hücreden hücreye birbirine bağlanan matris kısmı olarak hizmet eden hücre dışı DNA ürettiği tespit edilmiştir. Hücre dışı DNA (ex-DNA) hücrenin dışında bulunur ve her ikisi de hücre içi DNA (i- DNA) olan kromozomal DNA ve plazmitlerin aksine doğada yaygın olarak bulunur. Biyofilmlere katkıda bulunan bileşenlerden biri olan bu DNA türü, bakterilerin bağışıklık sisteminin bazı hücrelerinden korunmasında önemli bir rol oynar (Dunne Jr and Hardin 2005).

2.2.1.7 Hücre zarı

Pseudomonas aeruginosa dahil olmak üzere *Pseudomonas* türlerinin çoğunluğu, hücreyi kaplayan üç ana katmana sahiptir. Bunlar; iç zar (sitoplazmik zar olarak da bilinir), dış zar ve iç ve dış zarlar arasında uzanan peptidoglikan tabakasıdır. Protein, lipopolisakkarit (LPS) ve fosfolipidler, peptidoglikan tabakasını çevreleyen dış zarın bileşenleri arasındadır. *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenik organizmalar toksik lipopolisakkarit üretse de bunların genellikle diğer Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen LPS'den daha az toksik olduğu bilinmektedir. Bu durum diğer Gram-negatif patojenlerin aksine, etkili bir enfeksiyonu indüklemek için daha fazla bakteri dozuna veya aşısına ihtiyaç duyulmasının nedenlerinden biridir. Lipopolisakkarit, hidroksi yağ asitleri, heptoz, çekirdek polisakaritler ve 2-keto-3-deoksioktonik asit dahil olmak üzere *Pseudomonas aeruginosa'*daki çeşitli bileşenlerden oluşur. Hücre duvarının temel bileşeni, orta tabakada (dış ve iç zar arasında) bulunan ve kök peptidde N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşan peptidoglikandır (PG). Peptidoglikan tabaka bileşenleri, periplazmaya gönderilmeden önce hücrenin sitoplazmasında sentezlenir. Periplazma, periplazmik boşluk olarak da bilinir bunu yanı sıra iç ve dış zarlar arasındaki bölgedir (Anderson *et al.* 2020).

2.2.1.8 *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörü

Pseudomonas aeruginosa, konakçıyı ve bağışıklık sistemini enfekte etme yeteneğine sahiptir ve bu durum yok edilmesi neredeyse zor olan enfeksiyonlara neden olur (Skariyachan *et al.* 2018). Lipopolisakkarit, Flagellum, Tip IV Pili, Tip III Salgı Sistemi, Ekzotoksin A, Proteazlar, Aljinat, Nisap Algılama, Biyofilm Oluşturma, Tip VI Salgı Sistemleri ve Hava Sahasında Oksidan Üretimi, virülans faktörlerinin neden olduğu patojenite örnekleridir. Bağışıklık sisteminde farklı şekillerde işlev gören birçok ana virülans faktörü vardır (Lambert *et al.* 2011, Gellatly and Hancock 2013)

LPS, *Pseudomonas aeruginosa* dış zarının önemli bir bileşenidir. Lipid A (ya da endotoksin) olarak bilinen bakteriyel LPS, tekrar etmeyen bir merkezi oligosakkarit ve bir uzak polisakkarit (ya da O-antijen)'ten oluşur. LPS, konakçıda hem doğuştan gelen

(TLR4, NLRP1, NLRP2 ve NLRP3) hem de adaptif (veya edinilmiş) immün yanıtları aktive ederek morbidite ve mortaliteye yol açan düzensiz inflamatuar yanıtlarla sonuçlanır. Virülans faktörleriyle ilgili olarak, *Pseudomonas aeruginosa'*nın tip IV pili, birçok hücre tipine yapışmada önemli bir role sahiptir ve bu, doku tropizmi ve belirli dokulara bağlanma gibi fenomenlerde önemlidir. Mikrobiyal yüzeylerde karşılık gelen yapışmaları kabul eden fagosit reseptörleri, biyofilm oluşumunu ve opsonik olmayan fagositozu başlatır (Raetz and Whitfield 2002). Bununla birlikte, Tip III Salgı Sistemi virülans faktörleri, Tip I, II, III ve IV olmak üzere virulansta rol oynayan bir dizi salgı sistemini içerir. T3SS, proteinleri doğrudan *Pseudomonas aeruginosa* sitoplazmasından konakçı hücrelerin sitozolüne taşımak için flagellum-bazal-vücutla ilgili bir mekanizmayı içeren en ilgi çekici virülans faktörlerinden biridir bu da fagositozdan kaçınmanın yanı sıra doku yıkımına, bağışıklıktan kaçınmaya ve bakteriyel yayılmaya yol açar (Frank 1997).

Virülans faktörleri ekzotoksin A, proteinleri hücre dışı ortama salgılamak için lipaz, fosfolipaz, alkalin fosfataz ve proteaz dahil olmak üzere pilus benzeri bir aparat kullanan Tip II salgılama mekanizması yoluyla salgılanır. Hayvan deneyleri, model enfeksiyonda bu faktörlerin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Ayrıca ekzotoksin A'nın lokal doku hasarı ve istilasında görev almaktadır (Passador and Iglewski 1994).

Elastaz LasB tipi metaloproteazlar olarak *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen birkaç proteaz, konakçı dokuyu yok eder; bu nedenle hem akut akciğer enfeksiyonlarında hem de yanık yara enfeksiyonlarında önemli bir rol oynar (Bielecki *et al.* 2008). Zaten virülans faktörleri aljinat, aljinattan, β 1-4 bağlantılı D- mannuronik asit (poli-M) ve L-guluronik asidin asetillenmiş rastgele bir ko-polimerinden oluşan bir mukoid ekzopolisakarit kapsülü üretebilir (Pier *et al.* 2001).

CF akciğer içinde hücre uyumunu sağlayan aljinatın aşırı fagositoz duyarlılığını azaltan konakçı savunmasının direnci ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Diggle *et al*. 2006). Virülans faktörü olarak bilinen Quorum algılama, yayılabilir kimyasal bileşikler yoluyla "hücreden hücreye" iletişim mekanizmasıdır. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından

üretilen AHL sinyalleri, oksoheksanoil-homoserin lakton ve bütanoil-homoserin laktondur (Hirakawa And Tomita 2013).

AHL sentezi (LasI / RhlI), sisteme yayılan AHL sinyalleri üretir. Enfeksiyon sırasında bakteri yoğunluğu arttıkça otoindükleyici konsantrasyonu artar. Otoindükleyici belirli bir zamanda bir eşiği geçer ve daha sonra transkripsiyonel aktivatöre (LasR / RhlR) bağlanır ve biyofilm oluşumunda yer alan ve virülans faktörlerini kodlayan genleri aktive eden bir kompleks oluşturur (Hauser 2009). Biyofilm gelişimi, planktonik bakterilerin Tip IV pili ve flagellum yoluyla bir yüzeye tutunmasıyla başlar, ardından seğirme hareketliliği ve mikrokolonilerin oluşumu ve son olarak da çekirdek algılama sinyallerinin birikmesi gelir. Mikrokoloniler karşılandığında, yeterli sayıyı hissetme sinyallerin kritik bir seviyeye kadar bir hücre dışı matris içinde hapsolur (Skariyachan *et al.* 2018).

1. Somatik antijenler

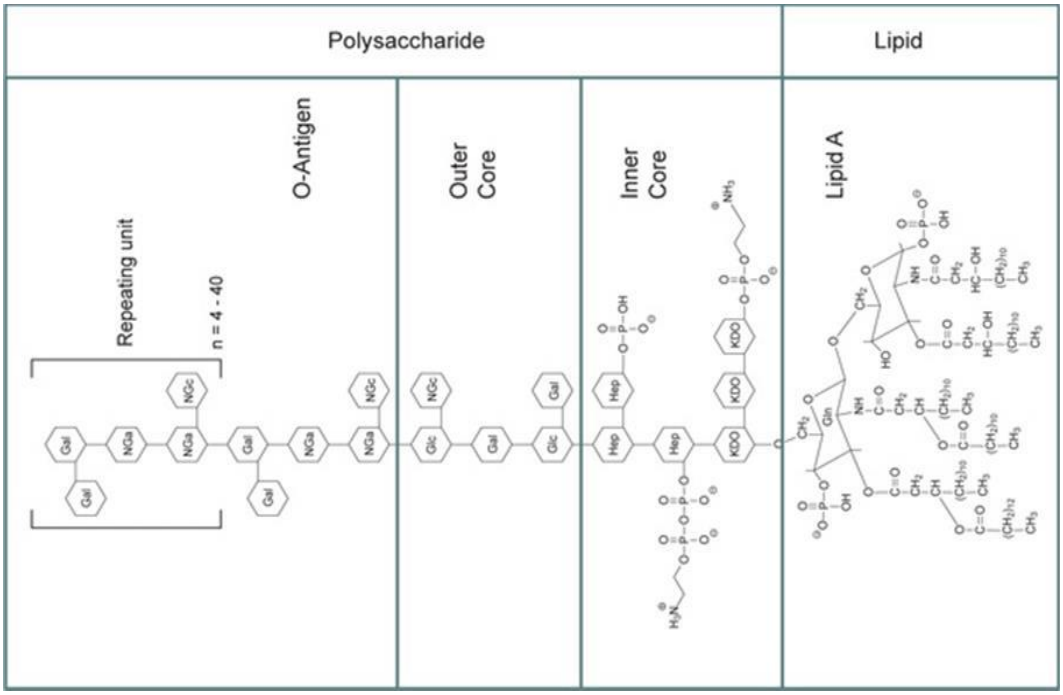
Virülans faktörü olarak aljinatın yanı sıra lipopolisakkarit (LPS) ve Ekzopolisakkarit (EPS), *Pseudomonas aeruginosa'nın* iki ana somatik antijenidir (Ramsey and Daniel 2005).

(A) Lipopolisakkarit (LPS)

Gram negatif bakterilerin dış zarı esas olarak lipopolisakaritten (LPS) oluşur. Lipopolisakkarit, zarın dış tabakasında bulunur ve kapsüllenmemiş suşların hücre yüzeyinde açığa çıkar. Bakteriyel lipopolisakkaritlerin genel yapısı ve Heptulosis bölümünün ayrıntılı açıklaması Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Lipopolisakkaritin (LPS) Yapısında; bozulmamış bakteriyel lipopolisakkaritler, 10 ile 20 kDa arasında değişen ve üç yapısal bileşenden oluşan moleküler kütlelerden meydana gelen makromoleküllerden oluşur (Ohno and Morrison 1989).

Şekil 2.4 incelendiğinde Bakteriyel lipopolisakkaritlerin genel yapısında, Lipid A; molekülün toksik özelliklerinden sorumlu olan hidrofobik lipid bölümü, Bir hidrofilik çekirdek polisakarit zinciri ve Bakteriyel serotipe özgü, tekrarlayan bir hidrofilik O-antijenik oligosakkarit yan zincirinin olduğu görülmektedir.



Şekil 2.4 Bakteriyel lipopolisakkaritlerin genel yapısı (Ohno and Morrison 1989)

Lipid A çekirdeği, her iki karbonhidrata da bağlı yağ asidi esterleri ile bir β-glukozamin-(1→6)-glukozamin-1-fosfat bazından oluşur. Asil zincir uzunluğu ve asil gruplarının sayısı bakteri türleri arasında değişebilir, ancak bir tür içinde nispeten korunur. İç polisakkarit çekirdek tipik olarak disakkarit çekirdeğe bağlı 1 ile 4 KDO (3 deoksi -a-D-manno - oktulosonik asit) molekülü içerir. KDO spesifik olarak lipopolisakkarit ile ilişkilidir ve biyolojik olarak aktif lipid A'nın bakteriyel hayatta kalması için en az bir KDO kalıntısı gerektirdiği düşünülmüştür (Mayer *et al.* 1985). Bununla birlikte, KDO eksikliği olan bir K-12 baskılayıcı suşu, KDO gereksiniminin canlılık için mutlak olmadığını gösterir (Mayer *et al.* 1985). KDO içeren iç çekirdek aynı zamanda en yaygını L- glisero-α-D- manno- heptopiranoz olan heptuloz (ketoheptoz) monosakkaritler ile modifiye edilmiştir. İç çekirdek glikan kalıntıları tipik olarak fosforile edilir veya fosfat içeren pirofosfat veya 2-aminoetilfosfat gruplarıyla modifiye edilir. Lipopolisakkaritlerin

fosfat grupları, hücre zarının genel negatif yükünü arttırır ve yapıyı stabilize etmeye yardımcı olur. Lipopolisakkaritin dış çekirdeği, glikoz, galaktoz ve N- asetilglukozamin dahil olmak üzere daha yaygın heksozlar içerir ve yapısal olarak iç çekirdekten daha çeşitlidir (Ehmann and Lahiri 2014).

O-antijen, tipik olarak iki ile altı şekerden oluşan tekrarlayan bir oligosakarit birimidir. O-antijen, bakterileri farklılaştıran lipopolisakkaritin birincil yapısal bileşenidir. Bir lipopolisakkaritin çekirdek bölümü ve lipid A bölümü, yapıda bir miktar değişkenliğe sahip olabilirken, O-antijeni yüksek derecede yapısal farklılığa ve aynı zamanda tekrar eden birimlerin sayısında değişkenliğe neden olur. Bu farklılıklar, LPS'de önemli miktarda heterojenlik ile sonuçlanır. LPS heterojen olduğundan ve değişen boyutlarda kümeler oluşturmaya meyilli olduğundan, bu kümeler için 1- 4 milyon Dalton veya daha büyük bir "moleküler kütle" aralığında olduğu belirtilmiştir (Domenech *et al.* 2013).

(B) Ekzopolisakkarit

Aljinat, hipokloriti yabancılaştırdığı, kompleman aktivasyonunu baskıladığı ve polimorf nükleer kemotaksiyi en aza indirdiği gösterilen *Pseudomonas aeruginosa* mukoidinin önemli bir hücre dışı kısmıdır (Leid *et al.* 2005). Bakterileri çevreden ve antibiyotiklerden koruyan bir başka virülans faktörü de aljinattır. *Pseudomonas aeruginosa'*daki pilli ve polar flagella konakçı dokuya yapışmaya aracılık ettikleri için patojenite için esastır.

Pilli ayrıca kolonizasyonu etkileyen ve patojen yayılımında önemli bir hareketlilik türü olan seğirmeyi kolaylaştıran uzayabilir ve geri çekilebilir özelliklere sahiptir (Comer *et al.* 2002).

(B1) Hücre dışı faktörler

Biyofilmler, bir biyofilm matrisi oluşturmak için çok sayıda hücre dışı molekül üreterek kendi kendini sürdüren mikroorganizma popülasyonlarıdır (Vital-Lopez *et al.* 2015). Bu hücre dışı moleküller ağırlıklı olarak diğerleri arasında polisakaritler, proteinler, hücre

dışı DNA (e-DNA), metabolitler ve sideroforlar gibi bileşenleri içerir (Flemming and Wingender 2010). Toplam biyofilm biyokütlesinin %90'ını oluşturan biyofilm matrisi, karmaşıklığı ve içindeki farklı moleküllerin bilinmeyen konumları nedeniyle "biyofilmlerin kara maddesi" olarak adlandırılmıştır (Flemming and Wingender 2010). Bir mikrobiyal popülasyonu savunabileceği ve antimikrobiyal direnci geliştirebileceği çeşitli yollar göz önüne alındığında, biyofilm matris bileşenleri, biyofilm mimarisi, besin kaynağı ve patojen kalkanı için çok amaçlı olarak kabul edilebilir (Wilton *et al.* 2016). Biyofilm matris bileşenleri, bakterileri ve biyofilmi yüzeylere tutturmak için bir yapıştırıcı görevi görerek onları fiziksel engellerden örneğin antiseptiklerden korurlar (Karimi *et al.* 2015). Her molekül, hem biyofilm matrisine hem de tüm biyofilme yapısal stabilite sağlamak için matris içinde sinerjistik olarak etkileşime girer (Ghafoor *et al.* 2011).

Kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlara biyofilm oluşumu neden olur. Tekrarlayan enfeksiyonlara, biyofilmi yeniden oluşturan tedaviden arta kalan hücreler neden olur. Kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlar özellikle yara enfeksiyonlarında, KF akciğer enfeksiyonlarında ve kateter enfeksiyonlarında yaygındır. Planktonikten biyofilm büyüme modlarına geçiş, uygun bir bağlanma yeri bulunduğunda gerçekleşir. Çekirdek algılama (QS) mekanizması yoluyla hücre-hücre bağlantısı, planktonik hücreleri hareketsizleştirir, bu da agregasyona ve bir mikrobiyal biyofilm kültürünün oluşmasına neden olur. Biyofilmlere gömülü bakteri hücreleri, fiziksel ve kimyasal stres, antimikrobiyal saldırı ve hatta konakçı bağışıklık tepkileri dahil olmak üzere çeşitli streslere karşı dirençlidir ve biyofilm eradikasyonunu oldukça zorlaştırır (Hoyle *et al.* 1990)

Biyofilmler genellikle, kalıcı hücrelerin yükselmesine katkıda bulunan farklı metabolik hızlara sahip hücreler gibi fenotipik olarak çeşitli türleri içerir (Sultana *et al.* 2016).

a) **Ekzotoksinler S:** *Pseudomonas aeruginosa*, patogenezde kanıtlanmış bir rolü olan virülans faktörü ekzotoksin S üretir. Ekzotoksin S, ADPribosylation, hücredeki birçok proteinin aktivitesi ve T-hücresi apoptozu indükler. Ekzotoksin S, benzersiz bir T hücre mitojenidir; T hücrelerinin büyük bir kısmını aktive eden,

ancak gecikmiş ve azalmış lenfosit proliferasyonu ile sonuçlanan güçlü bir bağışıklık uyarıcısıdır.

b) **Ekzotoksinler (Exo T, Exo U ve Exo Y):** Bağışıklık tepkisinin baskılanmasındaki işlevine ek olarak, Exo T toksini hücre iskeleti hücrelerinin yok edilmesine yol açar (Engel *et al.* 1998). Exo U toksin hücre membran tükenmesi gibi sitotoksisiteleri (enfekte edilmiş hücrelere toksisite) indükler. ExoY toksini, enfekte hücrelerde cAMP üretim hızını artıran Adenilat siklaz enzimini uyarır.

c) **Elastaz:** Elastaz, proteazlar salgılar ve patogenezde önemli bir işlevi vardır (Kessler and Safrin 1994). Hücre dışı elastaz, enzimatik olarak aktif elastazın tek türüdür. Elastaz, insan immünoglobulin G'yi, serum alfa-1'i, proteinaz inhibitörünü ve diğer tamamlayıcı bileşenlerini inaktive eder ve böylece elastin ve kollajeni bozan bir metaloproteazdır.

d) **Alkalin Proteaz:** *Pseudomonas aeruginosa* tarafından geliştirilen ve akut enfeksiyon sırasında anahtar rol oynayan hücre dışı bir proteazdır; ancak, eylemlerinin ayrıntıları her zaman net değildir. Alkali proteazlar, alkali pH'da optimal olarak çalışan proteolitik enzimlere atıfta bulunur. Hücre dışı proteazlar önemlidir ve hücrenin hidrolitik ürünleri emmesini ve aynı zamanda kullanmasını sağlar. Bu hücre dışı proteazlar, çeşitli endüstriyel işlemlerde protein bozulmasına yardımcı olmak için ticari olarak da kullanılır.

e) **Hemolizin:** *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella enteric, Vibirio vulnificus, Sibirio parahemolyticus, E. coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram pozitif ve negatif bakteri türleri tarafından üretilir (Tiwari *et al.* 2002). *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde hemolizinin rolü iyi anlaşılmamıştır. Bir hemolizin hidrolizini katalize eden bir ısıyla kararsız fosfolipaz C, fosforilkolin ve diasilgliserol üretir. Diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipiddir. Her iki hemolizin, düşük fosfatlı kültürlerde durağan faz sırasında üretilir. Bu hemolizinlerin organizmadaki önerilen fizyolojik rolü, inorganik fosfatın fosfolipidden serbest bırakılmasında alkalin fosfataz ile iş birliği içinde hareket etmesidir. Kırmızı kan hücreleri üzerinde nekrotize edici etkiye sahiptir ve enjekte edilen hayvanların derisinde ülserasyona neden olur (Sestito *et al.* 2017).

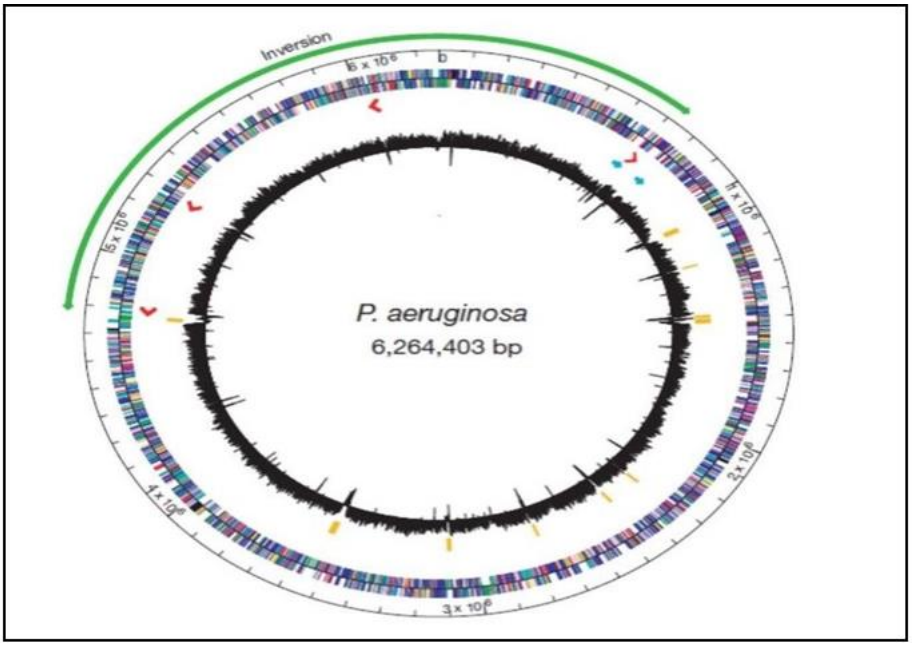
f) **Üreaz:** Kateterde kolonize olan ve geniş biyofilmler oluşturan üreaz üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanır. Bakteriyel üreaz, üreden amonyak üreterek idrar ve biyofilmin pH'sını yükseltir. İdrarın pH'sı yükseldikçe, çözeltiden kalsiyum ve magnezyum fosfat kristalleri çıkar (Broomfield *et al.* 2009). 200'den fazla gram negatif bakteri türünde etkili olan ve *Pseudomonas, Klebsiella, Proteus, Staphylococcus, Providencia* ve *Morrganella* gibi birçok bakteride patojeniteden sorumlu olan bu enzimin; idrar sondası kabuklanma, piyelonefrit, amonyak ensefalopatisi, gastrointestinal ülser vb semptomlar yarattığı bilinmektedir (Broomfield *et al.* 2009).

g) **Pigmentler**: *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri, diğer bakterilerin büyümesini engelleyen birtakım pigmentler üretir. En önemli pigment olan Pyocin (suda çözünür mavi) ve Pyoverdin (yeşil- sarımsı Pseudobactin olarak da adlandırılır) konak hücreler için toksiktir (Ravel and Cornelis 2003).

2.2.1.9 DNA topoizomerazın gen organizasyonu

Pseudomonas aeruginosa, son elli yılda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Guzzo *et al.* 1991). *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde biyosentez, katabolizma ve patojenite ile ilgili 200'den fazla gen tanımlanmıştır (O'Hoy and Krishnapillai 1987). *Pseudomonas aeruginosa*, genom G+C içeriği %65-47 olacak şekilde, değişken sayıda tek bir dairesel genom kromozom ve plazmitten oluşur. Kromozomun korunmuş bir merkezi ve değişken bir bileşeni vardır, bu da 5,2 ile 7 Mbp arasında değişen genom boyutları ile sonuçlanır (Şekil 2.5) (Grocock and Sharp 2002).

DNA giraz, GyrA ve GyrB geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Giraz ve Topoizomeraz IV'ün sentezi, hücre içindeki DNA süper-sargısının seviyesi tarafından kontrol edilir. Giraz promotörlerinin sistematik bir delesyon analizi; -10 konsensus bölgesini, transkripsiyon başlangıç noktasını ve genin ilk birkaç bazını içeren yaklaşık 20 baz çifti uzunluğundaki bir DNA dizisinin, DNA tarafından indüksiyon özelliğinden sorumlu olduğunu gösterir (Kureishi *et al.* 1994).



Şekil 2.5 *Pseudomonas aeruginosa* genomunun dairesel şekli (Stover *et al.* 2000)

2.2.1.10 DNA topoizomeraz enzim

DNA Topoizomerazları, DNA işlem süreçleri sırasında hücrenin topolojik homeostazını koruyan her yerde bulunan enzimlerdir. James C.'ye göre 'DNA Topoizomerazları, DNA evreninin sihirbazlarıdır', çünkü (Wang 2002)'a göre transesterifikasyonun zarif kimyasına bağlıdırlar. Bu enzimler, etki mekanizmalarına göre iki tipe ayrılır: Tip I (geçici tek sarmallı DNA kopmalarına neden olan) ve Tip II (kalıcı tek sarmallı DNA kopmalarına neden olan) (geçici çift sarmallı kopmalara neden olur). Gruplar IA ve IB'nin, geçici kovalent bağlar ya 5'- ya da 3'- ile ayırt edilir. IIA ve IIB türleri mekanik ve gelişimsel açıdan farklılık gösterir (Wang 2002). Herhangi bir tür, işlevsel değeri nedeniyle her türden en az bir enzime sahiptir. Her bir formdan birkaç Topoizomerazın varlığı, süper sarma, gevşeme, düğümleme/düğüm açma ve katener/ bozulmaya izin verirken, bazı fonksiyonlarında farklılıklar vardır. Örneğin *Escherichia coli*'de dört Topoizomeraz vardır: iki Tip I [Topoizomeraz (Topo) I ve Topo III] ve iki Tip II [Topoizomeraz (Topo) II ve III] (DNA giraz ve Topo IV). *İn vitro* yöntemlerle dört enzimin tümü DNA'yı gevşetebilir, ancak in vivo yöntemlerde ortaya çıkan durumlar daha özeldir. Örneğin giraz negatif süper- sargılar eklerken, Topo IV replikasyondan sonra bozulmadan sorumludur ve bunların tümü hücrenin hayatta kalması için önemlidir

(Champoux 2001). *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) genomunun, tek bir Tip I kodlayan Topo I gen = Rv3646c ve tek bir Tip II (giraz genler = Rv0006 (gyrA) ve Rv0005 (gyrB) Topoizomeraz enzimi bulunur. Bu, tüm bozulma, sakinleştirme ve aşırı sarma yükünü gerçekleştirir. Ek Topoizomerazlara sahip organizmalarda hücrenin hayatta kalması için tüm Topoizomerazlara gerek yoktur. Örneğin, *E. coli*'de Topo I, hayatta kalmak için gerekli değildir (Cole *et al.* 2014). Ancak, doygunluk mutagenezi deneyleri Mtb Topo I (MttopoI)'in hayatta kalmak için gerekli olduğunu göstermiştir (Wang 2002). Bu gereklilik, enzimin hücre içi seviyesinin azaltıldığı koşullu demonte suşlar yaratılarak oluşur. Enzimler, Mtb genomundaki sınırlı Topoizomeraz bileşimi nedeniyle in vivo'da ek roller gerçekleştirmelidir. Bu ek fonksiyonlar ve bunların farklı özellikleri, mikobakteriyel Topoizomerazlarla yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Cole *et al.* 2014).

(A) Tip I DNA topoizomerazlar

Ökaryotik tip I topoizomerazın (Topo I) gevşetme yeteneği, negatif süper sarmal DNA'nın keşfine katkıda bulunmştur. Enzim hem pozitif hem de negatif süper-sargıları gevşetebildiğinden, DNA replikasyonu sırasında sarmalın gevşemesi için gereken dönüşleri sağlayabileceği bilinmektedir. Birçok çalışmada, bunun gerçekten de enzimin hücredeki rollerinden biri olduğu ispat edilmiştir. Topo I için önerilen diğer özellik de transkripsiyon sırasında üretilen süper bobinlerin çıkarılmasıdır (De Silva *et al.* 2015).

DNA'da Topo I tarafından verilen tek iplikli kopmalar, bir fosfodiester bağının basit hidrolizi ile üretilemez çünkü süper bobin gevşemesi, enerji veren bir kofaktör içermez ve Topo I, katalitik olarak hareket edebilir. Bunun yerine, reaksiyon, bölünmeyi yeniden kapatmak için gereken enerjiyi koruyan bir ara aşamadan geçmelidir. Bu aşamalar; Adlandırma, sınıflandırma ve genel özellikler olarak sıralanabilir (Bhaduri *et al.* 1998). Yapısal hususlara dayanarak, Tip I topoizomerazlar, Tip IA, IB ve IC olmak üzere üç alt aileye ayrılır. Ayrıca, Tip IA alt ailesi, bölünme reaksiyonu sırasında DNA ucunun enzime kovalent olarak bağlanması bakımından IB ve IC alt ailelerinden farklıdır. Tip IA enzimleri, bir tirozin fosfodiester bağı yoluyla DNA'nın 5'ucuna bağlanırken, IA tipi

enzimler DNA'nın 5'ucuna bağlanır. Diğer iki alt aile DNA'nın 3'ucuna bağlanır (Kumar *et al.* 2012).

Plazmit DNA'larındaki negatif süper- sarmallar, Topoizomeraz I tarafından rahatlatılır, ancak bunlar pozitif süper-sargılar değildir. Bununla birlikte, gevşeme tamamlanmadığından, üründe bazı artık negatif süper bobinler kalır. Topoizomerazlar III, bir substrat olarak hipernegatif olarak aşırı sarılmış plazmit DNA'yı içerir ve gevşeme yine tam olarak gerçekleşmez (Aubry *et al.* 2006).

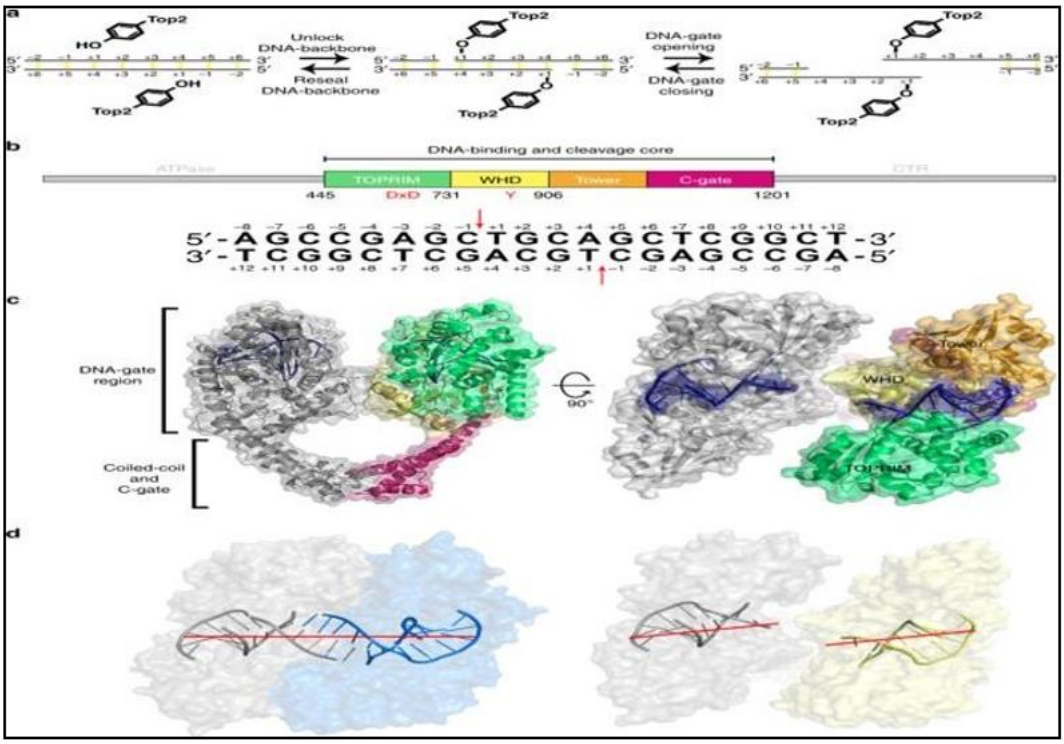
(B) Tip II DNA topoizomerazları

Tip IIA Topoizomerazlar (en II ler) ökaryotlarda ve bakteriler bulunan önemli DNA manipüle enzimlerdir (Wang 2002). Bu enzimler, iki DNA çiftinin geçişini yönlendirmek için ATP bağlanması ve hidrolize bağlı protein konformasyonel değişiklikleri kullanır, bu da DNA çaprazlamalarının topolojik inversiyonu ile sonuçlanır (Vos *et al.* 2011). Bu türün tek örneği çift yönlü DNA geçiş işlemi, replikasyon, transkripsiyon, kromozom ayrımı ve yeniden kombinasyon dahil olmak üzere hücresel DNA işlemleri sırasında molekül içi ve moleküller arası DNA karışıklıklarının çözülmesini sağlar (Franklin *et al.* 2011).

