

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli*'de Klorheksidin ve Azitromisin Sinerjistik Etkisinin
Biyomoleküler Düzeyde Kapsamlı İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM SAMGANE

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SİNEM TUNÇER

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2023

10493281

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli*'de Klorheksidin ve Azitromisin Sinerjistik Etkisinin
Biyomoleküler Düzeyde Kapsamlı İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM SAMGANE

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SİNEM TUNÇER

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2023

10493281

BEYAN

“*Escherichia coli*’de Klorheksidin ve Azitromisin Sinerjistik Etkisinin Biyomoleküler Düzeyde Kapsamlı İncelenmesi” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Gizem Samgane

.../.../2023

İmza

ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez konumun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar değerli görüş ve önerilerini sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoğun çalışmalar sırasında sabır gösterdikleri için Doç. Dr. Sinem TUNÇER ve Doç. Dr. Rafig GURBANOV sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN, Duygu BEKİRCAN ESKİ, Ardahan ESKİ, Fırat Yavuz ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve laboratuvar çalışmalarımdayan yanımda olup maddi manevi destek veren ve yalnız bırakmayan Sevinç KARAÇAM, Hazel KARADAĞ, Görkem TOKGÖZ, Sina MANSUROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan babam Ramazan SAMGANE, annem Aynur SAMGANE, ablam Cansu KELEŞOĞLU, abim Caner SAMGANE, manevi abim Sadık KELEŞOĞLU ve yeğenlerime sonsuz teşekkür ederim.

Yoğun tempolu bu süreçte desteklerini esirgemeyen, beni hiç yalnız bırakmayan, zor anlarımı paylaştığım, maddi ve manevi yanımda olan Murat ŞAHAN, Hande Dilber NURLU, Kübra AKDENİZ, Burak Can ÖZTÜRK, Mert UĞURLUER, Cem AKTUNA, Pınar ÇIRAKOĞLU, Gökay VARIŞ, Muhammet KOÇ, Burcu ÖZMEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Gizem SAMGANE

2023

ÖZET

***Escherichia coli*'de Klorheksidin ve Azitromisin Sinerjistik Etkisinin Biyomoleküler Düzeyde Kapsamlı İncelenmesi**

Mikroorganizmaların antimikrobiyal uygulamalara dayanma kabiliyetini ifade eden antimikrobiyal direnç, yüzyılın en önemli küresel halk sağlığı tehditlerinden biridir. Çoklu antimikrobiyal ajan uygulamalarına dirençli organizmalar küresel olarak yayılırken, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi, eski antibiyotiklerin yeniden kullanıma alınması ve ajanların kombinasyonlar halinde uygulanmasını içeren çeşitli yaklaşımlar, dirençle mücadele için önerilen stratejilerdir.

Yeni antibiyotiklerin keşfindeki azalma göz önüne alındığında, iki veya daha fazla antibiyotik aynı anda kullanılması, antibiyotik duyarlılığını geri kazanmada yaygın olarak uygulanan bir yaklaşımdır. Ancak, yeni direnç mekanizmalarının gelişmesi, bu yaklaşımın en büyük dezavantajıdır. Klorheksidin (CHX) gibi biyosidal ajanlara karşı kazanılmış direnç için ise genel riskin düşük olduğu göz önüne alınarak bu çalışmada, CHX ve günümüzde bakteriyel direncin giderek arttığı bir tür makrolid antibiyotik olan Azitromisin'in (AZM) sinerjistik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tezde, CHX ve AZM tedavilerinin tek başına veya kombinasyon halinde *Escherichia coli* üzerindeki etkileri incelenmiş olup elde edilen sonuçlar kombinasyonun, ajanların bireysel etkilerine kıyasla büyüme inhibisyon etkinliklerini arttırdığını, oksidatif strese neden olduğunu, flagellin ifadesini ve bakteriyel hareketliliği azalttığını ve otoagregasyonu teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca kombine uygulama, bakterinin epitel hücrelere tutunma kabiliyetini azaltmış ve epitel hücrelerde flagella ile aktive olan MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinaz) ve NF-κB (Nükleer faktör-kappa B) yollarını aşağı regüle etmiştir. Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak yapılan ayrıntılı biyomoleküler analizler ise, kombinasyonun bakterilerin zar özelliklerinde değişikliklere yol açtığını ve proteinler ve nükleik asitler gibi hücresel moleküller üzerinde etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Çeşitli antibiyotiklerin kombine etkileri kapsamlı bir şekilde bildirilmiş olmasına rağmen, antiseptiklerin antibiyotiklerle sinerjistik etkileri daha az çalışılmıştır. Literatürde ilk kez bu çalışma ile, CHX ve AZM kombinasyonunun antibiyotik direnciyle savaşmak için umut verici bir strateji olabileceğini önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, Klorheksidin, Azitromisin, Sinerji, Flagellin.

ABSTRACT

COMPREHENSIVE INVESTIGATION of the SYNERGISTIC EFFECT of CHLORHEXIDINE and AZITHROMYCIN on *Escherichia coli* at the BIOMOLECULAR LEVEL

Antimicrobial resistance, which refers to the ability of microorganisms to withstand antimicrobial treatments, is one of the most serious global public health threats in this century. As multi-drug resistance organisms are spreading globally, several approaches comprising the development of new antibiotics, the revival of old antibiotics, and applying the agents as combinations are proposed to combat resistance.

Given the decreasing discovery rate of novel antibiotics, the use of two or more antibiotics simultaneously is a commonly applied strategy in restoring antibiotic susceptibility. However, the development and dissemination of novel resistance mechanisms are the major drawbacks of this approach. Since the overall risk for acquired resistance to biocidal agents such as Chlorhexidine (CHX) is considered to be small, here we aimed to investigate the synergistic effects of the CHX and Azithromycin (AZM), a type of macrolide antibiotic in which the resistance is an increasing concern. In this thesis, the effects of CHX and AZM treatments, alone or in combination, on *Escherichia coli* were examined, and the results show that the combination increases growth inhibition efficiencies, causes oxidative stress, reduces flagellin expression and bacterial motility, and promotes autoaggregation compared to the individual effects of the agents. In addition, combined treatment decreased the ability of bacteria to attach to epithelial cells and down-regulated flagella-activated MAPK (Mitogen-activated protein kinase) and NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) pathways. Finally, detailed biomolecular analyzes using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) revealed that the combination caused changes in bacterial membrane properties and had effects on cellular molecules such as proteins and nucleic acids. Although the combinatorial effects of various antibiotics have been extensively reported, the synergistic effects of antiseptics with antibiotics have received less attention. First time in the literature, this study suggests that the combination of CHX with AZM can be a promising strategy to battle antibiotic resistance.

Keywords: *Escherichia coli*, Chlorhexidine, Azithromycin, Synergy, Flagellin.

2.2.1.1. Alımın Sınırlandırılması	13
2.2.1.2. Hedefinin Değiştirilmesi.....	14
2.2.1.3. İnaktivasyonu.....	14
2.2.1.4. Akışın Engellenmesi	15
2.2.2. Antibiyotik Direncinde Antimikrobiyal Ajanların Kullanımı	15
2.3. Bakteriyel Patojenitede Motilitenin Önemi	16
2.3.1. Bakteriyel Motilite.....	16
2.3.1.1. Flagella: Yapı ve Fonksiyonu	18
2.3.1.2. Patojenitede Motilite ve Flagella.....	21
2.3.2. Virülans ve Antibiyotik Toleransında Motilite.....	27
3. MATERYAL METOD	28
3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları	28
3.2. Antimikrobiyal Ajanların Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	28
3.3. Büyüme İnhibisyon Testleri	28
3.4. Agar Motilite Testi	29
3.5. Bakteriyel Swarming Motilite Testi	29
3.6. Otoagregasyon Testi.....	30
3.7. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Testi.....	30
3.8. Kanser Hücrelerinin Büyütülmesi, Alt-Kültürlemesi ve Dondurulması	32
3.9. HCT-116 Hücre Hattında Adhezyon Testi	32
3.10. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Deneyi	33
3.11. Western Blot İçin HCT-116 Hücreleri ile <i>E.coli</i> 8739 Hücrelerinin Birlikte İnkübasyonu	33
3.12. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama	34
3.12.1. <i>E.coli</i> 8739 Hücrelerinden Protein İzolasyonu	34

3.12.2. <i>E.coli</i> 8739 hücreleri ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinden protein izolasyonu	34
3.13. ATR-FTIR Spektroskopi Ölçümleri ve Veri Analizi	38
3.14. İstatiksel Analizler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Kloreksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteri Büyümesi Üzerine Etkisi.....	39
4.2. Kloreksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi	42
4.3. Kloreksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteriyel Motilite Üzerindeki Etkisi.....	43
4.4. Kloreksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteriyel Adhezyon Üzerindeki Etkisi	47
4.5. Kloreksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde MAPK ve NF-κB Hücre Sinyal Yolakları Üzerindeki Etkileri	49
4.6. CHX ve AZM'nin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Otoagregasyon Etkisi	50
4.7. CHX ve AZM Antimikrobiyallerinin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde <i>E. coli</i> 8739 Suşu Üzerindeki Biyokimyasal Değişimlerinin ATR-FTIR Spektroskopisi ile Tanımlanması	52
4.7.1. Lipid (3100-2800 cm ⁻¹) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler	56
4.7.2. Protein (3300-2800 cm ⁻¹ ; 1800-1500 cm ⁻¹) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler	58
4.7.3. Karmaşık (1500-1200 cm ⁻¹) Bölgede Öne Çıkan Değişimler	59
4.7.4. Karbonhidrat ve Nükleik Asit (1200-900 cm ⁻¹) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler.....	60
4.7.5. Parmakizi (900-650 cm ⁻¹) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler.....	61
5. SONUÇ – TARTIŞMA	63
KAYNAKÇA	73

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Kullanılan Antikorlar.	36
Tablo 3.2. Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması.	37
Tablo 4.1. <i>E.coli</i> 8739 Suşuna Ait Bir IR Spektrumunun Bant Atamaları.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. AZM'nin Kimyasal Yapısı.	6
Şekil 2.2. mRNA'nın Translasyonunu Engelleyen AZM Etki Mekanizmasının Şematik Görünümü.....	7
Şekil 2.3. Azitromisin Hücre Sinyalleşmesi Üzerindeki Etkileri.	8
Şekil 2.4. CHX'in (diglukonat) Kimyasal Yapısı.	11
Şekil 2.5. CHX'in Bilinen Etki Mekanizması.....	12
Şekil 2.6. Flagellumun Şematik Diyagramı.	20
Şekil 2.7. Memeli Hücrelerinde Flagellin Tarafından Sinyal İletimi.	23
Şekil 2.8. Biyofilm Oluşumunda Otoagregasyonun Rolü.....	25
Şekil 2.9. <i>E. coli</i> 'nin Önerilen Otoagregasyon Modeli.	26
Şekil 3.1. BSA Standart Grafiği.	37
Şekil 4.1. <i>E. coli</i> ATCC 8739'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.	40
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> ATCC 8739'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.	41
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> DH5 α 'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.....	42
Şekil 4.4. <i>E. coli</i> DH5 α 'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.....	43
Şekil 4.5. CHX Ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Oksidatif Stresi Arttırır.	44
Şekil 4.6. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Motilite Yeteneğini Azaltır.	45
Şekil 4.7. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Swarm Motilite Yeteneğini Azaltır.	46
Şekil 4.8. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, FliC İfadesini Azaltır.	47
Şekil 4.9. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması <i>E. coli</i> 8739'un HCT-116 Kolon Karsinomu Hücrelerine Adhezyonunu Engeller ve Hücre Canlılığını Azaltır.	49

Şekil 4.10. <i>E.coli</i> 8739 Üzerinde CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, HCT-116 Kolon Karsinomu Hücrelerinin Canlılığını Azaltır.	50
Şekil 4.11. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Hct-116 hücrelerinde FliC ile uyarılan TLR5 yoluyla MAPK'leri ve NF-κB aktivasyonunu baskılar.	51
Şekil 4.12. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması Otoagregasyonu Teşvik Eder.	52
Şekil 4.13. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması Otoagregasyonu Teşvik Eder.	53
Şekil 4.14. Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen <i>E. coli</i> 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (4000–650 Cm-1) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.	54
Şekil 4.15. Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen <i>E. coli</i> 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (3700–2800 Cm-1) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.	56
Şekil 4.16. Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen <i>E. coli</i> 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (1800–650 Cm-1) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.	57
Şekil 4.17. Lipid Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.	58
Şekil 4.18. Lipid İçeriği ve Membran Dinamikleri Hakkında Bilgi Veren Bant Oranlarındaki Değişiklikler.	59
Şekil 4.19. Protein Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.	60
Şekil 4.20. Karmaşık Bölgedeki Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.	61
Şekil 4.21. Karbonhidrat ve Nükleik Asit Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.	62
Şekil 4.22. Parmakizi Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.	63

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%: Yüzde

ATR: Attenuated Total Reflection (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)

AZM: Azitromisin

BSA: Bovin Serum Albumini

CHX: Kloreksidin

CCW: Counterclockwise (Saat Yönünün tersine)

CW: Clockwise (Saat Yönünde)

DHFR: Dihidrofolat Redüktaz

DHPS: Dihidropteroat Sentaz

dH₂O: Distilled Water (Distile Su)

ECL: Enhanced Chemi Luminescence

EPS: Extracellular Polymeric Substances (Ekstraselular Polimerik Maddeler)

FDA: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)

FliC: Flagellin

FTIR: Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)

FQ: Florokinolon

g/L: Litre Başına Gram

G: Glikoz

KA: Katyonik Antiseptikler

IL: İnterlökin

L: Litre

LPS: Lipopolisakkarit

mg: Miligram

mL: Mililitre

NB: Nutrient Broth

NLRC: NOD Benzeri Protein

nm: Nanometre

ns: Non-Significant (Önemsiz)