2.2.1.11 Tip II DNA topoizomeraz yapısı

Top II aracılı DNA topolojik transformasyonu, başka bir çift ipliğin (T-segmenti) taşınması için bir DNA segmentinde (G-segmenti) geçici bir DNA çift sarmal kırılmasının (DSB) yapılmasını gerektirir (Nitiss 2009). Bu temel DSB'yi üretmek için, iki katlı simetrik Top II ilk olarak WHD, kule ve TOPRIM alanları tarafından oluşturulan pozitif yüklü bir oluk aracılığıyla G-segmenti ile birleşir (Dong *et al.* 2014). WHD alanlarından bir çift katalitik tirozin daha sonra karşıt DNA zincirleri üzerindeki iki 4-bp'lik kademeli fosfodiester bağına saldırarak bir transesterifikasyon reaksiyonu başlatır ve sözde "DNA kapısı"nı barındıran "Top II bölünme kompleksi"ne yol açar. 5'-ucuna bağlı enzim ile klivaj G-segmenti içeren phosphotyrosyl, kovalent bir bağlantı oluşturur

(Schmidt *et al.* 2012). Şekil 2.6'da gösterildiği gibi ATP ile çalışan bir kapı (N kapısı) olarak işlev gören iki N-terminal ATPase alanı, T-segmentinin DNA kapısındandır (Wang 2002). Enzim daha sonra adımlarla bir sonraki katalitik döngü için sıfırlanır (Chen *et al.* 2013). Bunlar, sarmal bobin bağlayıcıya eklenen sarmal alan tarafından oluşturulan C-kapısı yoluyla T-segmentinin serbest bırakılmasını, transesterifikasyon reaksiyonunun tersine çevrilmesiyle bölünmüş G-segmentinin yeniden bağlanmasını ve N-kapısının yeniden açılmasını içerir.



Şekil 2.6 DNA kapısının açılmasını gösteren Top II klevaj kompleksinin yapısı (Wu *et al.* 2011)

A) Top II aracılı DNA kapısı, her ikisi de tersine çevrilebilen iki adımda açılır. G- segmentinin omurgalarını açmak için, Top II, bir çift katalitik tirozin ve 4-bp ayrı iki karşıt fosfodiester bağı arasındaki transesterifikasyon reaksiyonlarını katalize eder. Katalitik tirozin, bu işlem sırasında bir fosfotirozil bağı yoluyla +1 nükleotidin 5'- fosfatına bağlanır. 1 konumunda serbest bir 3′-OH vardır. Daha sonra enzim, T- segmentinin geçebileceği kadar

büyük bir kapı oluşturmak için bölünmüş G-segmentinin iki yarısını ayırır (Wu *et al.* 2011).

B) Üst panel: ökaryotik Top II'nin lineer etki alanı organizasyonu. Bu analiz, Top II'nin DNA bağlama ve bölünme çekirdeğine karşılık gelen hTop2core olarak bilinen orta parçayı kullanır. Kristalizasyon için kullanılan çift DNA, oklarla gösterilen bölünme yerleri ile alt sütunda görülmektedir (Schmidt *et al.* 2010).

C) Top II –DNA bölünme karmaşık yapısının dikey görünümleri. DNA mavi, bir Top II monomeri gri ve diğeri b'deki şemaya göre renklendirilmiştir.

D) Yeni yapıdaki (sağda) G-segmenti iki parçadır ve parçalar birbirinden ayrıdır. Buna karşılık, kapalı konformasyonda (solda), bölünmüş DNA uçları Watson-Crick baz eşleşmesi ile bağlı kalır. Kırmızı çizgiler, DNA çiftlerinin sarmal eksenlerini gösterir.

2.2.1.12 Farmasötik hedef olarak tip II DNA topoizomeraz

DNA Topoizomerazlarını hedefleyen antikanser ilaçlar normalde geri dönüşümlü bir şekilde bağlanır. Topoizomeraz tarafından bağlanmamış bölünmüş DNA zincirinin bir parçası serbest bırakıldığında, DNA'da hücre ölümüne yol açan kalıcı bir kırılma meydana gelir. Bu inhibitörlerin çoğu ya topoizomeraz I ya da II'yi hedeflerken, bazıları her iki enzimin etkisini de inhibe etme yeteneğine sahiptir. İki sınıf antibiyotik ilacı: kinolonlar ve kumarinler, bakteriyel girazı hedefler (Fisher 1981). Bu antibiyotikler, pnömoni, tüberküloz ve sıtma gibi çeşitli farklı hastalıklardan sorumlu bakterilerde DNA replikasyonu inhibisyonu ile çalışır. Tip I inhibitörleri, kampotesinler, irinotekan ve topotekan. Tip II inhibitörleri ise Amsakrin, etoposid fosfat, teniposid, aurintrikarboksilik asittir. Doksorubisin, idarubisin, epirubisin ve mitoksantron, Amerikan Mayasının kökünde doğal olarak bulunan alkaloidler olan epipodofilotoksinlerin yarı sentetik türevleridir (Fisher 1981, Yahr *et al.* 1998).

2.2.1.13 Tip II DNA topoizomeraz hedefli antibakteriyel ilaçlar

Antibiyotikler, konak organizmaya çok fazla zarar vermeden hedef patojeni öldürebilen veya inhibe edebilen daha geniş kemoterapötik ajanlar olarak gruplandırılabilir.

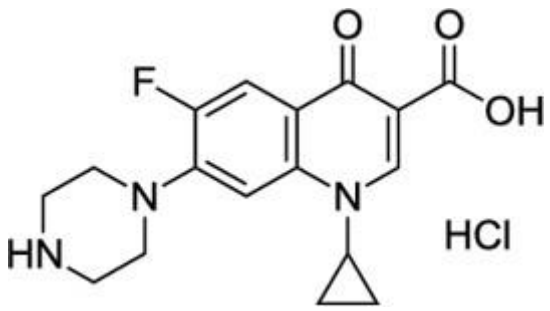
Aminokumarin grubu antibiyotikler DNA inhibitörleri olan Giraz enziminin inhibitörü olarak bilinir.

2.2.2 Antibiyotikler

2.2.2.1 Siprofloksasin

1. Siprofloksasinin kimyasal yapısı; Siprofloksasin, 1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4- okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolinkarboksilik asit ve 1-siklopropil-6-floro-1,4-'ten oluşan bir karboksilik asittir. Dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolinkarboksilik asitin moleküler ağırlığı 331,4 ve ampirik formülü C_{17} H_{18} FN_3 O_3, hafif sarı ile açık sarı renkli kristal bir malzemedir (Şekil 2.7) (Dong *et al.* 2014).

2. Eylem modu; Bakteriyel DNA replikasyonu, transkripsiyon, onarım ve rekombinasyon için gerekli olan Topoizomeraz II (DNA giraz) ve Topoizomeraz IV (her ikisi de Tip II Topoizomeraz) enzimleri Ciprofloksasin tarafından inhibe edilir.



Şekil 2.7 Ciprofloksasinin kimyasal yapısı (Dong *et al.* 2014)

2.2.2.2 Seftazidim

1. Seftazidimin kimyasal yapısı; Seftazidim, piridinyum-1-ilmetil ve [(2Z)-2-(2-amino- 1, 3-tiazol-4-il)-2-[(2-karboksipropan-2-yl) içeren üçüncü nesil bir Sefalosporin antibiyotiktir. Seftazidim konjugat asididir ve antibakteriyel bir madde olarak kullanılır.

2. Eylem modu; Seftazidim, çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı kapsamlı antibakteriyel etkiye sahip yarı sentetik bir üçüncü kuşak Sefalosporindir. Seftazidimin bakterisidal aktivitesine, diğer -laktam antibiyotiklerinki gibi, hassas bakterilerde belirli PBP'lerin doğrudan inhibisyonu aracılık eder (Fisher 1981). *E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii,* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi Gram negatif bakterilerde yapılan on vitro araştırmalar, Seftazidimin PBP1a/1b ve PBP2'ye daha az bağlanma ile büyük ölçüde PBP3'e bağlandığını ortaya koymuştur, PBP4 gibi diğer PBP'lere bağlanma belirlense de, gereken konsantrasyonlar klinik olarak elde edilenlerden oldukça yüksektir (Aparoy *et al.* 2012).

Seftazidimin PBP 1, 2 ve 3 bağlanan *Staphylococcus aureus,* önemli ölçüde daha düşük bir afiniteye sahiptir. Seftazidim PonA1, PonA2 ve PbpA, orta dozlarda *Mycobacterium* önlemektedir (Fisher 1981).

2.2.2.3 Amikasin

1. Amikasinin kimyasal yapısı; Amikasin, çeşitli bakteriyel hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir tür antibiyotiktir. İki taraflı enfeksiyonlar, karın içi enfeksiyonlar, menenjit, pnömoni, sepsis ve idrar yolu enfeksiyonları bunlara örnektir. Ayrıca birçok ilaca dirençli olan tüberküloz tedavisinde de kullanılır. IV yoluyla bir damara veya bir kas içine enjekte edilir (Huong *et al.* 2020).

2. Eylem modu; Amikasin, prokaryotik ribozomun 30S alt biriminin 16S rRNA'sına ve RNA'ya bağlanan S12 proteinine kalıcı olarak bağlanır, ribozomun yapısını değiştirerek protein sentezini inhibe eder ve mRNA kodonlarını doğru okumasını engeller. Ayrıca, yalpalama tabanı ile etkileşime giren tRNA antikodonunun alanını da engeller. Konsantrasyona bağlı bir etki mekanizmasına sahiptir ve alkali bir ortamda daha iyi performans gösterir. Amikasine duyarlı bakteriler, standart konsantrasyonlarda 24- 48 saat içinde reaksiyona girer (Tretter and Berger 2012).

2.2.2.4 Gentamisin

Gentamisin kimyasal yapısı; Gentamisin, *Micromonospora purpurea'*da bulunan ve 1963'te izole edilen bakterisidal bir aminoglikozittir. Geniş etki spektrumu, düşük maliyeti ve geniş bulunabilirliği nedeniyle, en sık reçete edilen aminoglikozitlerden biridir. Gentamisin, *Pseudomonas aeruginosa'*nın neden olduğu ağır gram negatif enfeksiyonların tedavisinde en etkili olmasına rağmen hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Chen *et al.* 2014).

2. Eylem modu; Aminoglikozitlerin hücrelere girişi üç aşamaya ayrılır. Tüm polikatyonik aminoglikositler örneğin Gram olarak lipopolisakkaritler ve fosfolipidler gibi bakteriyel hücre zarlarının negatif yüklü bileşenleri, elektrostatik negatif bakterilerin dış zar ve teikoik Gram + asitler ile fosfolipidler, başlangıçtaki "iyonik bağlanma fazını" başlatır. Bu bağlanma, iki değerli katyonların yer değiştirmesine ve membran geçirgenliğinin yükselmesine neden olarak aminoglikozit erişimine izin verir (Morimoto *et al.* 2019). Proton hareket kuvveti, aminoglikozitin sitoplazmaya girişinin ikinci "enerjiye bağımlı faz I"inde kullanılır ve bu, ana hücre içi hedefi olan bakteriyel 30S ribozomuna sınırlı miktarda aminoglikozit erişimine izin verir. Proteinler yanlış çevrilir ve bunun sonucunda sitoplazmik zar bozulur. Son olarak, "enerjiye bağlı faz II" aşamasında konsantrasyona bağlı bakteri ölümü bulunur. Bozulmuş sitoplazmik membran nedeniyle, aminoglikozid hücrede hızla birikir ve proteinin yanlış çevrilmesine ve sentez inhibisyonuna neden olur. Aminoglikozitler oksijene bağımlı aktif taşımaya ihtiyaç duydukları için anaerobik bakterilere karşı etkisizdir. Sonuç olarak, aminoglikozidlerin membran yırtılması ve azalmış protein sentezi nedeniyle hem ani hem de gecikmiş bakterisidal etkileri vardır; deneysel sonuçlar ve matematiksel modelleme bu iki mekanizmalı içeriği desteklemektedir (Hevener *et al.* 2018).

2.2.2.5 Penisilin G

1. Penisilin G'nin kimyasal yapısı; Penisilin G, çeşitli bakteriyel hastalıkları tedavi etmek için kullanılabilen bir tür antibiyotiktir. Zatürre, boğaz ağrısı, frengi, nekrotizan enterokolit, difteri, gazlı kangren, leptospirosis, selülit ve tetanoz bu hastalıkların

örnekleridir. Pnömokok menenjit için birincil basamak tedavi değildir. Penisilin, venöz veya kas enjeksiyonu ile uygulanır. Benzatin benzilpenisilin ve prokain benzilpenisilin, bir kas içine enjekte edilebilen iki uzun etkili penisilin grubudur (Huong *et al.* 2020).

2. Penisilin G. Yan etkileri: Genellikle kişiden kişiye farklı semptomlar görülse de aşağıda en sık karşılaşılan yan etkiler sıralanmıştır.

- İshal
- Nöbetler
- Alerjik reaksiyonlar (Huong *et al.* 2020)

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Örnek toplama

Bu çalışmada kullanılan örnekler 10 Ekim- 15 Kasım 2020 tarihleri arasında Çocuk ve Kadın Hastanesi ile Saint Raphael Hastanesinden temin edilmiştir. Toplamda farklı yaş ve cinsiyetten 100 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler; idrar, yara, yanık ve balgam sürüntülerinden oluşmaktadır.

3.1.2 Malzemeler

Çizelge 3.1'de laboratuvar ekipmanları ve menşei ülkeleri listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada kullanılan ekipmanlar

NO.	Aletler	Şirket	Menşei
1	Otoklav	Tekizava	Japonya
2	Ocak / Karıştırıcı	Biyokot	İngiltere
3	Kuluçka makinesi	Memmart	Almanya
4	Mikropipetler (Otomatik) (0,5-10 µL, 20-200 µL, 1000 µL)	Ejder laboratuvarı	Çin
5	Taşıma bezleri	AFCO	Ürdün
6	Elektron dengesi	Sartorius	Almanya
7	Güç kaynağı	Biyo-Kırmızı	ABD
8	UV ışık transminatörü	Bilge	ABD
9	Petri kabı	AFCO	Ürdün
10	Cam tüpler	Balıkçı	ABD
11	Derin dondurucu	Sanyo elektrik	Japonya
12	Su banyosu	Memmart	Almanya
13	Tava tüpü	AFCO	Ürdün
14	Parafilm	AFCO	Ürdün
15	96 oyuklu plaka	AFCO	Ürdün
16	Selüloz asetat membran filtrasyon Ünitesi (0,45 µm)	Chm	İspanya
17	Farklı boyutlarda Finn ipuçları (20 µL, 100 µL, 500 µL, 1000 µL)	Ependorf	Almanya
18	Manyetik karıştırıcı	Gallenkamp	İngiltere
19	Fırın	Memmart	Almanya
20	Ph ölçer	Sartorius	Japonya

3.1.3 Kimyasallar

Bu çalışmadaki kimyasalların listesi Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasalların listesi

No.	Kimyasallar	Menşei
1	Siprofloksasin	İtalya
2	Seftazidim	İtalya
3	Antibiyotik	İtalya
4	Amikozit	Türkiye
5	Penisilin G	İtalya
6	Etil alkol	BAE
7	Metil kırmızısı	İngiltere
8	İyot	İngiltere
9	Gram boyama	İngiltere

3.1.4 Ortamlar

3.1.4.1 Kullanıma hazır kültür besiyeri

Çalışmada kullanılan ortamlar ve menşei ülkeleri Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ortamlar

No.	Ortam	Menşei
1	Besin Agar	Hindistan
2	Besin Suyu	İtalya
3	Moler Henton Agar	İngiltere
4	Setramid Agar	İtalya
5	Brean Sert Agar	Hindistan

3.1.4.2 Laboratuvarda hazırlanan besiyeri

Laboratuvarda hazırlanan besiyeri Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Laboratuvarda hazırlanan besiyeri

No.	Bileşikler	Ağırlık
1	Gliserol	10 mL
2	Agar	250 g
3	Arıtılmış su	1500 mL
4	$BaCl_2$, $2H_2O$	2 mL
5	H_2SO_4	2 mL

Bileşenler distile suda çözülerek, pH 7,2 – 7,4 olacak şekilde 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Bu ortamlar bakteriler tarafından üretilen pigment piyosianini tespit etmek için kullanılır.

3.1.5 Bakteri tanımlaması için kimyasallar ve çözeltiler

- Katalaz enzimi reaktif; %3 konsantrasyonda hidrojen peroksit kullanılır.
- Oksidaz diski (Collee *et al.* 1996); Kullanıma hazır diskler şeklindedir.
- Kovac reaktifi (Collee *et al.* 1996); Kullanıma hazır çözücü şeklindedir.
- Gram boyama; (Collee *et al.* 1996)'da belirtilen prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır. Metil kırmızısı; hazırlanma prosedürü Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Metil kırmızısı göstergesi

No.	Bileşikler	Ağırlık
1	Metil kırmızısı	0,02 g
2	Etil alkol	60 mL
3	Suyu damıtmak	40 mL

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hesaplamalı çalışmalar

3.2.1.1 Yapısal temelli ilaç tasarım programları ve veritabanları

Her program veya veri tabanı farklı bir amaç için kullanılmıştır.

- Temel Genler Veri tabanı: Hücre için hayati olan ana geni ortaya çıkarmak için kullanılmıştır (Zhang *et al.* 2004).
- Pseudomonas Genom Veri Tabanı: Bakterilerin genomik çalışması için kullanılmıştır (Winsor *et al.* 2016).
- Uniprot KB Veri tabanı: Protein bilgisi için kullanılmıştır (Apweiler *et al.* 2004).
- İsviçre Model sunucusu: *P.aeruginosa*'nın DNA giraz alt birimi A'nın bir modelini oluşturmak için kullanılmıştır (Biasini *et al.* 2014).
- Qmean sunucusu (Benkert *et al.* 2011).
- Swissdock: Moleküler yerleştirme amaçları için kullanılmıştır
- Chemicalize sunucusu: Tasarlanan moleküllerin farmakofor kinetiği için kullanılmıştır
- Discovery Studio yazılımı v.2.5: Çoklu ilaç tasarımı ve biyoinformatik amaçları için kullanılmıştır.

3.2.1.2 Bakteriyolojik çalışma

Bu çalışmada 10 Ekim 2020 ile 15 Kasım 2020 tarihleri arasında 100 örnek toplanmış ve 89 izolatta Pseudomonas aeruginosa teşhis edilmiştir. Hastaların bakımı Kadın ve Çocuk Hastanesi ile Saint Rafael Hastanesi'nde yapılmıştır. 89 izolatın; 31 erkek ve 58 kadındır. Numuneler, pürülan yanık deriden steril pamuklu çubuklar kullanılarak toplanmıştır. Örnek alınmadan önce yanık yaraları normal tuzla temizlenmiştir. Alınan örnekler 5 mL steril besin suyuna aktarılarak laboratuvara nakledilmiştir.

3.2.1.3 Bakterilerin tanımlanması

Kültür beyin kalp infüzyon suyu, beyin kalp Agar, besleyici agar, Mueller H agar ve setrimit agar bakteriyel izolasyon ve tanınması için kullanılır. Bunun için 37°C'de plakalar gece boyunca inkübe edilir. Eski kolonilerde gelişme, renk ve hemoliz oluşumu gözlemlenmiştir.

3.2.1.4 Bakteriyel karakterizasyon

Bakteriyel izolatlar, şematik bir diyagram kullanılarak tanımlanmadan önce bir dizi kültürel ve biyokimyasal deneye tabi tutulmuştur (Collee *et al.* 1996).

3.2.1.5 Mikroskobik muayene

Gram boyama; gram boyama reaksiyonunu petri kabının halkalı bölgesine su konulması ile başlatılır. Az miktarda bakteri suda çözülür ve dağılır. Yayma, lam yakıcı alevlerden hızla geçirerek üç kez ısıyla sabitlenmeden önce havayla kurutulur.

3.2.1.6 Biyokimyasal test

Katalaz testi

Bu testin amacı, söz konusu bakterinin hidrojen peroksiti zararsız oksijen ve suya dönüştüren bir enzim olan katalaz oluşturup oluşturamayacağını görmektir. Birkaç tek koloni mikroskop lamına tahta bir çubuk kullanılarak taşınır. Ardından birkaç damla %3 hidrojen peroksit eklenir. Katalaz aktivitesi, gaz kabarcıklarının oluşumu ile tespit edilir. (Collee *et al.* 1996).

Kan hemoliz testi

Bu test bakterilerin hemolizin üretme kapasitesine sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Bakteriler kanlı agar üzerinde ekildikten sonra 37°C'de 48 saat inkübe edilir. Yeşil rengin görünümü hemolizin oluşumunu gösterir (Collee *et al.* 1996).

Oksidaz disk testi

Bu test, bakterilerin sitokrom C oksidaz üretme kapasitesine sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Kullanıma hazır diskler bir cam slayt üzerine konur ve sterilize edilir. Daha sonra birkaç tek taze koloni yerleştirilir; rengin maviye veya mora geçişi olumlu bir sonuç olduğunun göstergesi olarak kabul edilir.

Hareketlilik testi

Motilite ortamı içeren tüpler bir kez aşılama iğnesi ile ortasından çizilir, ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Hareketli bakteriler aşılama hattından yayılmaya başlar (Collee *et al.* 1996).

Üreaz testi

Üre agar slantı, tüm slant yüzey üzerine kapsamlı bir şekilde aşılandıktan sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilir. Mor-pembe renk oluşumu testin pozitif olduğunun göstergesidir.

İndol testi

İzolatlar tripton suyuna aşılanır ve 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Kovac reaktifi (0,5 mL) doğrudan kültür tüpüne eklenir. Besleyici agar üzerindeki bakteriler 42°C'de 18 ile 24 saat inkübe edilir. Büyümenin olması sonucun olumlu olmasının göstergesidir (Collee *et al.* 1996).

3.2.1.7 Biyokimyasal tanımlama için API 20 E sistemi

Gram negatif bakterilerin tanımlanması için MacConkey'nin agar plakalarından izole edilen koloniler, API 20 E mikro tüp sistemi kullanılarak test edilir. Bu sistem, kaplama ortamı üzerinde tek bir koloniden 89 standart biyokimyasal test performansı için tasarlanmıştır. Her test, uygun substrat içeren ve geçirimsiz bir plastik şeride (galeri) yapıştırılmış steril bir plastik mikro tüp içinde gerçekleştirilir. Her galeri 20 mikro tüp içerir (her biri bir tüp ve bir kupule bölümü içerir). Bu sisteme dahil olan biyokimyasal testler şunlardır:

- Beta- galaktosidaz testi ONPG.
- Arginin dihidrolaz testi ADH.
- Lizin dekarboksilaz testi LDC.
- Ornitin dekarboksilaz testi ODC.
- Sitrat kullanım testi CIT.
- Hidrojen sülfür testi H2S.
- Üreaz testi Ure.
- Triptofan deaminaz testi TDA.
- Indol testi IND.
- Voges prokaver testi VP.
- Jelatinligue hizip testi Gel.
- Glikoz fermantasyon testi Glu.
- Mannitol fermantasyon testi Man.
- İnositol fermintasyon testi INO.
- Sorbitol fermantasyon testi SOR
- Rhammnoz fermantasyon testi RHA.
- Sukroz fermantasyon testi SAC.
- Meliboz fermantasyon testi MEL.
- Amygdalin fermantasyon testi AMY.
- Arabinoz fermantasyon testi ARA.

Yukarıda sıralanan 20 test, üretici firma talimatlarına göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Bakteriyel süspansiyon için galerilerin hazırlanması İnkübasyon sırasında nemli bir atmosfer sağlamak için inokülasyon tepsisine 5 ml musluk suyu konulur.

2. Hazırlık ortamından iyi izole edilmiş koloni bir alev beki kullanılarak tüpün kenarına sürttürülür ve 5 mL steril damıtılmış su ile iyice karıştırılır.

3. Galerilerin aşılanması; Yirmi mikro tüp, bir seri pipet ile aşılanır. Üretici talimatlarına göre CIT, VP ve GEL mikro tüplerinin, tüp ve kupule bölümü doldurulur. İnokülasyondan sonra ADH, LDC, ODC, H2S ve URE mikro tüplerinin kupule bölümü tamamen steril mineral yağ ile doldurulur.

4. Galerilerin kuluçkalanması; Aşılamadan sonra, plastik kapak tepsinin üzerine yerleştirilir ve galeriler 37° C'de 18 ile 24 saat boyunca inkübe edilir.

5. Galerilerin okunması için kKarşılık gelen mikro tüplere aşağıdaki reaktifler eklenir:

- TDA mikro tüpüne bir damla %3,4 ferrik klorür.
- IND mikro tüpüne bir damla Kovasc reaktifi.
- VP mikro tüpüne bir damla Voges-proskaver reaktifi.
- H_2S veya ONPG mikro tüpüne bir damla Oksidaz reaktifi.

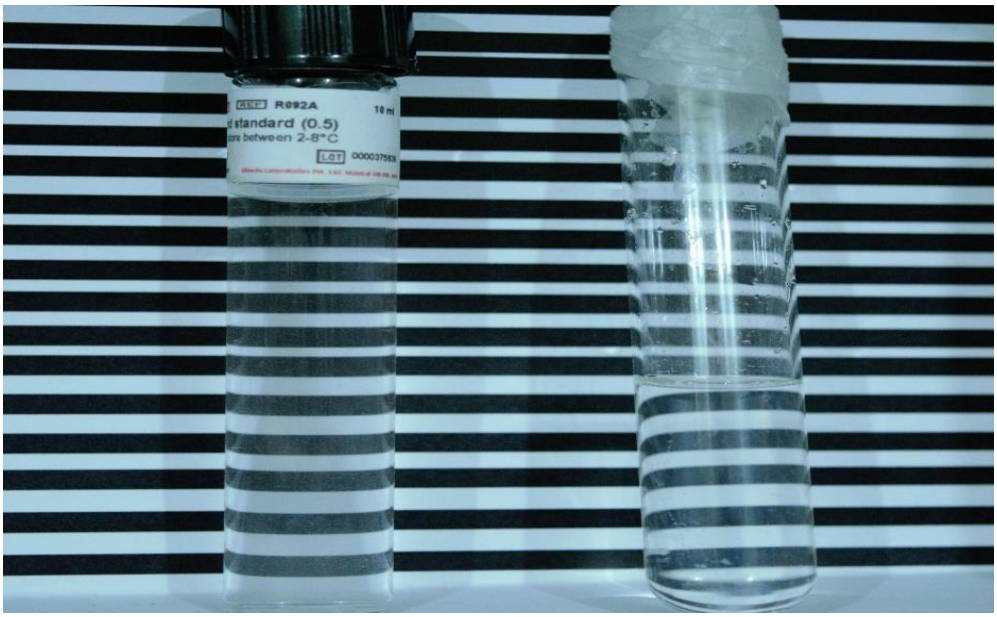
3.2.1.8 Antibiyotik duyarlılık testi

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık ve dirençleri, prosedüre uygun olarak Kirby Bauer yöntemine göre yapılmıştır. Satın alınan 5 adet antibiyotik içeren diskli Mueller-Hinton agar plaklarında disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. CLSI rehberliğine dayanarak İnhibisyon bölgesinin çapı için yapılan

ölçümler, *Pseudomonas aeruginosa'*nın çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlı, bağışıklık ve ara kalıpları olarak yorumlanmıştır (Chen *et al.* 2014).

3.2.1.9 McFarland standartları

McFarland standartlarını yapmak için, %1 Sülfürik asit (H_2So_4) ve %1,175 Baryum ($BaCl_2$, $2H_2O$) çözücüleri kullanılmıştır (Chen *et al.*2014). Bakteri süspansiyonu yapmak için, 5 mL steril su içine birkaç tek koloni damlatılmıştır. 0,5 McFarland çözeltisi ile bulanıklık spektrofotometrik olarak tahmin edilmiştir (Şekil 3.1). Soğurma değeri 0,8 – 0,13 CFU / mL olmalıdır.



Şekil 3.1 0,5 McFarland standartları

3.2.1.10 Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) plakası hazırlama

96 kuyulu tek kullanımlık steril bir plastik mikrodilüsyon plakası kullanılmıştır. Sentezlenen bileşikler DMSO çözücü içinde çözülerek her defasında 0,5- 1024 µg /mL arasında değişen seri seyreltmeler yapılmıştır. Muller Hinton agar, sentezlenmiş bileşik ve bakteriyel inokulum süspansiyonu, zincirdeki her kuyuda (50 µL) aktarılmıştır. Ticari antibiyotik olarak Siprofloksasin, Seftazidim, Gentamisin, Amikasin ve Penisilin ve

kontrol olarak DMSO çözücüsü kullanılmıştır. Mikrodilüsyon Levha kapatılarak 24 saat boyunca 7° C'de inkübe edilmiştir. En son okuma yapılmıştır. Bir antibakteriyel maddenin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC), çıplak gözle görüldüğü gibi incelenen bakterilerin simüle büyümesini önleyen en düşük konsantrasyon olarak karakterize edilir (Chen *et al.* 2014).

3.2.1.11 Duyarlılık testi (Agar kuyusu difüzyon yöntemi)

Bakteri aşı süspansiyonu ($1,5x10^8$ CFU/mL), bulanıklık için (0,5) McFarland standart solüsyonundan türetilmiştir ve agar kuyusu difüzyon sürecinde kullanılmıştır. Sürme işlemiyle, Muller Hinton agar plakalarını bakteri süspansiyonu ile aşılamak için sterilize edilmiştir. Fazla nem, sterilize edilmiş bir başlıkla havayla kurutularak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kuyucuklar 50 µL doldurularak 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir (Pfoze *et al.* 2011).

3.2.1.12 İzolatların korunması

1. Kısa süreli depolama; Bakteri kolonileri, beyin-kalp infüzyon ortamının yüzeyinde yetiştirilerek, daha sonra Parafilm'e sarılarak ve 4°C'de saklanarak birkaç hafta canlı tutulmuştur

2. Orta vadeli depolama; Bakteri kolonileri, besleyici agar eğik besiyerinde sürme yoluyla birkaç ay canlı tutulmuştur. Ortamı hazırlamak için 10- 15 mL vidalı kapaklı şişeler kullanılmıştır. İzolatlar, 37°C'de 24 saat inkübe edilmeden önce slanta sürme yöntemiyle sürülmüştür. Daha sonra şişeler plastik sargı ile kaplanarak ve 4°C'de tutulmuştur.

3. Uzun süreli depolama; Bakteri izolatları 3 mL beyin kalbi ve %15 gliserol içeren steril tüpler kullanılarak uzun süre korunmuştur. Daha sonra -20°C'de dondurulmadan önce 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 In Siliko Çalışması

4.1.1 Hedef hazırlama

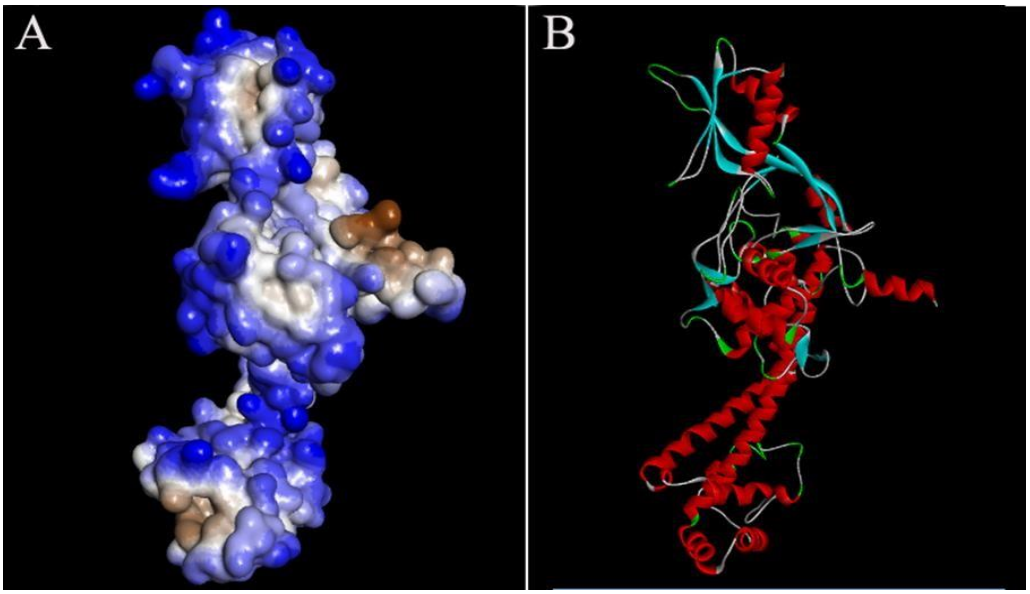
4.1.1.1 Hedefin belirlenmesi

Pseudomonas aeruginosa'nın 5567 farklı proteini olduğundan, belirli patojenler için spesifik ve gerekli olan önceden karakterize edilmiş proteinler arasında ilaç hedefi aranır (Frazier and Champney 2012). Bu nedenle hedef belirleme patojenin büyümesi, replikasyonu, canlılığı veya hayatta kalması için esas olmalıdır. *Pseudomonas aeruginosa* genomunda tanımlanan temel genleri belirlemek için Temel Genler Veritabanı (DEG) web sitesi kullanılmıştır (Zhang *et al.* 2008). Topoizomeraz enzimi; bu tür replikasyon, transkripsiyon, biyolojik süreçlerde DNA manipülasyonu, rekombinasyon ve tamiri gibi hücre yaşamı için gereklidir. Topoizomeraz, çift sarmalda çift sarmal kırılmaları yaparak DNA topolojisini korur (Champoux 2001).

Beta *Pseudomonas*, Topoizomeraz genini (parC ve pare) tanımlamak için kullanılmıştır (Winsor *et al.* 2016). Her iki gen de *Pseudomonas aeruginosa* genomunun 3556427 – 3559198 pozisyonunda lokalizedir. Gen, DNA topoizomeraz enzimine eksprese edilir. Ayrıca UniProtKB web sitesi topoizomerazı tanımlamak için kullanılmıştır (Apweiler *et al.* 2004). Enzim birincil diziye sahip olduğu için Metiyonin ile başlayan ve Glutamik asit ile biten 920 amino asit uzunluğundadır. Protein, birincil protein dizisinin 120 pozisyonunda Tirozin amino asidi bakımından zengin olan özellikle aktif bir bölgeye sahiptir. Aktif bölge etkileşiminde, O-(5'-fosfo-DNA)-tirozin ara maddesi, birincil dizi ve Topoizomerazın tanımlanmış aktif bölge konumu ile karakterizedir. Bu nedenle, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşunun bu enzimi, hedef olarak belirlenen hedef protein dizisi olarak seçilmiştir.