PI: Propidium iyodür

PVDF: Poliviniliden Florür

PRRs: Pattern Recognition Receptors (Patern Tanıma Reseptörleri)

RT-qPCR: Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

TLR: Toll-like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)

QS: Quorum-Sensing

°C: Santigrat

JNK: c-Jun N-terminal kinaz 1

ERK₁₋₂: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 ve 2

MAMP: Mikropla ilişkili moleküler modeller

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinazları

NF-κB: nükleer faktör-kappa B

1. GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, yaşamı tehdit eden bakteriyel enfeksiyonların yeniden ortaya çıkmasına neden olmakta ve böylece modern tıp uygulamalarını da sınırlandırmaktadır. Yoğun ilaç keşif çabalarına rağmen, etkili antibiyotiklerin sahip olması gereken kimyasal, biyolojik ve farmakolojik karakteristikler, on yıllardır yeni antibiyotik sınıflarının geliştirilememesine neden olmuştur (Tyers ve Wright, 2019:141) Bu hususta, çeşitli biyositlerin bir arada kullanıldığı enfeksiyon önleme stratejileri, bu tür enfeksiyonların önüne geçilmesinde önemlidir. Tek bir etki hedefi olan ilaçların yaygın ve yanlış kullanımı, kaçınılmaz olarak yeni dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olur. Söz konusu antibiyotikler olduğunda, diğer biyolojik veya kimyasal moleküllerle etkili kombinasyonlar yoluyla, mevcut antibiyotiklerin terapötik potansiyelinin yeniden ortaya çıkması, antibakteriyel aktivitenin artması ve direncin önlenmesi söz konusu olabilecektir (Soren vd., 2015: 6236). Antibiyotiklerin başka antibakteriyel ajanlarla kombinasyon tedavisi, yan etkileri en aza indirmek için ilaç dozunu azaltabilir ve böylece toksisite ve direnç gelişimi ile ilgili sorunların üstesinden gelmenin bir yolu olabilir (Soren vd., 2015: 6236). Antibiyotikler arasındaki kombinatoriyal etkiler (Yeh vd., 2006: 491; Brochado vd., 2018: 260), antimikrobiyal peptitler (Yu vd., 2016: 1719) ve virülans faktörlerine sahip antibiyotikler (Rezzoagli vd., 2020: e3000805) kapsamlı bir şekilde tespit edilmiştir. Buna karşılık, dezenfektanlar, koruyucular, antiseptikler ve biyositler olarak kullanılan bileşiklerin antibiyotiklerle kombinasyonel etkileri daha az ilgi görmüştür ve bu alanda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (Brochado vd., 2018: e3000805).

Antimikrobiyaller, tek başına uygulandıklarından farklı olarak, kombinasyon halinde kullanıldıklarında spesifik fizyolojik etkiler gösterebilirler. Antibiyotik-antibiyotik kombinasyonları için kombinasyon etkileri üzerine kapsamlı çalışmalar bulunmakla birlikte, antibiyotiklerin biyosit veya antiseptik olarak kullanılan antimikrobiyallerle kombine etkileri, sistematik olarak araştırılmamıştır (Pietsch vd., 2021: 615618.). Azitromisin (Azithromycin, AZM; $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$) pnömoni gibi solunum yolu enfeksiyonları, klamidya gibi genitoüriner enfeksiyonlar ve tifo gibi enterik enfeksiyonlar için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) onaylı kullanımı bulunan, 1988 yılında ilaç sektörüne kazandırılmış bir antibiyotiktir (Jelic ve Antolović, 2016: 29; Firth ve Prathapan, 2020: 112739). - Antimikrobiyal direnç, günümüzde AZM kullanımını sınırlamaktadır (Firth ve Prathapan, 2020: 112739). İlk olarak 1954'de tanımlanan ve 1970'lerde yaygın olarak kullanılan kloreksidin (Chlorhexidine, CHX; $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) ise, sert yüzey

dezenfeksiyonundan ağız gargaralarına ve ameliyat öncesi cilt hazırlığına kadar çeşitli farklı uygulamalar için formüle edilmiş yaygın olarak kullanılan bir dezenfektan ve antiseptiktir (Bock vd., 2016: 42). Tez çalışmasında, CHX ve AZM kombinasyonunun *Escherichia coli* üzerindeki etkileri, patojenite açısından farklı yönleriyle incelenmiştir.

Bakteriyel patojenite, enfeksiyöz bakteri sayısı, konakçıya giriş yolu ve konak savunma mekanizmaları üzerindeki etkileri açısından tanımlanır. Herhangi bir enfeksiyon için ön koşul, patojenik bakterilerin hedef hücre yüzeyinde moleküler bölgelerle karşılaşmasıdır; daha sonra bakteriler hücreleri kolonize edebilir, çeşitli dokulara geçebilir, konakçı dokuları ve organları istila edebilir ve konakçı enfeksiyonuna neden olmak üzere orada çoğalabilir. Hareketlilik ise, dış uyaranlara yanıt olarak gen ekspresyonlarıyla işbirliği içinde, farklı çevresel koşullara uyum sağlamada kamçıli bakteriler için bir avantajdır (Soutourina ve Bertin, 2003: 512; Fenchel, 2002: 1070). Flagellum aracılı hareketlilik, patojen-konak etkileşimlerini arttırmak ve takiben yapışma ve kolonizasyonu teşvik etmek için gerekli olduğundan bu özellik, flagellanın patogenezdaki ana rolüne katkıda bulunur. Ek olarak, virülans için sadece motilitenin kendisinin mi yoksa bozulmamış kamçının mı gerekli olduğu konusunda devam eden bir tartışma vardır. Swarm hareketliliği, kamçıli bakterilerin konakçı yüzeylerde kolonizasyonu, virülans faktörlerinin artan ifadesi ve antibiyotik toleransı üzerindeki etkisinden dolayı, patojenite ile ilgili bir diğer önemli özelliktir (Irazoki vd., 2017: 1360). Bu çalışmada bakteriyel patojenitenin temel mekanizmalarını oluşturmak üzere AZM ve CHX'in tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkisi, bakteri hareketliliğine, flagellin ifadesine ve otoagregasyona etkileri ile epitel hücrelere tutunma kabiliyeti ve bu hücrelerde flagella ile uyarılan yollara etkileri, çeşitli mikrobiyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Ek olarak, CHX ve AZM'nin tek başına ya da kombine halde kullanıldıklarında *E. coli*'de hücresel biyomoleküllere etkileri, Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) aracılığıyla belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Antimikrobiyal İlaçlar ve Genel Özellikleri

2.1.1. Antibiyotikler ve Sınıflandırılmaları

Antimikrobiyal ajanlar, bulaşıcı hastalıkları kontrol etme ve iyileştirmede kilit rol oynarlar (Abushaheen vd., 2020: 100971). Antimikrobiyal ajanlar, anti-patojenik etkilerini gösterirken farklı mekanizmalar kullanırlar ve bu açıdan bakterisidal ve bakteriyostatik olarak sınıflandırılabilirler (Abushaheen vd., 2020: 100971). Antibiyotikler, bir antimikrobiyal ajan grubudur (Abushaheen vd., 2020: 100971). Waksman antibiyotiği, ‘‘bir mikrop tarafından diğer mikropları yok etmek için üretilen bir bileşik’’ olarak tanımlamıştır (Hutchings vd., 2019:75; Gould, 2016: 573). Waksman'ın çalışmaları, 1940'lardan 1960'lara kadar olan antibiyotik keşfinin ‘‘Altın Çağını’’ başlattı (Hutchings vd., 2019:75; Gould, 2016: 573). Antibiyotikler, 1960'lardaki gelişmeleri takiben insan sağlığının ayrılmaz bir parçası ve hayat kurtarıcı olarak görülmelerine karşın (Butler vd., 2010: 334), antibiyotik keşfinin ilk heyecanından sonra, bakterilerin antibiyotiklere karşı sayısız direnç mekanizması geliştirebildiği ve hatta yayabildiği anlaşılmıştır; diğer bir deyişle yeni bir antibiyotik piyasaya çıktıktan sonra ilk dirençli mikropların gözlemlenmesi uzun sürmemiştir (Mohr, 2016: 240). Günümüzde, bir ya da birden fazla antibiyotiğe dirençli bakteriler, hükümetler ve bilim insanları tarafından dünyanın en acil sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir; bununla birlikte, enfeksiyonların tedavi edilmesi için yeni antibiyotiklerin ve antibiyotik alternatiflerinin keşfi ve geliştirilmesi, kolay süreçler değildir (Butler ve Paterson, 2020: 334).

Antibiyotikleri sınıflandırmanın birkaç yolu vardır, ancak en yaygın sınıflandırma moleküler yapılarına, etki tarzlarına ve aktivite spektrumlarına dayanmaktadır (Etebu ve Ariekpar 2016: 96). Aynı yapısal sınıftaki antibiyotikler genellikle benzer etkinlik, toksisite ve alerjik potansiyel yan etkiler gösterir (Etebu ve Ariekpar 2016: 96). Kimyasal veya moleküler yapıya dayalı bazı yaygın antibiyotik sınıfları arasında beta-laktamlar, makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar, aminoglikozitler, sülfonamidler, glikopeptitler ve oksazolidinonlar bulunur (Etebu ve Ariekpar 2016: 96). Antibiyotiklerin bir diğer sınıflandırılma şekli ise etki mekanizmalarına göre yapılmıştır (Dowling vd., 2017: 539). Bu sınıflandırmaya göre antibiyotikler, hücre duvarı, nükleik asit sentezi, protein biyosentezi, hücre zarı ve metabolik yollara etkileri üzerine kategorize edilmiştir (Dowling vd., 2017: 539).

2.1.1.1. Hücre Duvarının Bozulmuş Sentezi

Peptidoglikan, diğer adıyla murein, bakteri hücre duvarına mekanik stabilite sağlayan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif zarfların son derece korunmuş bileşenidir (Pandey ve Cascella, 2021). Peptidoglikan Gram pozitif bakterilerde kalın (≥ 10 katman), Gram negatif bakterilerde ise ince (bir veya iki katman) yapıdadır (Pandey ve Cascella, 2021). Peptidoglikan yapısı, N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit disakkarit alt birimlerinden oluşan glikan zincirleri şeklindedir; N-asetilmuramik asit kısmı, yüksek oranda korunmuş pentapeptit veya tetrapeptid gövdeleriyle bağlantılıdır (l-alanin–d-izoglutamin–l-lizin–d-alanin–[d-alanin]) (Pandey ve Cascella, 2021).

Beta-laktam antibiyotikler (penisilin, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktam) peptidoglikan oluşturmak üzere çapraz bağlanan peptidlerde yer alan transpeptidazı asilleyerek peptidoglikan sentezindeki son adımı engeller (Eckburg vd., 2019: e00892-19). Beta-laktam antibiyotiklerin eylemlerinin hedefleri, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) olarak bilinir (Eckburg vd., 2019: e00892-19). Bu bağlanma terminal transpeptidasyon sürecini kesintiye uğratar ve ayrıca bakteri hücresi içindeki otolitik süreçler yoluyla canlılık kaybına ve lizise neden olur (Eckburg vd., 2019: e00892-19; Naqvi, 2022: 61).

2.1.1.2. DNA Replikasyonunun İnhibitörleri

Florokinolon (FQ) gurubu antibiyotikler, bakteriyel tip II topoizomerazlar olan topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek bakteriyel DNA replikasyonunu bloke ederler ve bu nedenle bakterisidal etkili antibiyotiklerdir. Bir diğer özellikleri, hücre membranlarından kolayca geçebildikleri için, hücre içindeki hedeflerine hızla ulaşabilmeleridir (Kapoor vd., 2017: 300).

2.1.1.3. Hücre Zarının Değiştirilmesi

Plazma zarı, bir fosfolipid çift tabakası olarak bakterinin bütünlüğü için hayati önem taşır. Membranın lipid kısmı, yüklü bileşiklere karşı dirençlidir (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298). Bununla birlikte, birçok iyonun, şekerin ve amino asidin pasif taşınması için çift tabakada porin olarak adlandırılan kanallar bulunur (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298). Bu moleküller, sitoplazma ile dış hücre zarları arasında kalan kısım olan periplazmada yer alır (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298). Periplazma, iç sitoplazmik zar ile Gram negatif bakterilerde periplazmik boşluk olarak adlandırılan bakteriyel dış zar arasındaki boşlukta bulunan matristir ve hücre dışı kimyasal

sinyallere yanıt oluşturulması, substrat bağlanması veya hidroliz için gerekli birçok protein içerir (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298). Bakterinin dış membran, periplazma ve sitoplazma arasındaki bu biyokimyasal sinyal yolu, bakteri plazma zarının bütünlüğünü değiştiren antibiyotikler tarafından yok edilir (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298). Membrandaki değişiklik, bakteride ciddi yapısal hasara neden olarak hücre ölümü ile sonuçlanır (Kohanski vd., 2010: 429; Naveed vd., 2020:298).

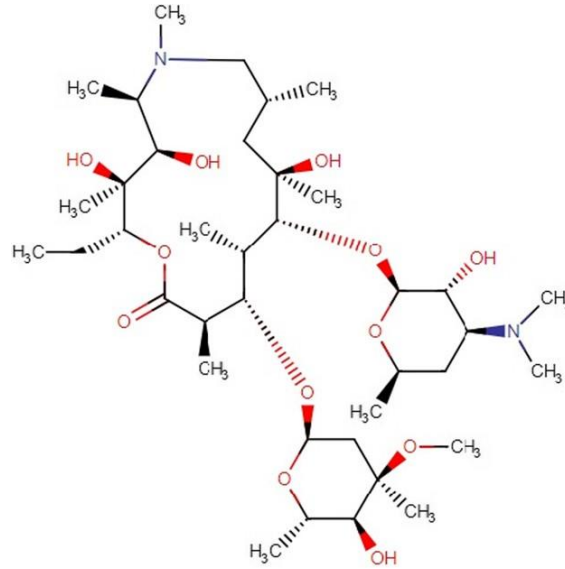
2.1.1.4. Metabolik Yolların/Bakteriyel Enzimlerin İnhibisyonu

Ökaryotik hücrelerin folatı aktif bir taşıma sistemi ile alması ve mikroorganizmaların *de novo* sentez yolu ile folata ihtiyaç duyması, folat biyosentetik yolunu antibiyotikler için çok iyi bir hedef haline getirmiştir (Abushaheen vd., 2020: 100971). Folat sentezinde dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimi, para-aminobenzoik asite (PABA) ihtiyaç duyar (Abushaheen vd., 2020: 100971). Sülfonamidler, yapı olarak PABA ile benzerdir ve folat havuzunu tüketerek bakteri üremesini engellemek için alternatif bir substrat, rekabetçi bir inhibitör olarak işlev görür (Abushaheen vd., 2020: 100971). Diaminopirimidin antibiyotikleri, sentez yolundaki son enzim olan dihidrofolat redüktaz (DHFR) için bir inhibitör olarak kullanılmıştır (Abushaheen vd., 2020: 100971).

2.1.1.5. Protein Biyosentezinin Bozulması: Bir Makrolid Olarak Azitromisin

Aminoglikozitler (örn. streptomisin, gentamisin) gibi antibiyotikler, ribozomun 30S alt birimine geri dönüşümsüz olarak katılarak translokasyonu durdurur ve ayrıca mRNA'nın yanlış okunmasına yol açarlar (Verma, 2022: 131380). Bir tetrasiklin antibiyotiği olan doksisisiklin, ribozomun 30S alt birimine geri dönüşümlü olarak bağlanır, bu da 30S alt biriminin aminoaçil-t-RNA'sı ile 70S ribozom alt biriminde bulunan alıcı site arasında baė oluşumunu engeller (Verma, 2022: 131380). Spektinomisin antibiyotikleri, mRNA ile 30S ribozom alt birimi arasındaki etkileşime geri dönüşümlü olarak müdahale eder. Oksazolidinon antibiyotikleri 70S ribozom alt biriminin oluşumunu engeller (Verma, 2022: 131380). Makrolidler, ribozom hedefli antibiyotiklerin en başarılı sınıflarındandır (Verma, 2022: 131380). Makrolid antibiyotiklerinin endikasyonları, söz konusu spesifik makrolid antibiyotiğine bağlıdır (Loree and Lappin, 2021). Bu sınıf içinde üç ana antibiyotik vardır: eritromisin, klaritromisin ve azitromisin. Makrolid ailesinin ilk tanımlananı olan eritromisin A, 1952'den beri klinik kullanımdadır. Eritromisin, Gram pozitif ve bazı Gram negatif mikroorganizmalara karşı aktiftir ve solunum, yumuşak doku enfeksiyonları, gastrointestinal ve genital sistem enfeksiyonlarının yanı sıra deri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Jelić ve Antolović, 2016: 29). Eritromisin A'nın asidik stabilitesini ve oral biyoyararlanımını

iyileştirmek için, spiramisin, roksitromisin, diritromisin ve klaritromisin gibi ilk nesil doğal veya yarı sentetik makrolidler tasarlanmış ve tıbbi uygulamalarda kullanılmıştır (Jelić ve Antolović, 2016: 29). Makrosiklik halkaya yerleştirilmiş bir bazik nitrojen atomu ile karakterize edilen azitromisinin keşfi ise, makrolid antibiyotik çağında bir atılımı temsil etmiştir (Jelić ve Antolović, 2016: 29). Bu nitrojen ilavesi, etki mekanizmasında herhangi bir değişiklik olmaksızın stabiliteyi arttırmıştır (Lipsky ve Hoey, 2009: 1545). İkinci amin grubunun eklenmesi ise, daha fazla doku penetrasyonu ve daha uzun bir yarı ömür dahil olmak üzere eritromisine göre önemli avantajlar sağlamıştır (Lipsky ve Hoey, 2009: 1545). Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO) temel ilaçlar listesinde yer alan azitromisin, dünya çapında büyük ölçekte üretilir ve en çok kullanılan antibiyotiklerden biridir (Oliver ve Hinks, 2021: e2163; Khoshnood vd., 2022: 112682).

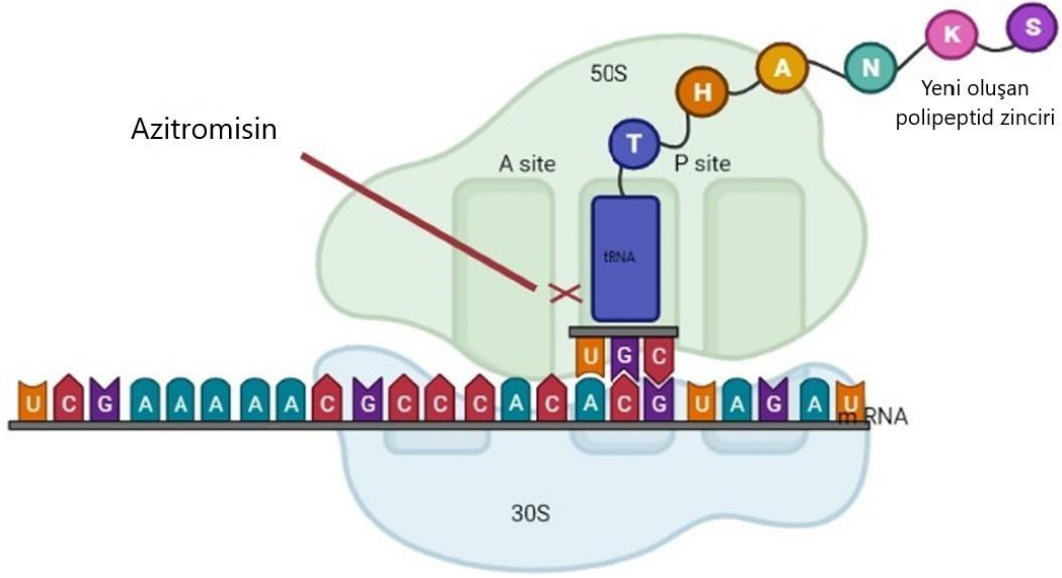


Şekil 2.1. AZM'nin Kimyasal Yapısı.

Kaynak: (Parnham vd., 2014: 229)

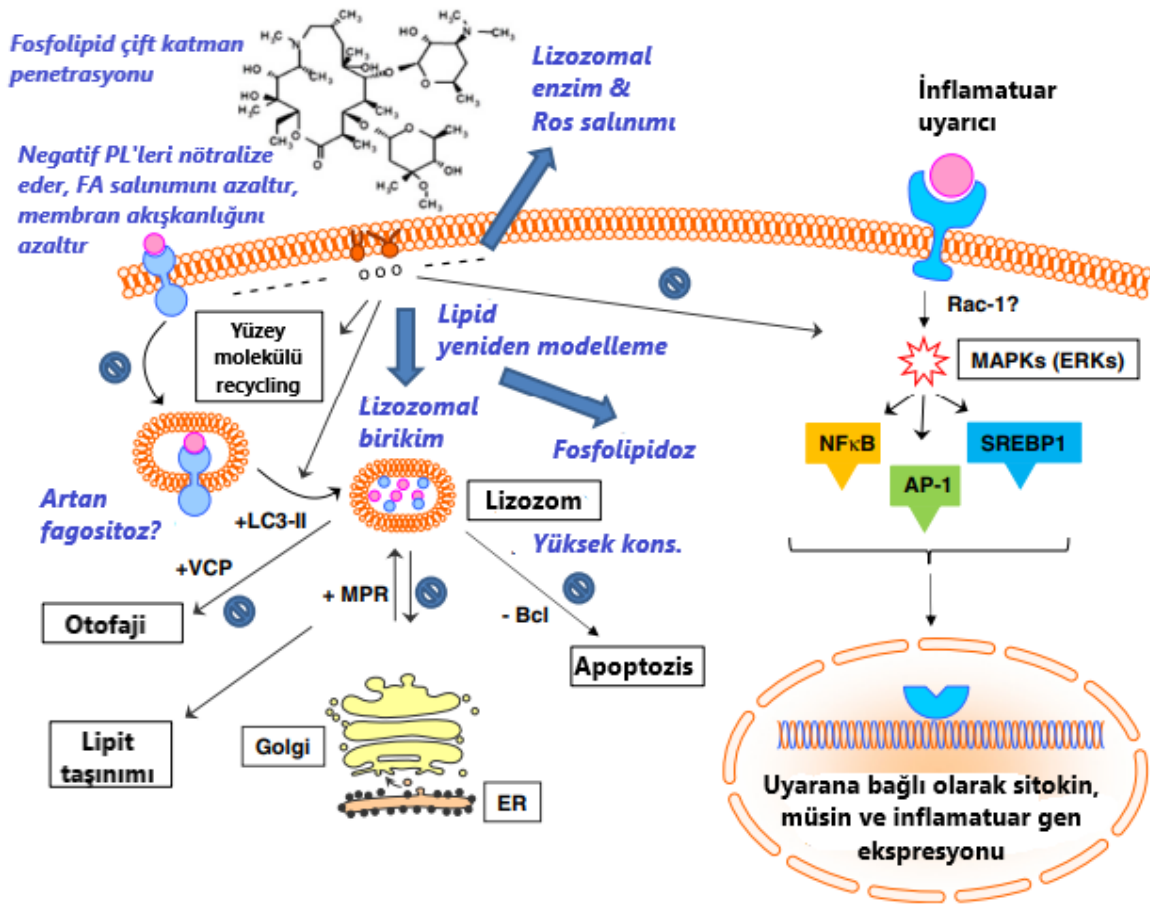
Azitromisin (AZM), 1980'lerden beri solunum, ürogenital, dermal ve birçok başka bakteriyel enfeksiyonu tedavi etmek için başvurulan ikinci nesil, geniş spektrumlu, yarı-sentetik bir makrolid antibiyotiktir. Ayrıca kronik inflamatuvar bozukluklarda immünomodülatör etkiler gösterir (Parnham vd., 2014: 229). AZM, 50S ribozom alt birimine bağlanarak peptidil-tRNA'nın yer değiştirmesini önler, 23S rRNA ile etkileşerek 50S alt birimlerindeki peptid çıkış kanalını bloke eder ve ribozomların eksik polipeptitler üretmesine neden olur (Derbie vd., 2020: 2; Khoshnood vd., 2022: 112682). Protein sentezindeki azalma, makrolid konsantrasyonundaki artışla ilişkilidir. AZM, yeni oluşan peptid çıkış tüneli olarak adlandırılan 23S rRNA'daki peptidil transferaz merkezine yakın bir yere bağlanır ve onu

kısmen tıkar. Güncel bulgular, yeni oluşan peptidin içeriğinin, peptid çıkış tüneline geçişe izin verilme olasılığını değiştirmede önemli bir rolü olduğunu, yani AZM'nin geçişi tamamen kapatmadığını göstermektedir: bazı yeni sentezlenen peptidlerin tünelden çıkışına izin vererek protein sentezine müdahale edebilirler. Dolayısıyla, global translasyon inhibisyonundan ziyade translasyonun, seçici bir şekilde etkilenmesi söz konusudur. (Heidary vd., 2022: e24427; Vázquez ve Mankin, 2018: 270).



Şekil 2.2. mRNA'nın Translasyonunu Engelleyen AZM Etki Mekanizmasının Şematik Görünümü

Kaynak: (Heidary vd., 2022: e24427)



Şekil 2.3. Azitromisin'in Hücre Sinyalleşmesi Üzerindeki Etkileri.

Azitromisin, hücre zarı çift tabakasına nüfuz eder ve zarı stabilize ederek akışkanlığı azaltır. Azitromisinin katyonik kısmı, zarın iç yaprakçığındaki negatif yüklü fosfolipitlere çok yaklaşarak yüklerini nötralize eder. Bu, yağ asidi salınımının azalmasına ve ayrıca elektrostatik yük ile membrana bağlı enzimlerin serbest kalmasına neden olur. Lipid yeniden modellemesi, AP-1 ve NFκB dahil olmak üzere transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun müteakip inhibisyonu ile ERK_{1/2} (muhtemelen Rac-1'i içeren) gibi özellikle MAPK kinazları olmak üzere sinyal yollarının modülasyonuna yol açar. En çok etkilenen sinyal yolunun, belirli bir hücreye, aktivasyon durumuna ve aktive edildiği uyarana bağlı olması muhtemeldir. Lizozomal enzim salınımı ve nötrofillerin oksidatif patlamasının ilk indüksiyonu, membran lipidleri üzerindeki etkilerin bir sonucudur. Membran lipid yeniden modellemesi ayrıca yüzey molekülü geri dönüşümünü ve muhtemelen fagositozu bozar. Negatif yüklü fosfolipidlere bağımlı moleküller de etkilenir, buna LC3-II dahildir ve lizozomal alım ve otofaji üzerindeki müteakip etkiler. İkincisi, zamanla azitromisin VCP'ye düşük afiniteli bağlanmasından da etkilebilir. Azitromisin lizozomlarda birikir, enzimlerin ve lipidlerin MPR taşınmasını modüle eder ve lizozom zarlarında lipid yeniden şekillenmesi yoluyla sonuçta fosfolipidoza yol açar. Apoptoz, muhtemelen apoptozu inhibe eden Bcl moleküllerinin etkisini tehlikeye atarak, yüksek konsantrasyonlarda azitromisin tarafından indüklenebilir. [Ø engellemeyi gösterir].