4.1.1.2 Homoloji modelleme

Topoizomeraz alt birimi A henüz kristalleştirilmemiştir ve henüz 2D NMR çalışması da yapılmamıştır. Bu nedenle homoloji modelleme bir sonraki tercih olarak önerilmektedir. Protein yapı homoloji modellemesi, deneysel yapılar mevcut olmadığında proteinler için 3B modeller oluşturmak için rutin bir teknik haline gelmiştir. Sorgu proteini, şablon dizileri olarak en özdeş proteinlerle karşılaştırılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa'*nın topoizomeraz alt birimi A'nın 3D modelini başlatmak için Swiss-Model sunucusu kullanılmıştır (Şekil 4.1) (Biasini *et al.* 2014). Burada A; hidrofobiklik yüzeyli protein modelini, B ise ikincil yapıya sahip protein modelini göstermektedir.

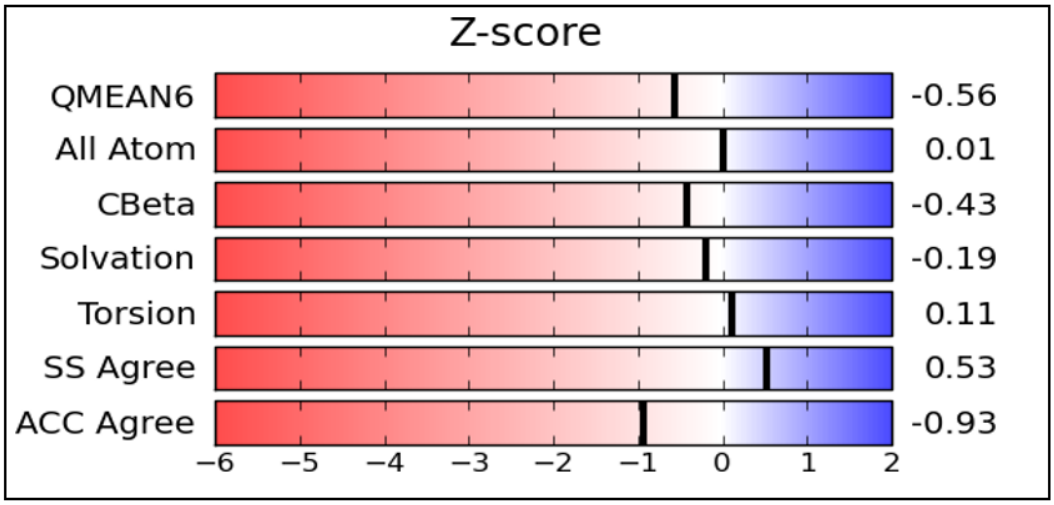


Şekil 4.1 DNA giraz alt birimi A protein modellemesi Swiss-Model sunucu

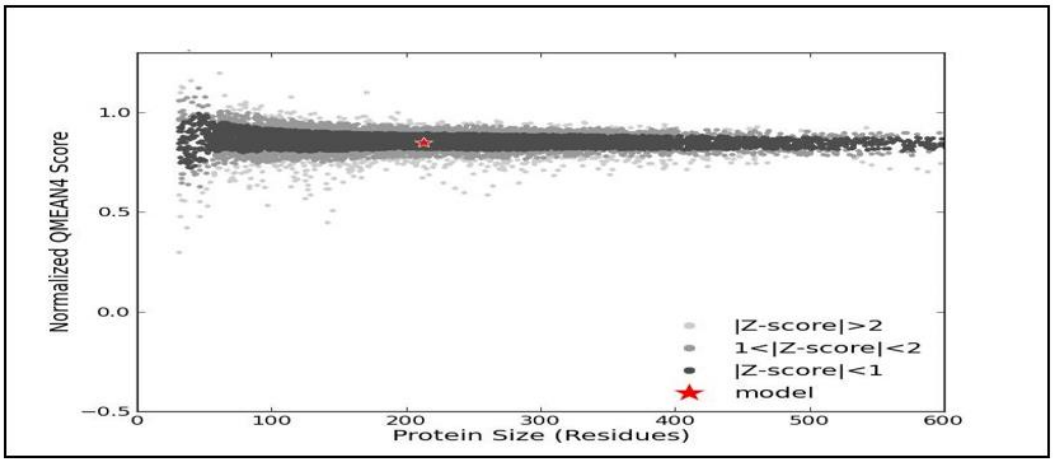
Soru dizisi, O67108, P0AES4, P9WG47 ve P37411 şablon proteinleri (Protein Veri Bankası sunucusundaki farklı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının topoizomeraz A alt biriminin kodları) kullanılarak modellenmiştir. Kimlik puanı sırasıyla %80, %72, %77 ve %69 olarak tespit edilmiştir. Aktif sitede, 120 pozisyonunda tirozin amino asit poz cebi açıkça görülmektedir.

Modellenen protein yapısının model değerlendirme analizi, protein yapılarının kalite değerlendirmesi; deneysel yapı doğrulamasının önemli bir parçası olduğundan ve protein

yapısı tahmininde çok önemli bir rol oynadığından, QMEANS sunucusu tarafından yapılmıştır (Benkert *et al.* 2011). Daha yüksek QMEAN Z-skor değeri, tahmin edilen özelliklerle daha iyi uyum anlamına gelir (Benkert *et al.* 2011). QMEANS değeri (-0,56), Torsion of Phi ve Psi (0,11), ikincil yapı uyumu (SS Kabulü) (0,53) ve son olarak solvent erişilebilirlik anlaşması (ACC Kabul) (-0,93) olmuştur. Z-skor değeri de Şekil 4.3'te 0,9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.2 Güvenilir topoizomeraz alt birim A modeli için toplam Z-skoru

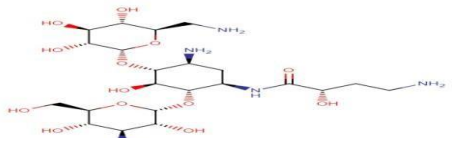
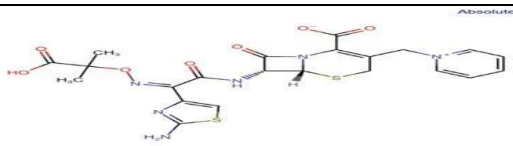
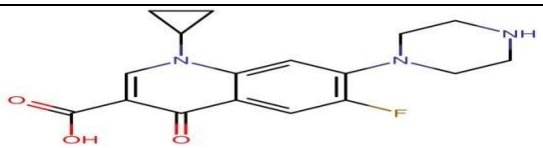
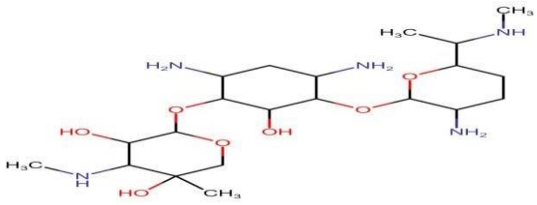
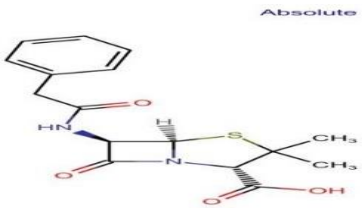


Şekil 4.3 Protein modelinin istatistiksel potansiyelleri Z-skoru

4.1.2 Molekül tasarımı

Topoizomeraz alt birimi A'nın homoloji modellemesinden ve aktif bölgenin görselleştirilmesinden sonra, 5 molekül (Siprofloksasin, Seftazidime, Gentamasin, Amikasin ve Penisilin) aktif bölgedeki tirozinin yan zincirine uyacak şekilde tasarlanmalı ve alt ile etkileşime girmeli ve bağlanmalıdır. Bu en iyi fonksiyonel grupların doğru pozisyonda moleküllerin oryantasyonu ve uygunlukları ile başarılabilir. Ortaya çıkan yönelim ile aromatik halka ve hidroksil grubu ile kuyruklu Topoizomeraz alt birimi A'nın aktif bölgesindeki tirozin amino asidinin yan zincirini oluşturur. 5 molekül, Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi, farklı oryantasyonlara sahip farklı fonksiyonel gruplar dahil edilerek, tirozinin yan zincirinin özelliklerini ve aktif bölgenin konformasyonunu kullanmaktadır.

Çizelge 4.1 Tasarlanan moleküllerin sembolleri ve kimyasal yapıları

Molekül Adı	Kimyasal yapı
Amikasin	
Seftazidim	
Siprofloksasin	
Gentamasin	
Penisilin	

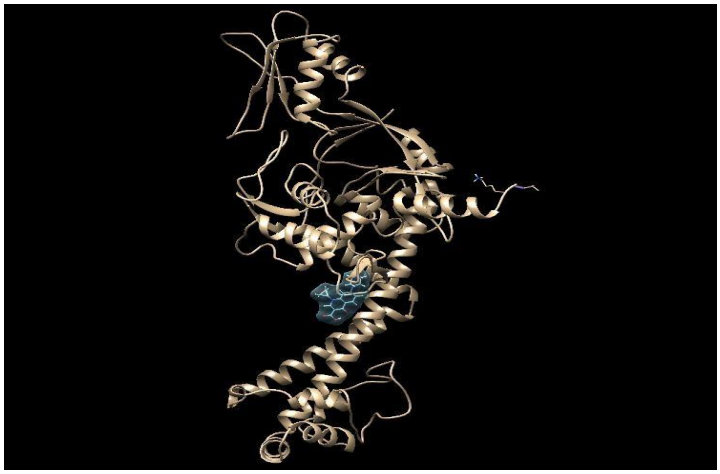
4.1.3 Moleküler yerleştirme

5 molekülün tümü, topoizomeraz alt birim A modelinin aktif bölgesine bağlanma afinitesini tahmin etmek için swiss dock server tarafından docking bir logaritmasına tabi tutulmuştur. Yerleştirme sonuçlarından birçok parametre de dahil olmak üzere bağlanma afinitesi, toplam bağlanma enerji ve tam uygunluk tahmin etmek için kullanılabilir. Başarılı tasarlanmış molekülleri tanımlamak için ana kriterler olarak toplam bağlanma enerjisi, tam uygunluk ve ΔG kullanılmıştır. Moleküler yerleştirme, bir bileşiğin bir proteinin aktif bölgesine nasıl bağlanacağını belirleyen otomatik bir bilgisayar algoritmasıdır. Bu, tasarlanan moleküllerin yönelimini ve konumunu belirlemeyi, konformasyonel geometriyi ve puanlamanın bir bağlayıcı enerji olabileceğini içermektedir. Moleküler kenetlenme işleminin otomatik hesaplanması yapılarak tasarlanan 5 molekülün tümü için moleküler kenetlenmenin sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

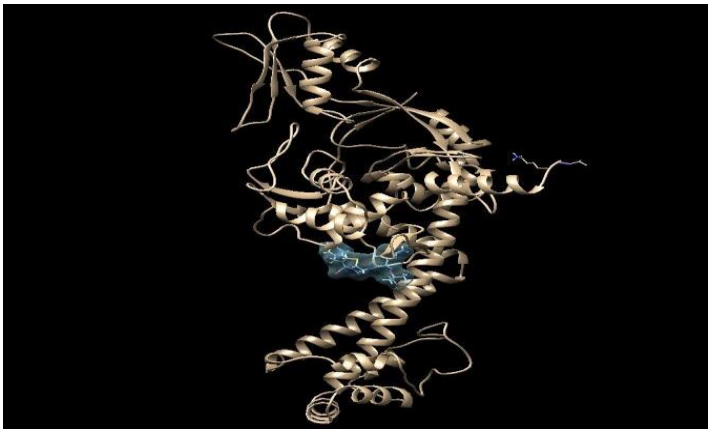
Çizelge 4.2 Tasarlanan moleküllerin moleküler yerleştirme sonuçları

Molekül sembolü	**Toplam bağlama Enerjisi (kcal/ mol)**	**Tam Fitness (kcal/ mol)**	**Tahmini ΔG (kcal/ mol)**
Siprofloksasin	-53,1	-2720	-7,1
Seftazidim	-32,5	-2864	-8,7
Gentamasin	-7,7	-2838	-7,9
Amikasin	-1,3	-2796	-7,9
Penisilin	71,2	-2700	-6,3

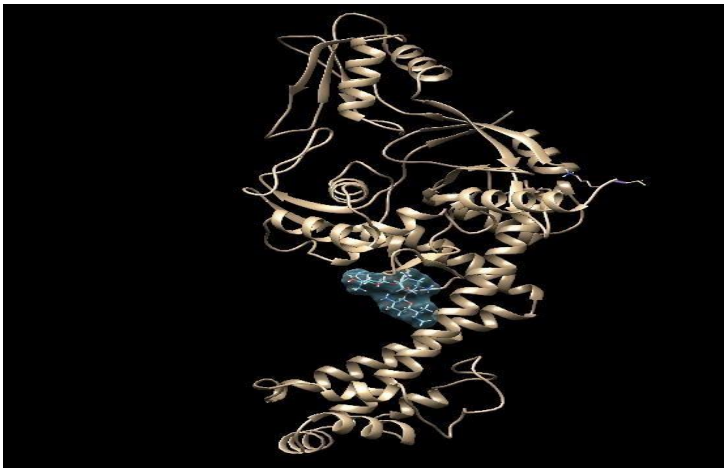
Çizelge 4.2, penisilinin hedef proteinin aktif bölgesinde tirozin amino asidinin yan zincirine bağlanmak için en düşük bağlanma enerjisine (71,2 kcal/mol) sahip olduğunu göstermiştir. Bu arada, Siprofloksasin en yüksek bağlanma enerjisini (-53,1 kcal/mol) sahip olmuştur. 5 molekülün tüm yerleştirmeleri Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



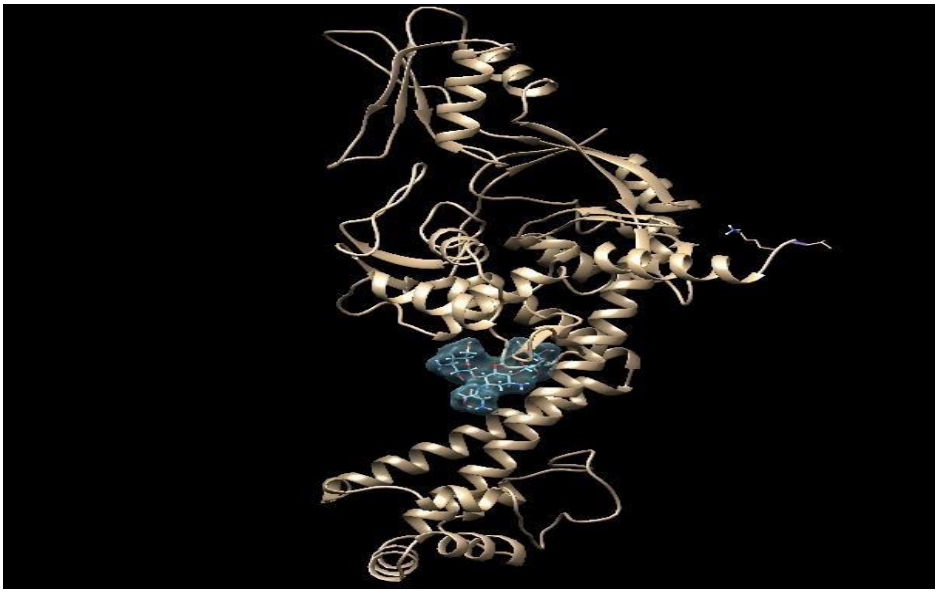
Şekil 4.4 Siprofloksasin’in moleküler yerleştirilmesi



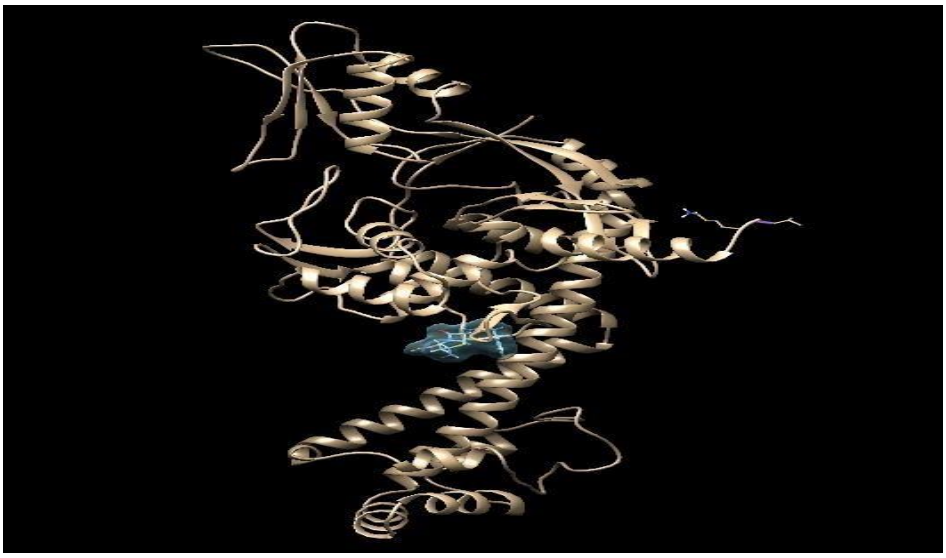
Şekil 4.5 Seftazidim’in moleküler yerleştirilmesi



Şekil 4.6 Gentamisin'in moleküler yerleştirilmesi



Şekil 4.7 Amikasi'nin moleküler yerleştirilmesi



Şekil 4.8 Penisilin'in moleküler yerleştirilmesi

Yerleştirme simülasyonları, bağlanma serbest enerjisi, tam uygunluk, Gibbs enerjisi (ΔG) ve standart inhibitör olarak hidrojen etkileşimi miktarı değerlerinin karşılaştırılmasıyla iyi bir göstergenin olabileceğini göstermiştir (Çizelge 4.1).