Kaynak: (Parnham vd., 2014: 229)

2.1.2. Antiseptikler ve Sınıflandırılmaları

Antiseptiklerin kullanımı, Ignaz Semmelweis'in uygun el yıkama tekniklerinin kullanımıyla lohusalık sepsisinde dramatik azalmayı belgelediği 1840'lara kadar uzanır (Echols vd., 2017: 671). Antiseptikler, tüm biyolojik materyaller için toksik olan ve ağartıcılar gibi temizlik maddeleri olarak geliştirilmiş ajanlardır (Cambiaso-Daniel vd., 2018: 2). Daha sonraları ise klinik ortamlarda, kateter kullanımında dezenfeksiyon amaçlı uygulanmıştır. Antiseptikler, canlı doku içinde veya üzerinde mikroorganizmaların büyümesini yok eden veya inhibe eden biyositler olarak tanımlanır (Vestby ve Nesse, 2015:1). Antiseptik ajanlar antibiyotiklerden üç açıdan farklıdır: (1) antiseptikler topikal olarak kullanılır ve sistemik olarak verilemez, (2) birden fazla etki mekanizmasına sahiptirler ve (3) bakteriyostatik/bakterisidal aktiviteleri dakikalar yerine saniyeler içinde gerçekleşir. Antibiyotik tedavisine kıyasla kronik bir yaranın tedavisi için bir antiseptik kullanmanın önemli bir avantajı, bakteriyel dirence neden olma riskinin yok denecek kadar düşük olmasıdır (Leaper, 2015: 356). Ancak dirençli organizmaların seçilmesi için teorik bir risk olmasına rağmen, bugüne kadar tedavi edilemez enfeksiyona neden olan antiseptik dirençli insan patojeni tanımlanmamıştır (Jakobsen vd., 2011: 454). Antiseptiklerin etki mekanizması, akış (efflux) pompalarının bozulması, hücre duvarına ve sitoplazmik süreçlere hasar ve nükleer bozulma gibi bakteriyel metabolizmanın çeşitli yönlerine toksisite yoluyla (Leaper vd., 2012: 5; Leaper, 2011: 547). Günümüzde, klinik kullanımda dört ana topikal antiseptik sınıfı vardır: emülgatörler, oksitleyiciler, asitler ve ağır metaller. Bu ajanlar antimikrobiyal spektrumları, penetrasyon özellikleri ve toksisiteleri bakımından farklılık gösterir.

2.1.2.1. Oksitleyiciler

Bu ajanlar biyofilmleri, hücre duvarlarını, sitoplazmik membranları, proteinleri ve DNA'yı parçalamak için bir serbest radikal aracı olarak çalışır ve demir gibi hücre içi metalleri oksitleyebilir. Bu bileşikler geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Ancak, yüksek reaktiviteleri ve konak toksisitesi nedeniyle dar bir terapötik indekse sahiptirler ve konak toksisitesini sınırlamak için özen gösterilmelidir (Cambiaso-Daniel vd., 2018: 5).

2.1.2.2. Asitler

Zayıf asitler insanlık tarihi boyunca yara bakımı için kullanılmıştır. Modern yanık yönetiminde asetik asit, bal ve borik asit yara bakımında kullanılan başlıca asidik antiseptiklerdir (Cambiaso-Daniel vd., 2018: 8).

2.1.2.3. Ağır metaller

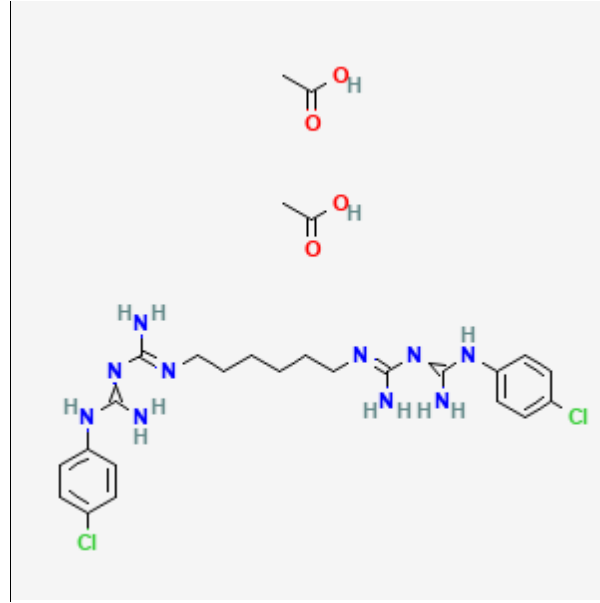
Ağır metal antiseptikleri sınıfı esas olarak iyonik gümüş, bizmut, bakır iyonları ve cıva olmak üzere dört metalden oluşur. Örneğin bunlardan iyonik gümüş, yanık yarası tedavisinde en yaygın olarak uygulanan antimikrobiyaldir (Cambiaso-Daniel vd., 2018: 10).

2.1.2.4. Emülgatörler: Bir biguanide olarak kloleksidin

Emülgatörler, hücre duvarlarını ve sitoplazmik zarları bozan geniş bir bileşik yelpazesidir. Bu bileşiklerin hidrofobik kısımları lipit çift tabakasına girer ve polar iyonik bölgeleri suda çözünür kanalların oluşumunu ve ayrıca hidrofobik lipit zarları suda çözünür yapan misel oluşumunu teşvik eder. Böylece hücresel canlılığın sağlanması için gerekli olan sitoplazmik içerikler ve iyonlar sızar: patojen lizis edilmiş olur. (Cambiaso-Daniel vd., 2018: 3). Katyonik antiseptikler (KA) emülgatörlerin en yaygın kullanılan grubudur. Sağlık hizmetlerinde KA kullanımının uzun geçmişine rağmen, etkilerinin moleküler ayrıntıları detaylı olarak aydınlatılamamıştır (Fox vd., 2022: kuab074). KA'ların antimikrobiyal etkisi, 1950'lerde etki hızı ve hücre lizisi ile karakterize edilmiştir. Genellikle negatif yüklü bakteri hücre duvarlarının KA'nın ana hedefi olduğu varsayılır. KA'lar, spesifik moleküler hedeflere sahip bazı antimikrobiyal peptitlerin ve antibiyotiklerin aksine hücre zarlarının membran yapısı ve bütünlüğü gibi toplu fiziksel özelliklerini etkiler (Fox vd., 2022: kuab074). Katyonik biyositlerin önemli bir etkisi, bakteri zarlarında büyük miktarlarda ve Gram-pozitif sitoplazmik zarlarda en büyük yüzdede bulunan fosfatidilgliserol (PG) ve kardiyolipin (CL) gibi anyonik lipidleri kümelemesidir. Anyonik lipidlerin kümelenmesi, mevcut alanları bozabilir ve kümelenmiş fazlar arasındaki sınırdaki kusurlara neden olabilir (Fox vd., 2022: kuab074). Lipidlerin kümelenmesi ayrıca lipid faz geçişlerinde ve membran akışkanlığında değişikliklere yol açabilir. (Fox vd., 2022: kuab074).

Biguanidler, biyosidal özelliklere sahip katyonik emülgatörlerdir. Kloleksidin sadece en yaygın kullanılan biguanid değil, dünya çapında en yaygın kullanılan antiseptiklerden biridir ve WHO tarafından yayınlanan temel ilaçlar listesinde yer almaktadır (Cambiaso-Daniel vd., 2018:2). Kloleksidin (CHX), ilk olarak 1950'lerin başında Imperial Chemical Industries tarafından sıtmaya karşı aktif ajanların belirlenmesi için yapılan geniş bir tarama çalışması kapsamında Büyük Britanya'da sentezlenmiştir (Lim ve Kam, 2008: 510; Kampf, 2018: 458). Davies ve arkadaşları tarafından, "Hibitane" adı altında "yüksek potansiyelli yeni bir antibakteriyel ajan" olarak tanıtılmıştır (Davies vd., 1954: 192). O zamandan beri CHX, 1960'ların sonlarında diş hekimliğine tanıtılmadan önce çeşitli tıbbi alanlarda (örneğin üroloji, jinekoloji, oftalmoloji, kulak burun boğaz) ve cerrahi ortamların dezenfeksiyonu için yaygın

olarak kullanılmıştır (Gjermo, 1974: 146). Genel olarak, belirli bir antiseptik veya biyositin birincil etki mekanizmasını, etkinin bir sonucu olarak ortaya çıkan ikincil etkilerden ayırt etmek zordur (Maris, 1995: 49). CHX'in genellikle düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik bir ajan olarak etki gösterdiği ve daha yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal olduğu tanımlanmaktadır (Jones, 1997: 57). Antibakteriyel etki mekanizması, bakteri zarlarının zarar görmesi ve ardından sitoplazmik bileşenlerin sızıntısı olarak tanımlanmaktadır (McDonnell ve Russell, 1999: 161; Gilbert ve Moore, 2005: 704).

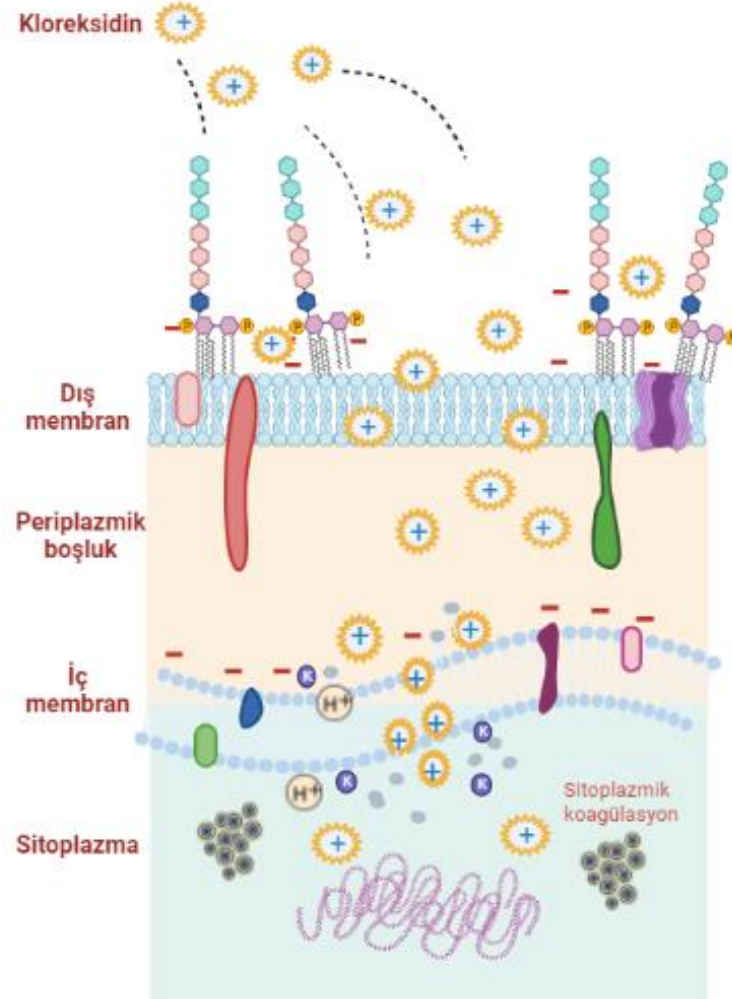


Şekil 2.4. CHX'in (asetat) Kimyasal Yapısı.

Kaynak: (National Center for Biotechnology Information 2022)

CHX'in birinci sıra hedefleri (düşük konsantrasyonlarda) sitoplazmik membran bütünlüğünün yanı sıra membrana bağlı enzimlerin işlevi iken, ikincil etkiler (daha yüksek konsantrasyonlarda) sitoplazmik sızıntı ve nihayetinde proteinler ve nükleik asitler gibi hücre içi bileşenlerinin etkilenmesidir (Denyer ve Stewart, 1998: 263; McDonnell ve Russell, 1999: 161; Gilbert ve Moore, 2005: 704). Sitoplazmik membranlar CHX'in ana etki bölgeleri olduğundan, Gram negatif bakterilerdeki dış zar, CHX için bir geçirgenlik bariyeri görevi görebilir ve antibakteriyel etkinliğini sınırlayabilir. Örneğin, katyonik CHX molekülleri, negatif yüklü lipopolisakkarit bölgeleri ile etkileşimler nedeniyle dış zarda "kilitlenebilir" ve bu nedenle sitoplazmik zara bile ulaşamayabilir (Cheung ve diğerleri, 2012: e36659). Alt-inhibitör konsantrasyonlarda CHX'in bakteriyostatik etkilerine ilişkin çalışmalar ise çok azdır. KA'lere veya antibiyotiklere benzer olarak, CHX'in alt-inhibitör konsantrasyonlarında, sitoplazmik membran çevresinde osmoregülasyon kaybı, taşıma ve difüzyon aktivitesi ile ilgili süreçlerin bozulması, proton hareketi ve oksidatif stres ile birlikte DNA hasarına bağlı

olarak SOS yanıtlarının tetiklenmesi ve ardından hataya açık DNA replikasyonunun indüklenmesi gibi çoklu ve karmaşık etkileri olabilir (Andersson ve Hughes, 2014: 470; Tezel ve Pavlostathis, 2015: 298) .



Şekil 2.5. CHX'in Bilinen Etki Mekanizması.

Bakteri hücre duvarı negatif yüklüdür. Dikyonik pozitif yüklü klorheksidin, fosfat içeren bileşiklere spesifik ve güçlü adsorpsiyon ile negatif yüklü bakteri hücre duvarına çekilir. Bakteri hücre dış membranının bütünlüğünü değiştirerek periplazmaya çekilir. Daha sonra iç zardaki fosfolipidlere bağlanarak, potasyum ve proton iyonları gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin sızıntısına sebep olur. CHX konsantrasyonunun artmasıyla zarda ilerleyici hasar oluşur. Adenozin trifosfat ve nükleik asitleri içeren fosfat komplekslerinin oluşumu sitoplazmanın pıhtılaşmasına ve çökmesine neden olur. Hücrelerin sitoplazması kimyasal olarak çökeltir ve geri döndürülemeyen bakterisidal etki meydana gelir.

Kaynak: (Balagopal vd., 2013: 270; Fox vd., 2022: kuab074) biorender.com aracılığıyla çizilmiştir.