Topoizomeraz alt birimi A'nın aktif bölgesinin Tirozin 120 pozisyonunun amino asit kalıntılarının yan zinciri ile düşük bağlanma enerjisi, ΔG değeri ve hidrojen

etkileşimlerinin sayısı ile karakterize edilen güçlü bir kompleks yaratmıştır. Yerleştirme simülasyon sonuçlarına göre; Siprofloksasin Topoizomeraz enzimi için en yüksek potansiyel inhibitöre sahiptir ve bloke edebilir. Bunu sırasıyla orta düzeyde bloke etme kabiliyeti ile Seftazidim, Gentamisin ve Amikasin takip etmektedir. Son olarak, Penisilin, hedef enzime bağlanma ve hedef aktif bölgeyi bloke etmede ve bakteri büyümesini inhibe etmede başarısız olmuştur.

4.2 Bakteriyel Çalışma

4.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve tanımlanması

4.2.1.1 İzolasyon ve kimlik doğrulama

Çeşitli enfeksiyon bölgelerinden alınan toplam 100 örnek toplanmıştır. Oksidaz ve Katalaz testleri kullanılarak *Pseudomonas* cinsine ait 93 izolat elde edilmiştir. Toplam 89 *Pseudomonas spp*. izolatından *Pseudomonas aeruginosa* olduğundan emin olunan 89 izolat seçilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa'*nın tanımlanması bir dizi kültürel ve biyokimyasal çalışmayla gerçekleştirilmiştir. Bakteri kolonileri, laktozla fermente edilmiş ve fermente edilmemiş bakteriler arasında ayrım yapan MacCkonky agar besiyerinde yetiştirilmiştir. Soluk renkli bakteri kolonileri laktozu fermente etme eğilimindedir. Duguid *et al.* tarafından belirtildiği gibi Agar ortamında kan üzerinde büyümüş bakteriyel kolonilerin büyümesi, hemoliz gösteren kan hücrelerinin dejenerasyonu, motilite, pyosianin üretimi, beyin kalp infüzyon suyunda büyüme gibi seçici ortamlarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümeleri tespit edilmiştir.

Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa*, biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmıştır ve şematik diyagram Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının; oksidaz, katalaz, hemoliz, büyüme, üreme, motilite, gram boyama, king's besiyerinde piyosianin sentezi, üçlü şeker, indol ve üreaz çalışmaları için pozitif olduğu tespit edilmiştir

Çizelge 4.3 Bakteriyel izolatların biyokimyasal testleri

Biyokimyasal Test	**Sonuçlar**
Katalaz testi	Pozitif
Gram lekesi	Negatif
Büyüme	Pozitif
Üreme	Pozitif
Setrimide agar üzerinde yetiştirilen	Pozitif
Hemoliz	Negatif /Pozitif
Hareketlilik	Pozitif
Oksidaz testi	Pozitif
Pyicianin üzerinde Kral ' ın orta	Pozitif
Üçlü şeker testi	Negatif
Üreaz testi	Negatif

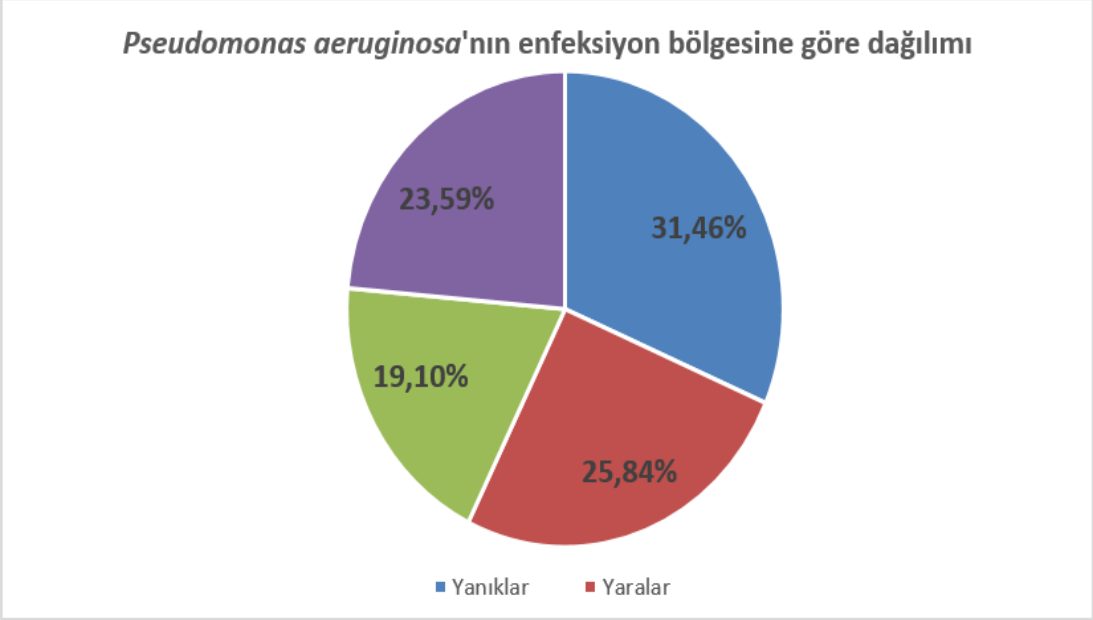
API20 E testleri, tanımlamaların doğruluğunun tespiti için yapılmıştır. API20 E strep sistemine dahil edilen biyokimyasal testler ve sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.4 API20 E test sonuçları

Sembol	**Negatif sonuçlar**	**Pozitif sonuçlar**
Onpg	Renksiz	Sarı
Adh	Sarı	Kırmızı portakal
Eagü	Sarı	Kırmızı portakal
Odc	Sarı	Kırmızı portakal
Cıt	Sarı	Yeşil mavi
H2s	Renksiz	Siyah
Üre	Sarı	Kırmızı portakal
Tda	Sarı	Koyu kahverengi
Ind	Sarı halka	Kırmızı yüzük
Vp	Renksiz	Pembe kırmızı
Jel	Leke yaymaz	Siyah leke yayılması
Glu	Mavi	Sarı
Man	Mavi	Sarı
Ino	Mavi	Sarı
Sor	Mavi	Sarı
Sac	Mavi	Sarı
Mel	Mavi	Sarı
Amy	Mavi	Sarı
Ara	Mavi	Sarı

4.2.1.2 İzolatların enfeksiyon kaynağına göre dağılımı

Pseudomonas aeruginosa'nın dağılımı enfeksiyon bölgesine bağlıdır. Şekil 4.9 incelendiğinde yanıklar etrafında bulunan izolatlarda (%31,46) yüksek oranda enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Bu arada, yara izolatlarında bu oran %25,84, diğer enfeksiyon kaynaklarından İYE'de %19,10 ve balgamda %23,59 oranında bulunmuştur. Toplanan 100 örneğin %25 yara %15'ini ise balgam sürüntüleri oluşturmaktadır. İYE numuneleri diğer numunelere göre daha düşük bir *Pseudomonas aeruginosa* yüzdesine sahiptir. *Pseudomonas aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarının %16'sından sorumludur (Van Delden and Iglweski 1998). Bakterilerin çeşitli insan bölgelerini istila etme ve enfeksiyonları indükleme yeteneğinin yanı sıra bakteriyel virülans faktörlerinin dokuya nüfuz etme ve kan dolaşımına sızma ve insan vücudunun diğer bölgelerine ulaşma yeteneği, *Pseudomonas'ın* heterojenliği ve artan dağılım yüzdesi ile ifade edilebilir (Fleiszig *et al.* 1997).



Şekil 4.9 *Pseudomonas aeruginosa*'nın enfeksiyon bölgesine göre dağılımı

Çizelge 4.5'de farklı klinik örneklerden alınan sürüntü ve idrar örneklerinde tespit edilen bakteri türleri bulunmaktadır. Bu çizelge incelendiğinde toplamda 11 *Pseudomonas aeruginosa* haricinde bakteri türleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı klinik örneklerden alınan izolatlarda tespit edilen bakteri türleri

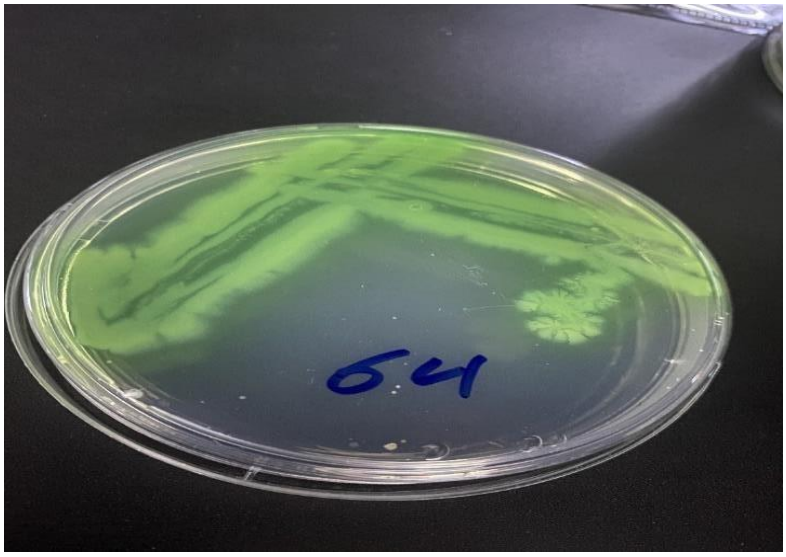
Örnek kaynağı	Numune sayısı	Bakteri türü
Yanık	1	*Staphylococcus aureus*
Yara	1	*Staphylococcus aureus*
İYE	4	*Pseudomonas maltophilia*
Balgam	5	*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*
Toplam	11	

4.2.1.3 Farklı ortamlarda bakteri üremesi

Pseudomonas aeruginosa bakteri kolonileri kültür ortamında yeşil renkli olan biyosin enzimini salgılamaya başladıkça dikkate değer bir büyüme sağlarlar. Aşağıda *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyüme gösterdiği farklı kültür ortamları açıklanmıştır.

Besleyici agar

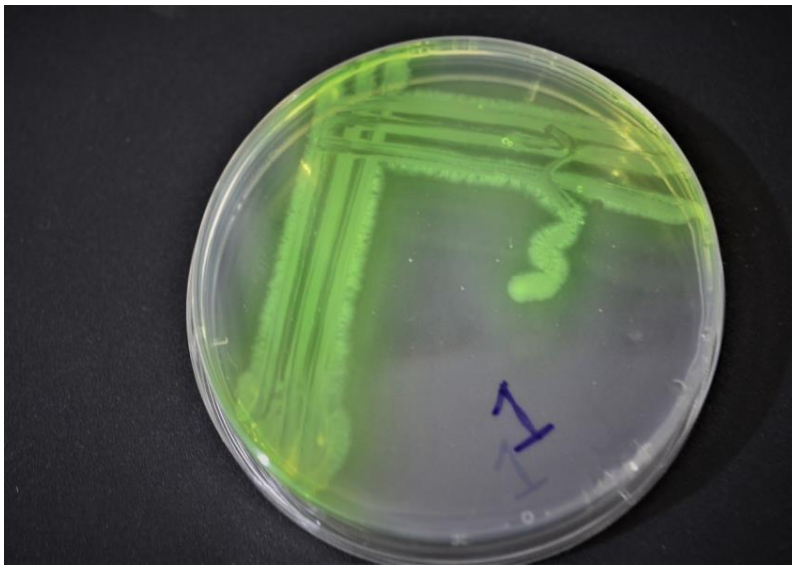
Teşhis edilen izolatlar kültür ortamında net bir büyüme göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, Biosiyanin enzimini salgıladığında yeşil rengiyle ayırt edilir. Tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatları 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. (Şekil 4.10)



Şekil 4.10 Besleyici agarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi

Setrimid agarı

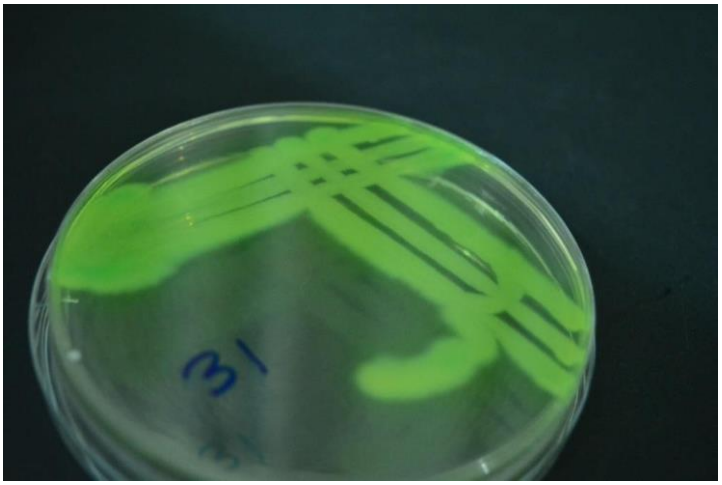
Bu kültür besiyeri, Şekil 4.11'da gösterildiği gibi, bakteri kolonilerinin önemli ölçüde büyümesinin gözlemlendiği farklı bir besiyeridir. Tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatları 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 4.11 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Setrimid agar içinde büyümesi

Beyin kalp infüzyon agar

Teşhis edilen izolatlar, Beyin kalp infüzyon besiyerinde net bir büyüme göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, Şekil 4.12'de görüldüğü gibi Biosiyanin enzimini salgıladığı için yeşil rengi ile ayırt edilir. Tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatları 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 4.12 Beyin kalp infüzyon agar içinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi

4.2.1.4 Antibakteriyel duyarlılık testi

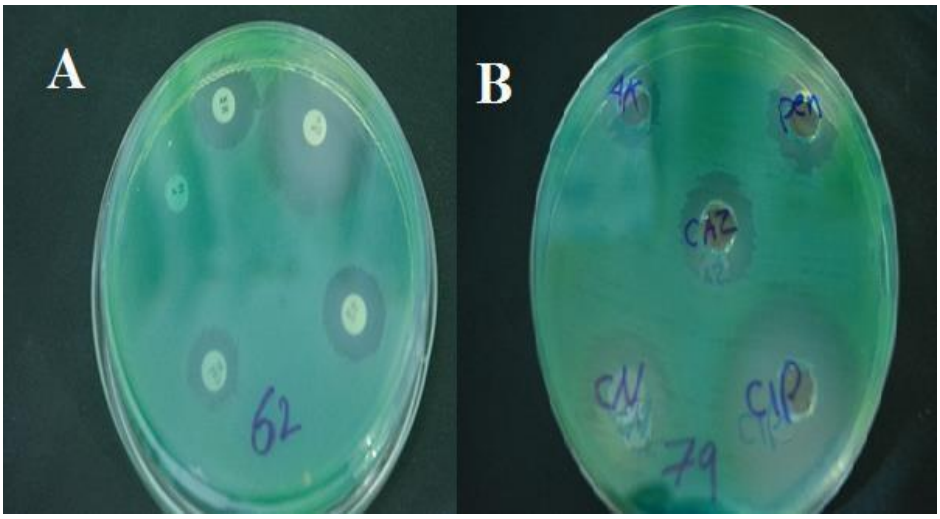
Bakteriler için 1,5x10^8 CFU/mL içeren inokulum süspansiyonu hazırlanmıştır. Steril bakteriyel inokulum süspansiyonu çizgi oluşumu yolu ile Müller Hinton agar plakaları üzerine aşılanmıştır. Plakalar 10 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Bütün izolatların çok çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı (Penisilin, Ceftazidim, Amikasin, Gentamisin, ve Ciprofloksasin) duyarlılıkları CLSI kılavuz çizgisine göre belirlenmiştir. Bu yöntem iyi bilinmesi ve çok sayıda izolata uygulanması nedeniyle tercih edilmektedir. Elde edilen sonuçlarda birkaç antibiyotik türü içeren büyük bir antibiyogram oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca sonuçların değerlendirilmesinde gerçek direnç gösteren izolatlar ele alınmıştır. Her petri kabı plakasının üzerinde, 24 saat boyunca 37 santigrat derecede inkübe edilen 5 adet antibakteriyel disk bulunmaktadır. Disklerin çevresinde inhibisyon bölgelerinin oluşumu not edilmiştir. Normal aralığına bağlı olarak (Chen *et al.* 2014), bu çalışmada bulunan 89 *Pseudomonas aeruginosa* izolatının 10'unda (%10) bir veya daha fazla ticari antibiyotiğe karşı gerçek direnç tespit edilmiştir. İnhibisyon zonlu Penisilin'e karşı yüksek oranda direnç (0mm - 25mm), Amikasin (10mm –25 mm) ve Gentamisin'e (12mm - 28mm) karşı orta düzeyde direnç, Seftazidim (1mm - 31mm) ve son olarak Siprofloksasin'e (17mm - 41mm) karşı daha düşük direnç oranları kaydedilmiştir.

Diğer izolatların orta düzeyde antibiyotik duyarlılığına sahip olduğu bulunmuştur. Dirençli izolatların, hedef proteinlerdeki belirli mutasyonların ilaç direncinin kaynağı

olduğunu belirten çalışmalarla uyumlu olduğu bulunmuştur, bu da ilaç-protein etkileşimlerinin bölünme komplekslerini (Protein-DNA) stabilize etmede veya ilaç direncini önlemede önemli olduğunun göstergesidir (Aldred *et al.* 2014). Bazı kaynaklara göre *Pseudomonas* türlerinde farklı antibiyotiklere karşı direnç bulunmadığı ifade edilmektedir. Diğer bazı çalışmalarda da *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyük dış zar gözenekleri oluşturan bol miktarda porin (OprF geni) ürettiğinin keşfedilmiştir. Yakın zamanda MexAB-OprM genlerinin β-laktamlar, Kloramfenikol, Florokinolonlar, Novobiyosin, Tetrasiklin ve Trimetoprim'in yanı sıra farklı boya ve deterjanları çıkaran bir akış pompası mekanizmasını kodladığı bulunmuştur (Livermore 2002). Antimikrobiyal ajanların bu bakteriler üzerindeki artan uzun süreli maruziyeti ve seçici baskısı, klinik izolatlarda gözlenen dirençli bir fenotipe karşı önemli ölçüde artan duyarlılığı ile açıklayabilir (Chen *et al.* 2014).

Müller Hinton agar

Teşhis edilen izolatlar, Müller Hinton Agar besiyerinde dikkate değer bir büyüme göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, Şekilde 4.13'de görüldüğü gibi Biosiyanin enzimini salgıladığı için yeşil rengi ile kolayca ayırt edilir. Tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatları 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

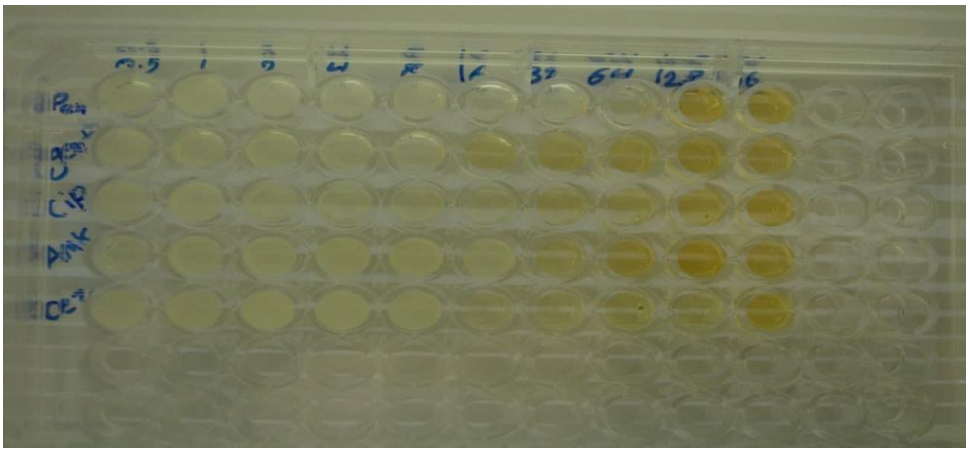


Şekil 4.13 Müller Hinton besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesi

4.2.1.5 Antibiyotiklerin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC)

Sentezlenen bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) hesaplanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel aktivitesini (Şekil 4.14), duyarlılıklarını ve inhibisyon bölgesini tespit etmek için *Pseudomonas aeruginosa'*nın (89) izolatları üzerinde agar kuyusu difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Pfoze *et al.* 2011). 5 antibiyotiğin antibakteriyel etkinliği, 5 bileşiğin tümünün distile suda çözülmesi ve 96 gözlü (12 sütun ve 8 sıra) sterilize edilmiş bir mikro seyreltme plakası üzerinde (0,5- 1024g/ mL) arasında değişen seri seyreltmeler sonunda değerlendirilmesi ile mümkün olmuştur. Her bir oyuğa 50µL Müller Hinton agar, sentezlenen bileşik ve bakteriyel inokulum süspansiyonu ilave edilmiştir. Ticari antibiyotik olarak Siprofloksasin ve kontrol olarak Distile suyu kullanılmıştır. Daha sonra mikro seyreltme plakası kapatıldıktan ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra okumalar yapılmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri ile karşılaştırldığında, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı Gentamicin ve Seftazidim en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olmuştur



Şekil 4.14 Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi ve MIC değerinin belirlenmesi

Çalışmamız toplamda 100 farklı klinik örneğinin alınması ve alınan bu örneklerde "*In silico*" ve klinik testlerin uygulanmasını içermektedir. Alınan 100 örneğe uygulanan

laboratuvar ve klinik testler sonucunda 89 izolatta *Pseudomonas aeruginosa* tespit edilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa'*ya karşı antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Antibiyotiklerin *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki etkileri arasında büyük bir farklılıklar tespit edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* karşı en yüksek antibiyotik etkisi sırasıyla Siproflaksin, Seftazidim, Amikasin, Gentamisin ve Penisilin G olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan *"In silico*" çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermiştir.

KAYNAKLAR

Aldred, K. J., Kerns, R. J. and Osheroff, N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry, 53: 1565-1574.

Anderson, E. M., Sychantha, D., Brewer, D., Clarke, A. J., Geddes-McAlister, J. and Khursigara, C. M. 2020. Correction: Peptidoglycomics reveals compositional changes in peptidoglycan between biofilm-and planktonic-derived Pseudomonas aeruginosa. The Journal of biological chemistry, 295: 3387-91.

Aparoy, P., Kumar Reddy, K. and Reddanna, P. 2012. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. Current medicinal chemistry, 19: 3763-3778.

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., & Yeh, L. S. L. 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic acids research, 32(suppl_1): D115-D119.

Aubry, A., Fisher, L. M., Jarlier, V. and Cambau, E. 2006. First functional characterization of a singly expressed bacterial type II topoisomerase: the enzyme from Mycobacterium tuberculosis. Biochemical and biophysical research communications, 348: 158-165.

Bäckhed, F., Normark, S., Schweda, E. K., Oscarson, S. and Richter-Dahlfors, A. 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes and infection, 5: 1057-1063.

Bajorath, J. 2002. Integration of virtual and high-throughput screening. Nat Rev Drug Discov, 1: 882-894.

Benkert, P., Biasini, M. and Schwede, T. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics, 27: 343-350.

Bhaduri, T., Sikder, D. and Nagaraja, V. 1998. Sequence specific interaction of Mycobacterium smegmatis topoisomerase I with duplex DNA. Nucleic acids research, 26: 1668-1674.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T. and Schwede, T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic acids research, 42: 252-258.

Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. and Dos Santos, V. A. 2008. Towards understanding Pseudomonas aeruginosa burn wound infections by profiling gene expression. Biotechnology letters, 30: 777-790.

Broomfield, R. J., Morgan, S. D., Khan, A. and Stickler, D. J. 2009. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. Journal of medical microbiology, 58: 1367-1375.

Cavasotto, C. N. and Phatak, S. S. 2009. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. Drug discovery today, 14: 676-683.

Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annual review of biochemistry, 70: 369-413.

Chen, C., Chen, Y., Wu, P. and Chen, B. 2014. Update on new medicinal applications of gentamicin: evidence-based review. Journal of the Formosan Medical Association, 113: 72-82.

Chen, L., K Morrow, J., T Tran, H., S Phatak, S., Du-Cuny, L. and Zhang, S. 2012. From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets. Current pharmaceutical design, 18: 1217-1239.

Chen, S. H., Chan, N. L. and Hsieh, T. S. 2013. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. Annual review of biochemistry, 82: 139-170.

Cole, S. J., Records, A. R., Orr, M. W., Linden, S. B. and Lee, V. T. 2014. Catheter-associated urinary tract infection by Pseudomonas aeruginosa is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. Infection and immunity, 82: 2048-2058.

Collee, J. G., Miles, R. S. and Watt, B. 1996. Tests for identification of bacteria. Mackie and McCartney practical medical microbiology, 14: 131-49.

Comer, J. E., Marshall, M. A., Blanch, V. J., Deal, C. D. and Castric, P. 2002. Identification of the Pseudomonas aeruginosa 1244 pilin glycosylation site. Infection and immunity, 70: 2837-2845.

De Silva, M., Ning, C., Ghanbar, S., Zhanel, G., Logsetty, S., Liu, S. and Kumar, A. 2015. Evidence that a novel quaternary compound and its organic N-chloramine derivative do not select for resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa. Journal of Hospital Infection, 91: 53-58.

Deweese, J. E., Osheroff, M. A. and Osheroff, N. 2009. DNA topology and topoisomerases: teaching a “knotty” subject. Biochemistry and Molecular Biology Education, 37: 2-10.

Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P. and Cámara, M. 2006. 4-quinolone signalling in Pseudomonas aeruginosa: old molecules, new perspectives. International journal of medical microbiology, 296: 83-91.

Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., García, E., Moscoso, M. and Yuste, J. 2013. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of Streptococcus pneumoniae. Infection and immunity, 81: 2606-2615.

Dong, C., Ye, Y., Qian, L., Zhao, G., He, B. and Xiao, H. 2014. Antibacterial modification of cellulose fibers by grafting β-cyclodextrin and inclusion with ciprofloxacin. Cellulose, 21: 1921-1932.

Dunne Jr, W. M. and Hardin, D. J. 2005. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp., Citrobacter spp., and Serratia spp. Journal of clinical microbiology, 43: 5945-5949.

Ehmann, D. E. and Lahiri, S. D. 2014. Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. Current opinion in pharmacology, 18: 76-83.

Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C. and O'Callaghan, R. J. 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Biological Chemistry, 273: 16792-16797.

Fisher, L. M. 1981. DNA supercoiling by DNA gyrase. Nature, 294: 607-608.

Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J. P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K. E., Kanada, D., & Frank, D. W. 1997. Pseudomonas aeruginosa-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infection and immunity, 65(2): 579-586.

Flemming, H. C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature reviews microbiology, 8: 623-633.

Frank, D. W. 1997. The exoenzyme S regulon of Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology, 26: 621-629.

Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. and Howell, P. L. 2011. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. Frontiers in microbiology, 2: 167-171.

Frazier, A. D. and Champney, W. S. 2012. The vanadyl ribonucleoside complex inhibits ribosomal subunit formation in Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67: 2152-2157.

Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. 2013. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease, 67: 159-173.

Ghafoor, A., Hay, I. D. and Rehm, B. H. 2011. Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture. Applied and environmental microbiology, 77: 5238-5246.

Ghosh, S., Nie, A., An, J. and Huang, Z. 2006. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. Current opinion in chemical biology, 10: 194-202.

Grocock, R. J. and Sharp, P. M. 2002. Synonymous codon usage in Pseudomonas aeruginosa PA01. Gene, 289: 131-139.

Grossman, T. H., Bartels, D. J., Mullin, S., Gross, C. H., Parsons, J. D., Liao, Y., Grillot, A.L., Stamos, D., Olson, E. R., Charifson, P. S. and Mani, N. 2007. Dual targeting of GyrB and ParE by a novel aminobenzimidazole class of antibacterial compounds. Antimicrob. Agents Chemother, 51: 657–666.

Gutsmann, T., Müller, M., Carroll, S. F., MacKenzie, R. C., Wiese, A. and Seydel, U. 2001. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. Infection and immunity, 69: 6942-6950.

Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. and Murgier, M. 1991. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. Journal of bacteriology, 173: 5290-5297.

Hauser, A. R. 2009. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. Nature Reviews Microbiology, 7: 654-665.

Hevener, K., Verstak, T. A., Lutat, K. E., Riggsbee, D. L. and Mooney, J. W. 2018. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. Acta pharmaceutica sinica B, 8: 844-861

Hirakawa, H. and Tomita, H. 2013. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. Frontiers in microbiology, 4: 114-120.

Hoyle, B. D., Jass, J. and Costerton, J. W. 1990. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 26: 1-5.

Huong, L. T., Linh, L. D., Dai, D. N. and Ogunwande, I. A. 2020. Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oils from Amomum velutinum XE Ye, Škorniėk. & NH Xia (Zingiberaceae) from Vietnam. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23: 1132-1141.

Kapetanovic, I. 2008. Computer-aided drug discovery and development (caddd): In silico chemico-biological approach. Chemico-Biological Interactions, 171: 165–176.

Karimi, A., Karig, D., Kumar, A. and Ardekani, A. M. 2015. Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. Lab on a Chip, 15: 23-42.

Kessler, E. and Safrin, M. 1994. The propeptide of Pseudomonas aeruginosa elastase acts an elastase inhibitor. Journal of Biological Chemistry, 269: 22726-22731.

Khanna, I. 2012. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. Drug discovery today, 17: 1088-1102.

Kroemer, R. T. 2007. Structure-based drug design: docking and scoring. Current protein and peptide science, 8: 312-328.

Kumar, R., Riley, J. E., Parry, D., Bates, A. D. and Nagaraja, V. 2012. Binding of two DNA molecules by type II topoisomerases for decatenation. Nucleic acids research, 40: 10904-10915.

Kureishi, A., Diver, J. M., Beckthold, B., Schollaardt, T. and Bryan, L. E. 1994. Cloning and nucleotide sequence of Pseudomonas aeruginosa DNA gyrase gyrA gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38: 1944-1952.

Lambert, M. L., Suetens, C., Savey, A., Palomar, M., Hiesmayr, M., Morales, I. and Wolkewitz, M. 2011. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. The Lancet infectious diseases, 11: 30-38.

Laverty, G., Gorman, S. P. and Gilmore, B. F. 2014. Biomolecular mechanisms of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli biofilm formation. Pathogens, 3: 596-632.

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R. and Jeffers, A. K. 2005. The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN-γ-mediated macrophage killing. The Journal of Immunology, 175: 7512-7518.

Liao, C., Sitzmann, M., Pugliese, A. and Nicklaus, M. C. 2011. Software and resources for computational medicinal chemistry. Future medicinal chemistry, 3: 1057-1085.

Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare. Clinical infectious diseases, 34: 634-640.

Mayer, H., Tharanathan, R. N. and Weckesser, J. 1985. 6 Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. In Methods in microbiology, 18: 157-207.

Morimoto, S., Tsuda, M., Bunch, H., Sasanuma, H., Austin, C. and Takeda, S. 2019. Type II DNA topoisomerases cause spontaneous double-strand breaks in genomic DNA. Genes, 10: 868-873.

Nitiss, J. L. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nature Reviews Cancer, 9: 338-350.

Ohno, N. and Morrison, D. C. 1989. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. Journal of Biological Chemistry, 264: 4434-4441.

O'Hoy, K. and Krishnapillai, V. 1987. Recalibration of the Pseudomonas aeruginosa strain PAO chromosome map in time units using high-frequency-of-recombination donors. Genetics, 115: 611-618.

Passador, L. and Iglewski, W. 1994. ADP-ribosylating toxins. Methods in enzymology, 235: 617-631.

Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A. and Gitai, Z. 2015. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112: 7563-7568.

Pfoze, N. L., Kumar, Y., Myrboh, B., Bhagobaty, R. K. and Joshi, S. R. 2011. In vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of Mahonia manipurensis Takeda. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 859-861.

Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. and Ohman, D. E. 2001. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid Pseudomonas aeruginosa to opsonic phagocytosis. Infection and immunity, 69: 1895-1901.

Pobiega, M., Maciag, J., Pomorska-Wesolowska, M., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Ziolkowski, G. and Bulanda, M. 2016. Urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa among children in Southern Poland: Virulence factors and antibiotic resistance. Journal of pediatric urology, 12: 36-41.

Raetz, C. R. and Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual review of biochemistry, 71: 635-700.

Ramsey, D. M. and Wozniak, D. J. 2005. Understanding the control of Pseudomonas aeruginosa alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Molecular microbiology, 56: 309-322.

Rao, V. and Srinivas, K. 2011. Modern drug discovery process: An in silico approach. Journal of bioinformatics and sequence analysis, 3: 89-94.

Ravel, J. and Cornelis, P. 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. Trends in microbiology, 11: 195-200.

Schmidt, B. H., Burgin, A. B., Deweese, J. E., Osheroff, N. and Berger, J. M. 2010. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. Nature, 465: 641-644.

Schmidt, B. H., Osheroff, N. and Berger, J. M. 2012. Structure of a topoisomerase II–DNA–nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. Nature structural & molecular biology, 19: 1147-1154.