2.2. Antimikrobiyel Uygulamalarda Sinerjistik Kombinasyonlar

2.2.1. Antimikrobiyel Direnç ve Mekanizmaları

Antibiyotik direnci, bakterilere karşı antibiyotik kullanımının kaçınılmaz bir sonucudur ve önemli bir küresel sorundur. Bakteriler tarafından sergilenen antibiyotik direnci içsel veya kazanılmış (ikincil) olabilir (Lee, 2019: 182). İçsel direnç, bakterinin doğal özelliklerinden dolayı sergilenen direnç olarak tanımlanır. İçsel direnç örnekleri, Gram negatif bakteri hücre zarfında bulunan dış zarın geçirimsizliği nedeniyle Gram negatif bakteriler tarafından sergilenen glikopeptid direncini içerir. Daha tehlikeli olan ikincil direnç, bakterilerin bir zamanlar onlara karşı etkili olan antibiyotiklerin etkisine dayanma yeteneğidir (Nicolaou ve Rigol, 2018: 162). Antimikrobiyal direnç mekanizmaları dört ana kategoriye ayrılır: (1) antibiyotik alımının sınırlandırılması; (2) antibiyotik hedefinin değiştirilmesi; (3) antibiyotiğin etkisiz hale getirilmesi; (4) aktif antibiyotik akışının engellenmesi. İçsel direnç, alımı, antibiyotik inaktivasyonunu ve akışını sınırlama mekanizmalarını kullanabilir. Kazanılmış dirençte ise söz konusu mekanizmalar hedef modifikasyonu, antibiyotik inaktivasyonu ve akışının engellenmesi olabilir (Reygaert, 2017: 82; Reygaert, 2018: 482). Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında kullanılan direnç mekanizmaları farklılık gösterir. Gram negatif bakteriler yukarıda belirtilen dört ana mekanizmanın her birinden yararlanırken, Gram pozitif bakteriler ilacın alımının sınırlandırılması mekanizmasını, lipopolisakkarit (LPS) temelli dış zara sahip olmadıklarından kullanamazlar (Reygaert, 2017: 82; Reygaert, 2018: 482).

2.2.1.1. Alımın Sınırlandırılması

Klinik uygulamada kullanılan antibiyotiklerin çoğu hücre içi hedeflere sahiptir. Gram negatif bakteriler söz konusu olduğunda ise etki, sitoplazmik zarıda (iç zar) ortaya çıkar. Bu nedenle bileşik, antimikrobiyal etkisini göstermek için dış ve/veya sitoplazmik membrana nüfuz etmelidir. Bakteriler, antimikrobiyal molekülün alımını azaltarak antibiyotiğin hücre içi veya periplazmik hedefine ulaşmasını önlemek için mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizma özellikle Gram negatif bakterilerde önemlidir (Munita ve Arias, 2016: 5). Beta-laktamlar, tetrasiklinler ve bazı florokinolonlar gibi hidrofilik moleküller, bu bariyeri geçmek için sıklıkla porinleri kullandıklarından, dış zarın geçirgenliğindeki değişikliklerden özellikle etkilenirler (James ve Winterhalter, 2008: 894). Bu doğal bariyerin etkinliğinin başlıca örneği, bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin, dış zardan penetrasyon olmaması nedeniyle Gram negatif bakterilere karşı aktif olmamasıdır. Benzer şekilde, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter baumannii*'nin β -laktamlara (*Enterobacteriaceae* ile karşılaştırıldığında) düşük

duyarlılığı, en azından kısmen, porinlerin sayısının ve/veya ifade düzeylerinin değişmesiyle açıklanabilir (Hancock ve Brinkman, 2002: 20).

2.2.1.2. Hedefinin Değiştirilmesi

Hedef modifikasyonu, bir hedef bölgenin mutasyonundan veya bazı düzenleyici bileşiklerin eklenmesinden kaynaklanabilir ve bu şekilde antibiyotiklerin hedefle etkileşimine izin verilmez (Dubey ve Sharma, 2020: 2000168). Çoklu allel kodlayan genlerdeki mutasyon, yüksek frekanslı rekombinasyon yoluyla mutant dirençli genlerin seçilmesine izin verir. Örneğin 23S RNA, antibiyotik linezolidin hedefidir ve mutant allel seçimi, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*'de direnç gelişimine neden olur (Dubey ve Sharma, 2020: 2000168). Çoğunlukla plazmit tarafından kodlanan bazı düzenleyici proteinler de hedefi modifiye edebilir: örneğin, 16S ribozomal RNA'nın metilasyonunu gerçekleştiren metiltransferaz yapı modifikasyonu yolu ile makrolidlerin etkisi engellenir (Dubey ve Sharma, 2020: 2000168). Direnç, antibiyotiklerin yapısını doğrudan değiştiren veya hedef gruplarla etkileşime giremeyecek şekilde bozan genlerin/enzimlerin etkisiyle de ortaya çıkabilir. Örneğin antibiyotik hidrolizi veya yapı modifikasyonu, hedefe ulaşmayı engeller (Dubey ve Sharma, 2020: 2000168).

2.2.1.3. İnaktivasyonu

β -laktamazlar, aminoglikozid değiştirici enzimler ve kloramfenikol asetiltransferazlar (AAC'ler), antibiyotikleri inaktive eden üç ana enzimdir (Dockrell vd., 2004: 479).

β -laktamazlar, örneğin penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler gibi ester ve amid bağına sahip neredeyse tüm β -laktamları hidrolize eder. Bugüne kadar yaklaşık 300 β -laktamaz bilinmektedir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygın olarak TEM-1, SHV-1 penisilinazları bulunmaktadır. Bunlar, geniş spektrumlu β -laktamazların (ESBL) progenitörleri olan sefalosporine karşı aktivitesi çok az olan veya hiç olmayan penisilinazlardır (Rice vd., 2003: 1087). ESBL, sefalosporinin hidrolizine sebep olan amino asit ikamesi nedeniyle substrat profilini değiştiren enzimlerdir (Ma vd., 2005: 34).

Aminoglikozidler fosforil-transferazlar, nükleotidil-transferazlar ve kloramfenikol asetiltransferazlar gibi spesifik enzimler tarafından nötralize edilir. Bu aminoglikozid değiştirici enzimler modifiye edilmiş bir molekülün afinitesini azaltarak 30S ribozomal alt ünitesine bağlanmayı engeller ve aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı genişletilmiş spektrum direnci sağlarlar (Strateva ve Yordanov, 2009: 1142; Maurice vd., 2008: 345).

Kloramfenikol-asetil-transferazlar ise kloramfenikolün hidroksil gruplarını asetiller ve bu şekilde modifiye edilmiş kloramfenikol, ribozomal 50S alt birimine fonksiyonel şekilde bağlanamaz. Bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteri ve bazı *Haemophilus influenzae* suşları kloramfenikole bu şekilde direnç gösterir (Tolmasky, 2000: 11).

2.2.1.4. Akışın Engellenmesi

Akış pompaları, toksik molekülleri hücre dışına pompalayabilen sitoplazmik zar üzerinde bulunan enerjiye bağlı kompleks bakteri sistemleridir. Tetrasiklini bakteri hücrelerinden dışarı pompalayan ilk dışa akış pompası, 1980'de *E. coli*'de tarif edilmiştir (Ball vd., 1980:76; McMurry vd., 2006: 3975). O zamandan beri, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncine dahil olan çok sayıda akış sistemi örneği tanımlanmıştır. Çoğu dışa akış sistemi birbiriyle ilgisiz birden fazla maddeyi taşıyabilir (Nikaido ve Pagès 2012: 355) ve çoklu ilaç direncine neden olabilir (Piddock, 2006: 385; Piddock, 2006: 630). Çoklu ilaç akış mekanizmaları neredeyse değişmez bir şekilde kromozomal olarak kodlanmıştır ve bazı durumlarda bakterilerin spesifik antibiyotiklere karşı içsel direncini açıklayabilir. Bununla birlikte, çoklu ilaç akış mekanizmalarının bakterilerde geniş ölçüde korunmasına rağmen, sadece birkaçı klinik olarak anlamlı antibiyotik direnci sağlar. Klinik direnç genellikle artan pompa ekspresyonuna veya gelişmiş pompa etkinliğine yol açan mutasyonların sonucudur (Piddock, 2006: 385; Piddock, 2006: 630). Substrata özgü akış pompalarını kodlayan genler ise, mobil genetik elemanlar üzerinde yer alma eğilimindedir (Fernández ve Hancock, 2012: 15; Poole, 2005: 32). Substrata özel akış pompalarının örnekleri arasında tetrasiklinler, makrolidler ve kloramfenikol için özel olanlar yer alır (Poole, 2005: 32).

Antibiyotik direncinin gelişmesiyle ilgili artan endişeler karşısında, tek ilaçlı klinik tedavi stratejileri yeterli olmayabilir. Bilimsel literatüre ve klinik olarak kanıtlanmış önerilere ve tedavilere dayanarak, kombinasyon yaklaşımlarının, çoklu ilaç direnciyle mücadelede daha etkili olduğu görülmüştür (Chen vd., 2004: 264; Worthington ve Melander, 2013: 180; Tamma vd., 2012: 462; Wu ve Grainger, 2006: 2457).

2.2.2. Antibiyotik Direncinde Antimikrobiyal Ajanların Kullanımı

Son birkaç on yılda, dünya çapında sağlık merkezleri için büyük bir sorun haline gelen antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeniyle, çoklu ilaca dirençli bakteri türlerinin sayısı önemli ölçüde artmıştır. Farklı etki mekanizmalarına sahip yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine rağmen, yeni ilaç keşif ve geliştirme süreçleri genellikle on yıldan fazla

sürmektedir ve başarı oranı %10'dan düşüktür (Ashburn ve Thor, 2004: 675; Spellberg vd., 2013: 300; Almaaytah vd., 2016: 499). Ayrıca, tek bir etki hedefi olan yeni ilaçların yaygın kullanımını ve yanlış kullanımını kaçınılmaz olarak yeni dirençli suşları yeniden ortaya çıkacaktır. Bu nedenle, diğer biyolojik veya kimyasal moleküllerle etkili kombinasyonlar yoluyla mevcut antibiyotiklerin terapötik potansiyelini yeniden canlandırmak, antibakteriyel aktiviteyi iyileştirmeye ve direncin ortaya çıkmasını önlemeye yönelik bir yaklaşımı temsil eder (Soren vd., 2015: 6236). Spesifik bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele etmek için antiseptikler ve antibiyotikler arasındaki farmakodinamik sinerjiden yararlanan çoklu ilaç tedavi stratejileri araştırılmaktadır (Müller ve Kramer, 2008: 1283). Farmakodinamik sinerjizm, antiseptik ve antibiyotik kombinasyonunun mikrobiyal hedef üzerinde, ilaçların tek tek etkilerinin toplamından daha büyük bir etkisi olduğunda ortaya çıkar (Guillemot, 1999: 495). Geçmişte ve günümüzde yaygın antibiyotik kullanımı, dirençli insan patojenlerinin oluşumunda endişe verici bir artışa yol açarken, belirli bir hedefi olmayan antiseptiklerin dirençli patojenlere neden olma olasılığı düşüktür (Wales ve Davies, 2015: 569).

Antibakteriyel ajanlarla kombinasyon tedavisi, yan etkileri en aza indirmek için antibiyotik dozunu azaltabilir ve böylece toksisite ve direnç gelişimi ile ilgili sorunların üstesinden gelmenin bir yolu olabilir (Soren vd., 2015: 6236). Antibiyotikler arasındaki kombinatoriyal etkiler (Yeh vd., 2006: 491; Brochado vd., 2018: 260), antimikrobiyal peptitler (Yu vd., 2016: 1719) ve virülans faktörlerine sahip antibiyotikler (Rezzoagli vd., 2020: e3000805) kapsamlı bir şekilde haritalanmıştır. Buna karşılık dezenfektanlar, koruyucular, antiseptikler ve biyositler olarak kullanılan bileşiklerin antibiyotiklerle kombinasyonel etkileri daha az çalışılmıştır ve bu alanda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu ortadadır (Brochado vd., 2018: e3000805).

2.3. Bakteriyel Patojenitede Motilitenin Önemi

2.3.1. Bakteriyel Motilite

Yüzeyler, birçok bakteri türü için doğal yaşam alanıdır: bakterilerin yakın suşlarla işbirliği yapmasını, diğer mikroorganizmalarla rekabet etmesini, karmaşık biyofilmler oluşturmasını, insanlarla ve diğer ökaryotik konaklarla arayüz oluşturmasını sağlar (Nan ve Zusman, 2016: 188). Herhangi bir hareketlilik mekanizması aktif ya da pasif olabilir. Aktif hareketlilik, bakterilerin gittikleri yeri yönlendirebilecekleri enerjiye bağlı bir mekanizma gerektirir. Pasif hareketlilik, hareket oluşturmak için çevreyi modüle etmeye bağlıdır (Henrichsen, 1972: 500; Pollitt ve Diggle, 2017: 2944). Aktif motilite, pasif motiliteden genel olarak iki şekilde ayırt edilir: (1) Sadece bilinen bir motilite formuyla ilişkili önceden

tanımlanmış özelliklere sahip olunması (örneğin, bir bakteri hücresinde flagella gözlemlenmesi, bunun yüzme motilitesi olabileceğini düşündürür), (2) Gösterilen hareketin sadece aktif hareketlilik ile açıklanabileceği durumun söz konusu olması (örneğin, yüzen bakterinin hareketi, pasif kuvvetlerle açıklanamaz) (Henrichsen, 1972: 500; Pollitt ve Diggle, 2017: 2944). Henrichsen, “Bakteriyel yüzey translokasyonu: bir araştırma ve sınıflandırma” başlıklı makalesinde hareketliliği tanımlamaya yönelik önemli bir çalışma gerçekleştirmiştir. Hareketli bakteriler üzerinde bir araştırma yapmıştır ve yüzeyler arasında nasıl hareket ettiklerini ve gözlemlenen çeşitli hareket türlerini tanımlayan özellikleri analiz ederek 6 tip motiliteyi resmi olarak tanımlamıştır: Yüzme Hareketi (Swimming), Sürü Hareketi (Swarming), Seğirme Hareketi (Twitching), Kayma Hareketi (Gliding), Yayılma Hareketi (Sliding), ve Dart Hareketi (Darting) (Henrichsen, 1972: 500; Pollitt ve Diggle, 2017: 2944).