Sestito, S. E., Facchini, F. A., Morbioli, I., Billod, J. M., Martin-Santamaria, S., Casnati, and Peri, F. 2017. Amphiphilic guanidinocalixarenes inhibit lipopolysaccharide (LPS)-and lectin-stimulated toll-like receptor 4 (TLR4) signaling. Journal of medicinal chemistry, 60: 4882-4892.

Shaikh, S. A., Jain, T., Sandhu, G., Latha, N. and Jayaram, B. 2007. From drug target to leads-sketching a physicochemical pathway for lead molecule design in silico. Current pharmaceutical design, 13: 3454-3470.

Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T. and Challapilli, S. 2018. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and approaches for treatment and biofilm dispersal. Folia microbiologica, 63: 413-432.

Spiers, A. J., Buckling, A. and Rainey, P. B. 2000. The causes of Pseudomonas diversity. Microbiology, 146: 2345-2350.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J. and Olson, M. V. 2000. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406: 959-964.

Sultana, S. T., Call, D. R. and Beyenal, H. 2016. Eradication of Pseudomonas aeruginosa biofilms and persister cells using an electrochemical scaffold and enhanced antibiotic susceptibility. NPJ biofilms and microbiomes, 2: 1-8.

Tiwari, R. P., Deol, K., Rishi, P., & Grewal, J. S. 2002. Factors affecting haemolysin production and Congo red binding in Salmonella enterica serovar Typhimurium DT 98. Journal of medical microbiology, 51(6): 503-509.

Tretter, E. M. and Berger, J. M. 2012. Mechanisms for Defining Supercoiling Set Point of DNA Gyrase Orthologs: II. The Shape Of The Gyra Subunit C-Terminal Domain (Ctd) Is Not A Sole Determinant For Controlling Supercoiling Efficiency. Journal of Biological Chemistry, 287: 18645-18654.

Udaondo, Z., Ramos, J. L., Segura, A., Krell, T. and Daddaoua, A. 2018. Regulation of carbohydrate degradation pathways in Pseudomonas involves a versatile set of transcriptional regulators. Microbial biotechnology, 11: 442-454.

Van Delden, C. and Iglewski, B. H. 1998. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerging infectious diseases, 4: 551-8.

Vital-Lopez, F. G., Reifman, J. and Wallqvist, A. 2015. Biofilm formation mechanisms of Pseudomonas aeruginosa predicted via genome-scale kinetic models of bacterial metabolism. PLoS computational biology, 11: e1004452.

Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H. and Berger, J. M. 2011. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. Nature reviews Molecular cell biology, 12: 827-841.

Wang, J. C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nature reviews Molecular cell biology, 3: 430-440.

Wasko, M. J., Pellegrene, K. A., Madura, J. D. and Surratt, C. K. 2015. A role for fragment-based drug design in developing novel lead compounds for central nervous system targets. Frontiers in neurology, 6: 197-200.

Wassermann, A. M., Lounkine, E., Hoepfner, D., Le Goff, G., King, F. J., Studer, C. and Glick, M. 2015. Dark chemical matter as a promising starting point for drug lead discovery. Nature chemical biology, 11: 958-966.

Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R. and Lewenza, S. 2016. Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60: 544-553.

Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A. and Brinkman, F. S. 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of Pseudomonas genomes in the Pseudomonas genome database. Nucleic acids research, 44: 646-653.

Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L. Y., Lin, T. S., Yu, Y. J., & Chan, N. L. 2011. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. Science, 333(6041): 459-462.

Xie, T., Zhang, L., Zhang, S., Ouyang, L., Cai, H. and Liu, B. 2016. ACTP: A webserver for predicting potential targets and relevant pathways of autophagy-modulating compounds. Oncotarget, 7: 10015-10020.

Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. and Frank, D. W. 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the Pseudomonas aeruginosa type III system. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 13899-13904.

Zhang, D., Chen, L., Li, S., Gu, Z. and Yan, J. 2008. Lipopolysaccharide (LPS) of Porphyromonas gingivalis induces IL-1β, TNF-α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of Escherichia coli LPS. Innate immunity, 14: 99-107.

Zhang, R., Ou, H. Y. and Zhang, C. T. 2004. DEG: a database of essential genes. Nucleic acids research, 32: 271-272.

EKLER

EK 1. Klinik *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı standart antibakteriyel disklerin CLSI Antibiyogramı

EK 2. Bakteri özütlerinin 0,5 McFarland standartları ile karşılaştırılması

EK 1. Klinik *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı standart antibakteriyel disklerin CLSI Antibiyogramı

Test No.	Penisilin G S 10	Seftazidim Caz 30	Siprofloksasin çip	Antibiyotik CN10	Amikasin AK30
1	dayanıklı	20 mm	30 mm	15 mm	18 mm
2	dayanıklı	25 mm	35 mm	14 mm	18 mm
3	dayanıklı	23 mm	36 mm	16 mm	15 mm
4	dayanıklı	24 mm	35 mm	15 mm	21 mm
5	dayanıklı	20 mm	30 mm	10 mm	13 mm
6	dayanıklı	26 mm	34 mm	16 mm	20 mm
7	dayanıklı	21 mm	33 mm	15 mm	19 mm
8	dayanıklı	24 mm	35 mm	18 mm	21 mm
9	dayanıklı	22 mm	34 mm	17 mm	23 mm
10	dayanıklı	25 mm	31 mm	16 mm	20 mm
11	dayanıklı	22 mm	33 mm	17 mm	19 mm
12	dayanıklı	21 mm	32 mm	15 mm	18 mm
13	dayanıklı	24 mm	34 mm	18 mm	19 mm
14	dayanıklı	19 mm	30 mm	17 mm	20 mm
15	dayanıklı	24 mm	30 mm	16 mm	20 mm
16	dayanıklı	21 mm	34 mm	15 mm	21 mm
17	dayanıklı	18 mm	24 mm	15 mm	20 mm
18	dayanıklı	20 mm	35 mm	15 mm	20 mm
19	dayanıklı	25 mm	28 mm	16 mm	18 mm
20	dayanıklı	19 mm	36 mm	17 mm	20 mm
21	dayanıklı	23 mm	33 mm	15 mm	22 mm
22	dayanıklı	18 mm	34 mm	16 mm	23 mm
23	dayanıklı	28 mm	35 mm	18 mm	24 mm
24	dayanıklı	22 mm	36 mm	17 mm	20 mm
25	dayanıklı	24 mm	28 mm	17 mm	20 mm
26	dayanıklı	23 mm	31 mm	18 mm	19 mm
27	dayanıklı	25 mm	37 mm	17 mm	23 mm
28	dayanıklı	18 mm	29 mm	15 mm	25 mm
29	dayanıklı	17 mm	25 mm	14 mm	17 mm
30	dayanıklı	19 mm	35 mm	18 mm	24 mm
31	dayanıklı	20 mm	29 mm	16 mm	17 mm
32	dayanıklı	30 mm	31 mm	17 mm	22 mm
33	dayanıklı	23 mm	33 mm	15 mm	19 mm
34	dayanıklı	20 mm	32 mm	15 mm	21 mm
35	dayanıklı	24 mm	33 mm	15 mm	20 mm
36	dayanıklı	14 mm	30 mm	17 mm	18 mm
37	dayanıklı	24 mm	28 mm	14 mm	20 mm
38	dayanıklı	17 mm	30 mm	20 mm	20 mm
39	dayanıklı	16 mm	27 mm	14 mm	18 mm
40	dayanıklı	25 mm	30 mm	16 mm	24 mm
41	dayanıklı	19 mm	30 mm	18 mm	23 mm
42	dayanıklı	13 mm	26 mm	17 mm	21 mm
43	dayanıklı	17 mm	31 mm	16 mm	18 mm
44	dayanıklı	15 mm	32 mm	17 mm	20 mm
45	dayanıklı	13 mm	28 mm	15 mm	17 mm
46	dayanıklı	14 mm	34 mm	18 mm	19 mm
47	dayanıklı	12 mm	28 mm	14 mm	22 mm
48	dayanıklı	14 mm	31 mm	16 mm	21 mm
49	dayanıklı	15 mm	34 mm	21 mm	20 mm

50	dayanıklı	19 mm	29 mm	15 mm	17 mm
51	dayanıklı	20 mm	35 mm	14 mm	20 mm
52	dayanıklı	24 mm	29 mm	16 mm	22 mm
53	dayanıklı	20 mm	28 mm	15 mm	18 mm
54	dayanıklı	23 mm	35 mm	15 mm	21 mm
55	dayanıklı	27 mm	34 mm	17 mm	29 mm
56	dayanıklı	24 mm	35 mm	14 mm	19 mm
57	dayanıklı	14 mm	28 mm	14 mm	20 mm
58	dayanıklı	15 mm	27 mm	16 mm	21 mm
59	dayanıklı	16 mm	20 mm	15 mm	19 mm
60	dayanıklı	24 mm	33 mm	13 mm	20 mm
61	dayanıklı	16 mm	30 mm	18 mm	20 mm
62	dayanıklı	10 mm	27 mm	15 mm	16 mm
63	dayanıklı	8 mm	29 mm	16 mm	14 mm
64	dayanıklı	13 mm	30 mm	14 mm	16 mm
65	dayanıklı	11 mm	31 mm	17 mm	14 mm
66	dayanıklı	13 mm	30 mm	18 mm	17 mm
67	dayanıklı	16 mm	28 mm	17 mm	15 mm
68	dayanıklı	15 mm	32 mm	18 mm	14 mm
69	dayanıklı	14 mm	30 mm	16 mm	15 mm
70	dayanıklı	13 mm	33 mm	17 mm	15 mm
71	dayanıklı	11 mm	29 mm	19 mm	15 mm
72	dayanıklı	14 mm	30 mm	23 mm	16 mm
73	dayanıklı	18 mm	33 mm	19 mm	15 mm
74	dayanıklı	14 mm	31 mm	21 mm	16 mm
75	dayanıklı	15 mm	30 mm	20 mm	17 mm
76	dayanıklı	15 mm	27 mm	15 mm	18 mm
77	dayanıklı	15 mm	31 mm	22 mm	18 mm
78	dayanıklı	13 mm	29 mm	15 mm	19 mm
79	dayanıklı	16 mm	23 mm	15 mm	16 mm
80	dayanıklı	10 mm	26 mm	14 mm	17 mm
81	dayanıklı	15 mm	28 mm	15 mm	16 mm
82	dayanıklı	13 mm	27 mm	16 mm	16 mm
83	dayanıklı	16 mm	30 mm	17 mm	14 mm
84	dayanıklı	13 mm	31 mm	16 mm	20 mm
85	dayanıklı	14 mm	30 mm	16 mm	18 mm
86	dayanıklı	12 mm	34 mm	14 mm	16 mm
87	dayanıklı	17 mm	28 mm	15 mm	18 mm
88	dayanıklı	13 mm	30 mm	17 mm	18 mm
89	dayanıklı	12 mm	29 mm	14 mm	19 mm

EK 2. Bakteri özütlerinin 0,5 McFarland standartları ile karşılaştırılması

No	Seftazidim CAZ	Siprofloksasin CIP	Amikasin AK	Antibiyotik CN	Penisilin G
1	20 mm	32 mm	20 mm	21 mm	16 mm
2	23 mm	34 mm	20 mm	17 mm	14 mm
3	18 mm	29 mm	14 mm	17 mm	15 mm
4	23 mm	39 mm	21 mm	20 mm	16 mm
5	19 mm	27 mm	14 mm	17 mm	10 mm
6	25 mm	31 mm	20 mm	19 mm	15 mm
7	17 mm	26 mm	17 mm	13 mm	3 mm
8	18 mm	30 mm	18 mm	15 mm	12 mm
9	15 mm	20 mm	16 mm	18 mm	13 mm
10	20 mm	32 mm	22 mm	19 mm	15 mm
11	29 mm	40 mm	23 mm	19 mm	17 mm
12	23 mm	30 mm	18 mm	19 mm	18 mm
13	16 mm	31 mm	13 mm	17 mm	3 mm
14	28 mm	31 mm	22 mm	21 mm	16 mm
15	27 mm	33 mm	19 mm	18 mm	15 mm
16	17 mm	29 mm	18 mm	14 mm	4 mm
17	18 mm	30 mm	13 mm	16 mm	2 mm
18	17 mm	25 mm	17 mm	14 mm	3 mm
19	26 mm	35 mm	19 mm	21 mm	16 mm
20	25 mm	41 mm	20 mm	19 mm	17 mm
21	24 mm	40 mm	18 mm	21 mm	2 mm
22	30 mm	29 mm	19 mm	18 mm	16 mm
23	26 mm	31 mm	20 mm	17 mm	15 mm
24	20 mm	30 mm	16 mm	15 mm	2 mm
25	17 mm	28 mm	14 mm	16 mm	5 mm
26	16 mm	25 mm	13 mm	15 mm	8 mm
27	31 mm	37 mm	18 mm	24 mm	25 mm
28	15 mm	30 mm	16 mm	14 mm	dayanıklı
29	18 mm	29 mm	14 mm	19 mm	3 mm
30	20 mm	35 mm	20 mm	21 mm	16 mm
31	24 mm	35 mm	20 mm	19 mm	17 mm
32	17 mm	27 mm	14 mm	18 mm	3 mm
33	20 mm	24 mm	17 mm	18 mm	14 mm
34	21 mm	31 mm	20 mm	17 mm	15 mm
35	22 mm	32 mm	21 mm	20 mm	17 mm
36	16 mm	28 mm	11 mm	16 mm	3 mm
37	18 mm	27 mm	14 mm	16 mm	7 mm
38	17 mm	30 mm	16 mm	17 mm	4 mm
39	26 mm	37 mm	20 mm	21 mm	17 mm
40	17 mm	32 mm	15 mm	16 mm	6 mm
41	16 mm	30 mm	14 mm	16 mm	11 mm
42	25 mm	34 mm	19 mm	20 mm	15 mm
43	26 mm	30 mm	18 mm	19 mm	16 mm
44	15 mm	29 mm	17 mm	18 mm	dayanıklı
45	20 mm	32 mm	18 mm	16 mm	17 mm
46	26 mm	33 mm	22 mm	17 mm	15 mm
47	22 mm	32 mm	16 mm	21 mm	16 mm
48	16 mm	31 mm	18 mm	16 mm	14 mm
49	19 mm	27 mm	16 mm	18 mm	14 mm
50	15 mm	28 mm	15 mm	15 mm	16 mm

51	20 mm	25 mm	17 mm	18 mm	16 mm
52	24 mm	36 mm	24 mm	22 mm	18 mm
53	14 mm	24 mm	16 mm	16 mm	5 mm
54	7 mm	26 mm	10 mm	17 mm	14 mm
55	25 mm	25 mm	17 mm	15 mm	dayanıklı
56	21 mm	25 mm	20 mm	24 mm	16 mm
57	23 mm	28 mm	19 mm	16 mm	dayanıklı
58	10 mm	17 mm	24 mm	15 mm	13 mm
59	13 mm	26 mm	18 mm	25 mm	15 mm
60	20 mm	25 mm	17 mm	18 mm	14 mm
61	14 mm	29 mm	19 mm	16 mm	15 mm
62	18 mm	23 mm	18 mm	22 mm	14 mm
63	16 mm	26 mm	22 mm	19 mm	dayanıklı
64	15 mm	25 mm	13 mm	15 mm	dayanıklı
65	8 mm	24 mm	18 mm	18 mm	10 mm
66	14 mm	27 mm	17 mm	20 mm	20 mm
67	21 mm	29 mm	23 mm	28 mm	18 mm
68	20 mm	26 mm	14 mm	15 mm	17 mm
69	24 mm	32 mm	25 mm	20 mm	18 mm
70	23 mm	27 mm	20 mm	19 mm	15 mm
71	15 mm	21 mm	20 mm	20 mm	19 mm
72	14 mm	25 mm	16 mm	17 mm	15 mm
73	17 mm	26 mm	15 mm	17 mm	dayanıklı
74	25 mm	28 mm	20 mm	19 mm	15 mm
75	25 mm	36 mm	20 mm	18 mm	20 mm
76	14 mm	28 mm	17 mm	16 mm	19 mm
77	16 mm	30 mm	18 mm	22 mm	15 mm
78	19 mm	27 mm	17 mm	15 mm	14 mm
79	17 mm	31 mm	15 mm	16 mm	16 mm
80	15 mm	25 mm	17 mm	18 mm	15 mm
81	dayanıklı	29 mm	14 mm	15 mm	13 mm
82	21 mm	34 mm	21 mm	22 mm	17 mm
83	10 mm	23 mm	15 mm	19 mm	14 mm
84	16 mm	24 mm	17 mm	15 mm	16 mm
85	16 mm	29 mm	20 mm	25 mm	19 mm
86	15 mm	27 mm	21 mm	20 mm	dayanıklı
87	16 mm	30 mm	13 mm	15 mm	14 mm
88	17 mm	23 mm	19 mm	21 mm	13 mm
89	14 mm	30 mm	20 mm	16 mm	15 mm

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : İbrahim Nabeel Abdulrazzaq ALTAIE

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	El Farabi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014-2018