Bakteriyel yüzme hareketinin arke tipi, üzerinde en iyi çalışılmış model olarak *E. coli*'dir. Peritrik kamçılı *E. coli*, koş ve takla şeklinde bir yüzme modeli sergiler. Flagellar motorların saat yönünün tersine dönüşü, hücrenin uzun eksenine paralel olarak hücreyi ileriye doğru iten flagellar demet oluşumuna yol açar. Saat yönünde dönüşü, flagellar demeti demonte eder ve hücre rastgele döner (yuvarlanır). Yuvarlanma olayından sonra düz yüzme yeni bir yöne doğru toparlanır. Bununla birlikte, yüzme hareketinin türü, kamçının hücre gövdesi üzerindeki türü ve sayısı/dağılımı ile önemli ölçüde değişir (Bastos-Arrieta vd., 2018: 97).

Sürü hareketliliği, bakteri popülasyonunun katı veya yarı katı yüzeyler boyunca hızlı ve koordineli bir yer değiştirmesidir (Harshey, 2003: 249). Yüzmeden sürü hareketliliğine geçiş, genellikle hücre uzamasının eşlik ettiği hücre başına kamçı sayısındaki artışla ilişkilidir (Kearns, 2010: 638). *Proteus mirabilis* ile yapılan deneyler, kümelenmenin hücreler arasında temas gerektirdiğini göstermiştir (Park vd., 2017: 8914). Kümelenmede, dinamik olarak hücre eklenir veya kaybedilir; bir hücre “sal”ın arkasında bırakıldığında, hareketi kısa bir süre sonra durur; bir sal içinde hareket eden bir grup hücre, sabit bir hücre ile temas ettiğinde ise yeniden etkinleştirilir ve sala dahil edilir (Park vd., 2017: 8914). Sürü hareketi, ister doğal ekolojik habitatlarda, isterse klinik bir ortamda kolonizasyonda olsun, bakterilere sayısız avantaj sağlar. Yerleşik bir sürünün belki de en dikkate değer özelliği, hücreler sıvıya geri aktarıldığında kaybolan geçici bir özellik olan antibiyotiklere karşı artan direncidir (Partridge, 2022: e01853-21). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, antibiyotik etkisi ile ölen bakteriler tarafından salınan bir direnç arttırıcı faktörle (AcrA) karşılaştıklarında ortaya çıkacak bir

sinyal yolu tanımlanmıştır (Bhattacharyya vd., 2020:1). Bu nekrosinyalleme yolu, bireyler yok olurken bile kolektifin hayatta kalmasını sağlamak için akış pompalarını yukarı doğru düzenler ve bu adaptif direnç için çok önemlidir. Sürü halindeki bakteriler aynı zamanda planktonik bakterilerden daha yüksek hızlarda hareket eder, bu da antibiyotikler mevcut olduğunda bir yüzey boyunca bu gelişmiş hareket kabiliyetine yardımcı olabilir. (Partridge, 2022: e01853-21).

Bakteriyel seğirme, tip IV pilinin polimerizasyon ve depolimerizasyon döngüleri yoluyla gerçekleşir. Polimerizasyon, pilusun uzamasına ve sonunda yüzeylere yapışmasına neden olur. Depolimerizasyon ise pilusun yüzeylerden geri çekilmesini ve ayrılmasını sağlar. Örneği, biyofilm sürecinde görülmektedir. Bir bakteri biyofilmi, hücre dışı polimerik malzemeler aracılığıyla bir yüzeye bağlı bakteri topluluğudur. Biyofilm oluşumundan önce bakterilerin, planktonik durumlarından çıkarak yüzeyde birikmesi gerekir. Bakteriler yüzeylerde biriktikten sonra, büyüme ve böylece biyofilm oluşumu için alt tabakayı keşfederek uygun yerleri bulmak amacıyla tip IV pili olarak adlandırılan uzantıları kullanarak yüzeyde seğirebilirler (Jayathilake vd., 2019: 1).

Kayma motilitesi, flagella veya pili gibi itici yapılardan bağımsız olan bir yer değiştirme türüdür (Nan, 2017; 154). Kayma, mikroorganizmaların su oranı düşük olan filmlerin yüzeyi boyunca hareket etmesine izin verir. Bu hareketliliğin mekanizmaları kısmen bilinmektedir. Kayma hızı organizmalar arasında değişir ve yönün tersine çevrilmesi görünüşte bir tür iç saat tarafından düzenlenir (Nan vd., 2014: 170).

Yayıma hareketi, özel yüzey özellikleri ile birlikte büyüyen bir kültürde genişleyen kuvvetler tarafından üretilen bir tür yüzey translokasyonudur. Mikromorfolojik model, tek bir katmanda sıkıca paketlenmiş hücrelerin tek tip bir levha oluşturması şeklindedir. Levha bir birim olarak davranır ve yavaş hareket eder (Pollitt ve Diggle, 2017: 2945).

Darting hareketi, ortak bir kapsül içindeki bir hücre kümesinde geliştirilen ve hücrelerin kümeden dışarı atılmasıyla sonuçlanan, genişleyen kuvvetler tarafından üretilen bir tür yüzey translokasyonudur (Pollitt ve Diggle, 2017: 2945).

2.3.1.1. Flagella: Yapı ve Fonksiyonu

Birçok bakteri türü kamçı sayesinde hareketlidir. Flagellum, yaklaşık 30 farklı proteinin 20-30 bin protein alt biriminden oluşan devasa bir moleküler komplekstir (Duan vd., 2013: 1; Imada, 2018: 560). Mutant analizi, biyokimya ve elektron mikroskopunun kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar flagellanın, bazal yapı ve eksternal yapı olmak üzere

iki bölümden oluştuğunu gösterir. Eksternal yapı üç bölümden oluşur: kanca, çubuk ve filament (Erhardt, 2016: 187; Imada, 2018: 560). Bazal gövde ise, ters çevrilebilir bir döner motor, flagellar bileşenleri ve bazı bakteriyel virülans proteinlerini yer değiştiren bir protein dışı aktarma aparatından oluşur. Bazal gövde halkaları, sitoplazmik membran proteinleri MotA ve MotB'den oluşan stator kompleksi ile döner motoru oluşturur (Duan vd., 2013: 1; Imada, 2018: 561). Bazal gövde halkaları dört ana halka yapısından oluşur, L halkası, P halkası, MS halkası ve C halkası. MS- ve C-halkası bir rotor oluşturur ve tork, stator kompleksindeki proton yolu boyunca proton akışı ile birleştirilen rotor-stator etkileşimi tarafından üretilir (Duan vd., 2013: 1; Imada, 2018: 561). Kanca ise, filament ile taban gövdesi arasındaki kısa bağlantıdır. Flagellar kanca proteini (FlgE) alt birimlerinin sarmal bir birleşimidir ve birbirlerine göre bir açıyla sabitlendiklerinde torku bir eksen den diğerine ileten bir mafsal olarak işlev görür. Kancanın, hücre yüzeyinin (peritriköz bakterilerin) çeşitli kısımlarından dışarı bakan kamçının, bir filament demeti oluşturmak ve hücreyi ileri itmek için bir yönde torku iletebilmesi için esnek bir eklem işlevi gördüğü düşünülür. Kanca, esnek bir eklem olarak belirli bir açıyla büküldüğünde ve döndüğünde, kanca yapısındaki her bir alt birim açığı korumak için her zaman konformasyonunu değiştirmek zorundadır (Aizawa, 2015: 129). Çubuk, bazal gövde dönüşünü kancaya ve filamana iletmek için bir aks görevi görür. Çubuk yapısı karmaşıktır ve hücre proksimalinden distale doğru montaj sırası ile dört ilgili proteinden birleştirilir: FlgB, FlgC, FlgF ve FlgG (Mukherjee ve Kearns, 2014: 319). FlgB'nin FliE ile etkileşime girdiği bulunduğundan, *FlgB*'nin *FliF*'ye bitişik olduğu düşünülmektedir. FlgG'nin, çubuklar kesildiğinde kanca ile birlikte saflaştırılan tek çubuk proteini olduğu ve FlgG'nin dış zar geçişinde ayrı olarak yer aldığı için, kancaya bitişik olduğu düşünülmektedir (Mukherjee ve Kearns, 2014: 319). Eksternal yapının bir diğer elemanı olan filament, yaklaşık 20 nm çapında ince bir sarmal yapıdır ve tipik olarak yaklaşık 15 µm uzunluğa kadar ulaşır. Flagellar filamentler, yaklaşık 20000 flagellar filament proteini, flagellin (FliC), alt birimlerden oluşur ve hücrenin viskoz ortamlarda yüzmesi için itme kuvveti üretmek üzere sert bir pervane görevi görür (Imada, 2018: 561).

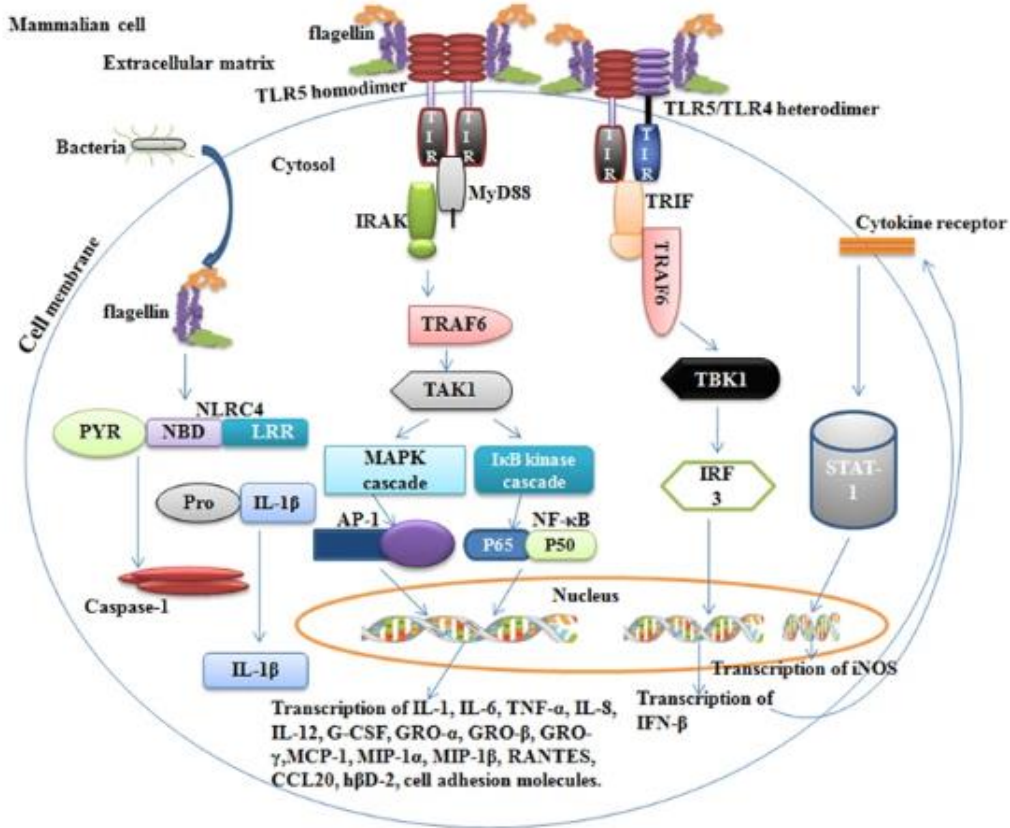
harcamasının yaklaşık %2'si), flagellar genlerin ekspresyonu çevresel koşullarca da düzenlenir (Macnab, 2003: 77). *E. coli* flagellar motorları, iyon akış yönünü değiştirmeden hem saat yönünün tersine (Counterclockwise, CCW) hem de saat yönünde (clockwise, CW) döner. *E. coli* hücreleri, tümü CCW yönünde döndüklerinde hücre gövdesinin arkasında solak sarmal filamentleri demetleyerek düz bir çizgide yüzebilir. Bir veya birden fazla motor dönüş yönünü CCW'den CW'ye değiştirdiğinde, kamçı demeti bozulur ve hücrenin yuvarlanmasını ve yüzme yönünü değiştirmesini sağlar. *E. coli* hücreleri, motorun anahtarlama frekansını koordine etmek için besinlerdeki, çevresel uyaranlardaki ve sinyal moleküllerindeki zamansal değişiklikleri algılar. Transmembran kemoreseptörler, enerji ile ilgili sensörler ve hücre içi fosfotransferaz sistemleri, çevresel sinyalleri algılar ve ardından bunları hücre içi sinyallere dönüştürür. Takiben, hücre içi bir sinyal iletim sistemi, motor dönüş yönünü CCW'den CW'ye değiştirmek için sinyalleri flagellar motora iletir. Hücreler, hayatta kalmaları için daha uygun ortamları keşfetmek için bir “koş-takla” modelini tekrarlar (Nakamura ve Minamino, 2019: 279). Hareket yönüne rehberlik edecek çekicilerin veya kovucuların yokluğunda bakteriler, flagellar dönüş yönü tarafından belirlenen bir dizi koşu ve takla içeren rastgele bir yürüyüş düzenini takip eder. Kemoreseptörler, kamçı dönüş yönünü kontrol eden proteinlerin fosforilasyon durumunda bir değişiklikle sonuçlanan “cezbedicilere-çekicilere” bağlanır, hücrelerin yuvarlanma frekansını azaltır ve hücrelerin cezbedicilere doğrudan ilerlemesine imkan sağlar (Ravichandar vd., 2017: 2).

2.3.1.2. Patojenitede Motilite ve Flagella

Bakteriyel patojenite, enfeksiyöz bakteri sayısı, konakçıya giriş yolu ve konak savunma mekanizmaları üzerindeki etkiler açısından tanımlanır. Herhangi bir enfeksiyon için ön koşul, patojenik bakterilerin hedef hücre yüzeyinde bazı moleküller ile karşılaşmasıdır; daha sonra bakteriler hücreleri kolonize edebilir, çeşitli dokulara geçebilir, konakçı dokuları ve organları istila edebilir ve konakçı enfeksiyonuna neden olmak için orada çoğalabilir. Hareketlilik, dış uyaranlara yanıt olarak gen ekspresyonlarıyla işbirliği içinde, farklı çevresel koşullara uyum sağlamada kamçılı bakteriler için bir avantajdır (Soutourina ve Bertin, 2003: 512; Fenchel, 2002: 1070). Flagellar motilite, uygun ortamlara doğru hareket etme ve zararlı koşullardan kaçma kapasitesi aracılığıyla bakterilere yarar sağlar, böylece diğer mikroorganizmalarla başarılı rekabet mümkün olabilir. Flagellum aracılı motilite, bakterilerde iyi çalışılmış bir motilite tipidir. Flagella, patojenik bakterilerde motilite sağlamak için gereken yapı olmakla birlikte flagella, sadece motilite kazandırarak değil, başka yollarla da bakteriyel patojeniteyi etkiler: konakçı hücrelere tutunmayı teşvik eder, besinlere doğru

ilerlemek için mekanik hareketlilik sağlar, biyofilm oluşumunu teşvik eder, hücre zarları boyunca virülans faktörlerinin yer değiştirmesini kolaylaştırır ve Toll benzeri reseptör 5 (Toll-like Receptor 5, TLR5) sinyal yolu aracılığıyla proinflamatuvar sitokinleri tetikleyerek immünomodülatörler olarak görev yapar (Caldwell vd., 1985: 942; Newell vd., 1985: 220; Nachamkin vd., 1993: 1270; Stevenson vd., 2015: 276; Rossez vd., 2015: e1004483).

Daha önce de bahsedildiği üzere flagellanın yapısal bileşeni flagellindir. Flagellin, konak bağışıklık sistemi tarafından tanınan önemli bir hedefdir. Başlangıçta doğuştan gelen bağışıklık sistemi, konağın hüresel ve moleküler savunma mekanizmalarını alarma geçirerek ve adaptif bağışıklığa geçişi kolaylaştırarak bir enfeksiyon yaratır (Iwasaki ve Medzhitov, 2010: 292). Enfeksiyon, “ben olmayanı” “kendinden” ayırt ederek algılanır; bu nedenle doğuştan gelen bağışıklık sistemi, mikroorganizmalarda bulunan ancak konakçı hücrelerde bulunmayan korunmuş patojenle ilişkili moleküler modelleri (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) tanıyan bir dizi germ hattı kodlu reseptör ile donatılmıştır. Bu patern tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptors, PRRs) arasında, TLR ailesi çok çeşitli mikroorganizmalardan türetilen lipidleri, lipoproteinleri, proteinleri ve nükleik asitleri tanıyabilir (Kawai ve Akira, 2010: 379). Bu bağlamda TLR5, flagellar protein FliC'deki korunmuş bölgeleri tanır (Andersen-Nissen vd., 2005: 9250). Ek olarak, hücre içinde mikrobiyal tehdidi algılayan başka alıcılar da mevcuttur. Bu reseptörler arasında, NOD benzeri protein NLRC4, doğrudan konakçı hücrelere salgılanan flagellini tanıyabilir (Miao vd., 2006: 572). Bu etkileşim, proinflamatuvar multiprotein inflamatuvar kompleksinin oluşumuna yol açar ve kaspaz-1'in aktivasyonu ve ardından IL-1 β ve IL-18'in aktif forma proses edilmesi ile sonuçlanır (Mariathasan ve Monack, 2007: 35). Kaspaz-1 aktivasyonu ayrıca bakteriyel enfeksiyonun kontrolüne katkıda bulunan piroptoz adı verilen inflamatuvar hücre ölümüne de yol açabilir (Miao vd., 2006: 572). Dolayısıyla görülmektedir ki kamçının bileşenleri sadece bakteri hareketi ve konak hücre istilası için merkezi değildir, aynı zamanda bakteriyel enfeksiyonun immün tanınması ve kontrolü için de gereklidir.



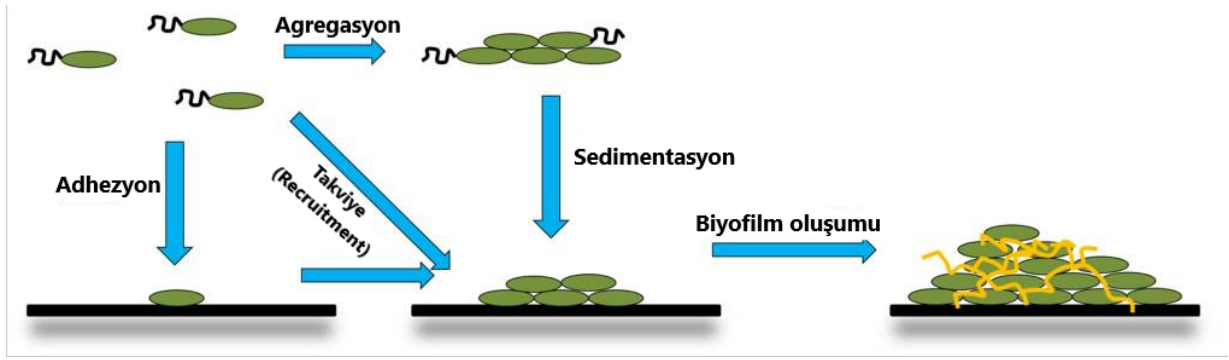
Şekil 2.7. Memeli Hücrelerinde Flagellin Tarafından Sinyal İletimi.

Bağışıklık hücreleri, TLR5 homodimer veya heterodimer kompleksleri yoluyla hücre dışı monomerik flagelline yanıt verir ve bu, bağışıklık hücrelerinin uygun şekilde uyarılması için önemli olan çeşitli genlerin transkripsiyonuyla sonuçlanır. TLR5 yoluyla sinyal iletimi, sinyali IRAK, TRAF6 ve TAK1 aracılığıyla MAPK ve IκB basamaklarına ileten MyD88'e bağlı bir adaptör molekülü aracılığıyla gerçekleşir. MAPK ve IκB basamakları, sırasıyla AP-1 ve NF-κB transkripsiyon faktörlerinin indüklenmesiyle sonuçlanır. Bu iki transkripsiyon faktörü, doğal ve kazanılmış bağışıklıkta yer alan çeşitli genleri indükler. TLR5/TLR4 yoluyla sinyalleşme, MyD88'den bağımsızdır ve IFN-β üretimiyle sonuçlanan IRF3 yolu aracılığıyla gerçekleşir. Daha sonra, IFN-β, nitrik oksit (NO) üretimi ile sonuçlanan STAT1'in aktivasyonu yoluyla iNOS gen transkripsiyonunu indükler. Bununla birlikte, hücre içi flagellin, bazı bakteriler tarafından tip III salgı sistemi yoluyla konakçı hücre sitoplazmasına eklendiğinde, aktif kaspaz-1 yoluyla IL-1 β salgılanmasıyla sonuçlanan NLRP4 tarafından saptanır. AP-1, Aktivatör protein-1; GRO, büyümeye bağlı onkogen; hBD, insan beta defensinleri; IRF3, interferon yanıt faktörü 3; IRAK, IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz; LRR, lösin açısından zengin tekrarlar; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; MCP, monosit kemoatraktan protein; MIP, makrofaj inflamatuvar protein; MyD88, miyeloid farklılaşma faktörü 88; NBD, nükleotit bağlama alanı; NF-κB, aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktörü 'kappa-hafif zincir arttırıcı'; PYR, pirin alanı; TAK1, dönüştürücü büyüme faktörü-beta ile aktive olan kinaz 1; TBK1, TANK bağlayıcı kinaz-1; TLR, Toll benzeri reseptör; TRAF6, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6; TRIF, interferon-β'yi indükleyen adaptör içeren TIR alanı; STAT1, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon l'in aktivatörü.

Kaynak: (Hajam vd., 2017: e373)

Enfeksiyon bölgesine doğru yönlendirilmiş bir hareket ve bağışıklık sistemi yanıtının modülasyonu için kullanılan kemotaktik davranışa ek olarak flagellar hareketlilik, konakçı hücre dokusuna yapışmayı ve biyofilm oluşumunu teşvik ederek de patogeneze katkıda bulunur (Haiko ve Westerlund-Wikstrom, 2013: 1254; Rossez vd., 2015: e1004483). Flagella, birkaç bakteriyel patojen için yapışma, kolonizasyon ve ardından konakçı hücre dokusunun istilası için gereklidir. Flagellanın varlığı ve kamçının yüzey yapıları ile ilk etkileşimi, biyofilmlerin oluşumu ve fiziksel etkileşimler yoluyla mikrokoloni yapılarının korunması için önemlidir (Pratt ve Kolter, 1998: 290). Ek olarak, flagella, yarıklara ulaşabilir ve böylece uygun olmayan yüzeylere tutunmayı sağlayarak biyofilm oluşumu sırasında bakterilerin yüzey yapılarına erişmesine imkan tanır (Friedlander vd., 2013: 5627). Biyofilm, kendiliğinden üretilen bir polimerik matris içine gömülü, yüzeye bağlı bir bakteri hücreleri topluluğu olarak tanımlanabilir (Wolska vd., 2016: 229; O'Toole vd., 2000: 49). Biyofilmler hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde oluşabilir ve ayrıca sıvı-hava arayüzlerinde yüzen biyofilmler (pelliküller olarak adlandırılır) oluşabilir (Vaccari vd., 2017: 563). Biyofilm oluşumu, bakteriler planktonik bir durumdan yüzeye bağlı bir duruma geçtiğinde meydana gelir ve ilk bağlanmadan başlayarak mikrokoloni ve makrokoloni oluşumunu izleyen birçok aşamada gerçekleşir (Flemming vd., 2016: 565).

Otoagregasyon ve mikrokoloni oluşumu, bir biyofilm oluşturmanın ilk adımları arasındadır. Otoagregasyon, mikrokoloni oluşumuna ve biyofilme iki şekilde yol açabilir (Şekil 2.7). İlkinde, tek planktonik hücreler substrata bağlanır. Bu, yüzey adezinlerinin ekspresyonuna ve muhtemelen motilite faktörlerine bağlıdır (O'Toole ve Kolter, 1998: 297). Bunu takiben, bu hücreler otoaglutininler yoluyla süspansiyondan diğer hücreleri alarak mikrokoloni oluşumuna yol açar (Beloin vd., 2008: e167; Dunne Jr, 2002:160) Diğer mekanizmada, hücreler çözelti içinde kendiliğinden toplanır ve agregalar biyofilm oluşumunu başlatmak için substrat üzerine yerleşir. Yüksek hücre yoğunluklarında, kümelenmiş hücreler, kümenin en üstünde yer alan hücreler besinlere daha fazla erişime sahip olduğundan, tek hücrelere göre rekabet avantajına sahiptir. Bununla birlikte, düşük hücre yoğunluklarında, kümelenmiş hücreler, kümenin ortasındaki hücreler sınırlı besin erişimine sahip olduğundan dezavantajlıdır (Kragh vd., 2016: e00237-16). Agreganın şeklinin de rekabeti etkileyeceği tahmin edilmektedir: yuvarlak agregalar daha yüksek hücre yoğunluklarında daha iyi sonuç verirken, rekabet düşük olduğunda yüzey alanını en üst düzeye çıkararak daha fazla yayılmış agregalar bir avantaja sahiptir (Melaugh vd., 2016: e0149683).

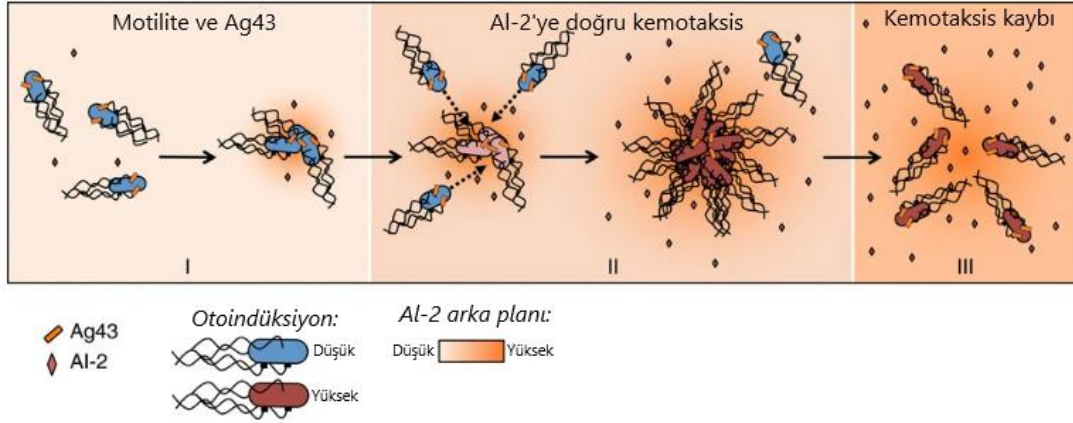


Şekil 2.8. Biyofilm Oluşumunda Otoagregasyonun Rolü.

Otoagregasyon biyofilm oluşumuna iki şekilde yol açabilir: planktonik bakteriler ya tek hücre olarak bir substrat yüzeyine yapışabilir ve daha sonra tek bir mikrokoloni oluşturmak için agregasyon yoluyla daha fazla planktonik hücre toplayabilir veya planktonik hücreler süspansiyon halinde toplanıp daha sonra substrat yüzeyine yerleşebilir. Her iki yol da biyofilm oluşumuna yol açabilir.

Kaynak: (Trunk vd., 2018: 140)

E. coli, hem hücre agregasyonunu hem de biyofilm oluşumunu incelemek için model organizmalardan biridir. *E. coli*'de otoagregasyon, mikroskobik hücre kümelerinin ortaya çıkması olarak gözlenir ve bu da statik sıvı kültürlerde hücrelerin makroskopik topaklaşmasına ve yerleşmesine yol açabilir (Hasman vd., 1999: 4836). *E. coli*'deki otoagregasyonun ana belirleyicisi, ototransporter ailesine ait olan ve tip V salgılama sistemi yoluyla salgılanan bol miktarda dış zar proteini olan antijen 43'tür (Ag43) (Van der Woude ve Henderson, 2008: 156). Otoagregasyon sırasında, bitişik hücrelerin Ag43 α -alt birimleri, dimer oluşumu ile sonuçlanan bir baştan sona konformasyonda etkileşime girer (Heras vd., 2014: 458). Ag43, üstel olarak büyüyen patojenik olmayan *E. coli*'nin otoagregasyonunda rol oynayan bilinen tek yüzey faktörü olsa da, patojenik suşlar ayrıca fimbria veya pili yoluyla kümelenebilir (Schembri vd., 2001:1419; Bieber vd., 1998: 2114). Ek olarak yapılan bir çalışmada AI-2'ye yönelik kemotaksin, *E. coli*'nin otoagregasyonuna aracılık edebileceği gösterilmiştir (Laganenka vd., 2016: 1).



Şekil 2.9. *E. coli*'nin Önerilen Otoagregasyon Modeli.

E. coli'nin Ag43 aracılı otoagregasyonu şematik olarak üç faza ayrılabilir. Faz I, Ag43 eksprese eden hareketli hücrelerin rastgele çarpışmaları ile ilk 'tohumlama' kümelerinin oluşumuna karşılık gelir. Bu ilk agregalar daha sonra faz II sırasında büyür. Burada, kümeler tarafından üretilen AI-2 gradyanları, ilave hücreleri çekmeye hizmet eder. Agregalardaki daha yüksek yerel hücre yoğunluğu, AI-2 aracılı otoindüksiyonu destekler (Isr operonunun baskılanması). Ag43 aracılı etkileşimlerin göreceli zayıflığı nedeniyle, tek tek yüzen hücrelerin bir kısmı agregalarla dengede kalır ve hücreler bu faz sırasında agregaları terk etmeye ve birleştirmeye devam eder. Son olarak, faz III, agregaların dağılmasını yansıtır. Bu aşamada, kültürde artan AI-2 seviyeleri, yüksek arka plan nedeniyle kemotaksi kaybına yol açar. Bu, daha sonraki kademeli ayırıştırma ile sonuçlanır, çünkü agregalardan ayrılan hücrelerin sayısı agregalara katılanlardan fazladır.

Kaynak: (Laganenka vd., 2016: 7)

Otoagregasyon sıklıkla patojenez ile ilişkilendirilir. Otoagregasyona bağlı mikrokoloni oluşumu, virülans modüle eden konakçı hücrelerde veya yakınında salgılanan efektörlerin konsantrasyonunda etkili bir artışa neden olabilir (Guerry, 2007: 457). Agregasyonun ayrıca antimikrobiyal ajanlara karşı toleransı artırarak (Corno vd., 2014: 297; Haaber vd., 2012: e41075; Caceres vd., 2014: 6851) istila sıklığını ve ayrıca konakçı hücrelerin istila etkinliğini artırarak (Abdel-Nour vd., 2014: 1441), konakçı bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından fagositozu engelleyerek (Galdiero vd., 1988: 456) veya fagozomlar içinde sağkalımın artması ile patojenezi etkilediği gösterilmiştir (Fexby vd., 2007: 30). Patojenik bakterilerde otoagregasyon sıklıkla gözlenmiştir ve genel olarak bakteriyel sağkalımı ve zindeliği teşvik ederek virülansa katkıda bulunabilir. Bu nedenle, otoagregasyon, aksi takdirde zorlu çevresel koşullardan veya konak savunmalarından korunan bozulmamış bakteri büyümesi için bir mikro-ortamın yanı sıra bir büyüme avantajı sağlayarak patojenez üzerinde faydalı ancak pasif bir etkiye sahip olabilir. Bu, konakçı içinde uzun süreli bakteri kalıcılığı ve başarılı kolonizasyon ve istila şansının artmasıyla sonuçlanır (Trunk vd., 2018: 140).

2.3.2. Virülans ve Antibiyotik Toleransında Motilite

Swarm hareketliliği, özellikle flagellaya sahip bakterilerde konakçı yüzeylerde kolonizasyon, virülans faktörlerinin artan ifadesi ve antibiyotik toleransı ile ilişkili olarak, patojenite ile ilgili önemli bir özelliktir (Irazoki vd., 2017: 1360). Sürü davranışı, insanlardan mantarlara ve bitkilere kadar çeşitli organizmalarda konakçıya tutunma ve kolonizasyonu kolaylaştırarak patojeniteyi destekler (Murray vd., 2010: 511). Artan virülansa ek olarak, swarm hareketine sahip bakteriler, planktoniklere kıyasla farklı antibiyotiklere karşı artmış tolerans sergiler (Overhage vd., 2008: 2671; Lai vd., 2009: 127). *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio cholerae*, *S. typhimurium* ve *Clostridium septicum* gibi çeşitli önemli insan patojenlerinin virülansı, antibiyotik direncine katkıda bulunan swarm hareketi ile ilişkilendirilmiştir (Overhage vd., 2008: 2678; Lai vd., 2009: 128; Allison vd., 1994: 1155; Gardel ve Mekalanos, 1996: 2255; Wang d., 2004: 170; Macfarlane vd., 2001: 1126). Swarming, bakterilerin yarı katı bir yüzey üzerinde grup göçüdür (Kohler vd., 2000: 5992; Butler vd., 2010: 3779). Altta yatan mekanizmalar türe bağlı olmasına ve tam olarak açıklanmamasına rağmen, bu kümelerde Quorum-Sensing'e (QS) bağlı olarak yüzey gerilimini azaltmayı sağlayan ramnolipidler gibi biyosümfaktanların üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. Swarming, aminoglikozitler ve florokinolonlar da dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklere karşı artan tolerans ile ilişkilendirilmiştir (Butler vd., 2010: 3779; Kim vd., 2003: 3111). "Fedakar ölüm" de bu hayatta kalma sürecine katkıda bulunabilir: antibiyotikle uzun süreli doğrudan temastan ölen hücrelerin, diğer sürülerin antibiyotikle doğrudan temas etmesini önleyen koruyucu bir platform oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, popülasyonun QS aracılı sürü genlerini up-regüle etmek için yeterince yüksek bir yoğunluğa sahip olması ve doğrudan antibiyotiğe maruz kalan bireyleri kaybetme maliyetini karşılayabilmesi gerekir (Butler vd., 2010: 3779). Ek olarak, virülans için sadece motilitenin kendisinin mi yoksa bozulmamış kamçının mı gerekli olduğu konusunda da devam eden bir tartışma vardır. Çalışmalar, flagella içermeyen izogenik mutant bakterilerin, hastalığa neden olma yeteneklerini korumada ve/veya kolonizasyonda ya bir ölçüde ya da tamamen başarısız olduklarını göstermiştir (Duan vd., 2013: 2). Bazı bakteri türlerinin, kamçılı-hareketli ve kamçılı-hareketsiz suşlarının virülansını karşılaştırılmış, başarılı enfeksiyon için hareketliliğin gerektirdiği ikna edici bir şekilde gösterilmiştir (Duan vd., 2013: 2) (Black vd., 1988: 478). Özetle, flagellum aracılı hareketlilik, patojen-konak etkileşimlerini arttırmak ve müteakip yapışma ve kolonizasyonu teşvik etmek için gerekli olduğundan flagella, patogeneizde önemli bir role sahiptir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları

E. coli (ATCC 8739) ve *E. coli* (DH5 α) Nutrient Broth ortamında orbital olarak çalkalanarak (160x rpm) ya da agar plakalarda 37°C'de kültürlenmiştir. NB sıvı besiyeri bileşenleri (NB: Kazein 15 g/L, Maya ekstraktı 3 g/L, Sodyum klorür 6 g/L) dH₂O ile çözündürülerek 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Agar plakalar ise, NB sıvı besiyeri bileşenlerine agar (%1,5, v/w) eklenerek hazırlanmıştır.

3.2. Antimikrobiyal Ajanların Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

CHX (Fluka Analytical, Chlorhexidine acetate, PHR1222-500MG) 1 mg/mL, AZM (Ziromin, 500 mg) ise 20 mg/mL olacak şekilde steril dH₂O içinde çözülmüş, ardından 0.22 μ M PES membran filtreler kullanılarak steril edilmiştir. Hazırlanan CHX stoğu alikotlanarak -20°C'de muhafaza edilirken, AZM stokları 1 hafta içerisinde kullanılmak üzere alikotlanarak +4°C'de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal ajanların hazırlık, saklama ve sonraki kullanım aşamaları, karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Büyüme İnhibisyon Testleri

CHX ve AZM'nin büyümeyi inhibe eden dozları makrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tüp içi seyreltme testi olarak da bilinen makrodilüsyon yöntemi, ilgili ortamda antimikrobiyal maddelerin seri seyreltmesini kullanır. Hazırlanan tüplere bilinen bir konsantrasyonda bakteri eklen inkübasyondan sonra, bakteri üremesi ortamın bulanıklığı ile ölçülür ve MİK değerlerinin görsel olarak belirlenmesine izin verilir (Gajic vd., 2022: 427). Suşlar, 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda OD₆₀₀'de 0,1 absorbansa ayarlanan kültür ortamlarına antimikrobiyal ajan stoklarından eklenerek seri sulandırma yapılmıştır ve 15 ml'lik vida kapaklı cam tüplerde 3 ml olarak 37°C'de çalkalama inkübatörde (160x rpm) büyütülmüştür. İnkübasyonun, 8. ve 24. saatlerinde OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Kör olarak bakteri ile inoküle edilmeyen üreme ortamının optik yoğunluğu kullanılmıştır. Büyüme üzerindeki etki, kontrole kıyasla yüzde (%) olarak hesaplanmış ve grafiklenmiştir.

Agar spot deneyleri için ise, 8. ve 24. saatlerde alınan bakteri kültürleri seri seyreltmelere tabi tutulmuştur. Her seyreltmenin 3.0 μ l'si agar plakalar üzerine damlatılmıştır ve plakalar gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.4. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Testi

CHX ve AZM muamelelerinin oksidatif stres üzerindeki etkisi, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) miktarının belirlenmesine yönelik NBT deneyi ile araştırılmıştır (Tvrda, 2019: 200). Bu tahlil, sarı, suda çözünür, nitroikameli aromatik tetrazolyum tuzu (2,20-bis(4-nitrofenil)-5,50-difenil-3,30-(3,30-dimetoksi-) olan NBT'nin kullanımına dayanmaktadır. NBT testinin prensibi basittir: hedef hücreler tetrazolyum tuzu varlığında inkübe edilir ve ardından hücreler NBT'yi süperoksit radikalleri tarafından mor-mavi ve suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürüldüğü sitoplazmalarına alır. Formazan hücre içinde hapsolurken, optik mikroskop kullanılarak hücreler içinde gözlemlenebilir. Alternatif olarak, formazan bir çözündürme ajanı yardımıyla hücrelerden salınabilir ve daha sonra ortaya çıkan mor-mavi karışımın absorbansı ölçülerek nicelendirilebilir (Tvrda, 2019: 200). Bu tez çalışmasında NBT deneyi, daha önceki çalışmalarımızda belirtildiği şekli ile yapılmıştır (Tunçer ve Gurbanov 2023: 305). CHX ve AZM ile 24 saat boyunca inkübe edilen *E.coli* ATCC 8739 kültürlerin 600 nm'de en düşük değeri veren deney grubuna göre bakteri yoğunlukları 10 µL total hacimde (OD600 değeri en düşük olan kültürden 10 µL, diğer kültürlerden ise NB ile 10 µL'ye tamamlanarak) eşitlenmiştir ve kültürler, 50 µL NBT solüsyonu (4 mg/mL NBT (dH₂O'da), RPMI içinde 1/10 konsantrasyonda hazırlanmıştır) ile 37°C 'de 3 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde (160x rpm) inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 5 dakika boyunca 13.000 xg 'de yapılan santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, aynı koşullarda tekrarlanan santrifüj ile işlemi ile dH₂O içerisinde yıkama yapılmıştır. Çöken NBT-formazan kristalleri, dH₂O'nun uzaklaştırılmasının ardından sırasıyla eklenen 120 µL 2M KOH ve 140 µL DMSO içerisinde çözülmüş ve çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak 96 kuyulu plakalarda (Nest Scientific, Maryland, ABD) 620 nm'de ölçüm alınmıştır, kör olarak KOH DMSO kombinasyonu kullanılmıştır.

3.5. Agar Motilite Testi

Motilite testi Darshan ve Manonmani referans alınarak yapılmıştır (Darshan ve Manonmani 2016: 7). Motil durumun izlenebilmesi için soft agar şu şekilde hazırlanmıştır: büyüme ortamı bileşenleri (10 gr/L Casein Peptone (Neogen), 5 gr/L NaCl (Sigma Aldrich), 5 gr/L agar (Liofilchem) hassas terazi ile gereken miktarlarda ölçülerek dH₂O içerisinde çözüldürülmüştür. Hazırlanan agar, 121°C 'de 15 dakika (dk) sterilize edilmiştir. 50-55°C'ye soğuyan agara antimikrobiyal ajanlar eklenmiştir ve üçer teknik replike olarak 15 mL'lik vida kapaklı cam tüplere 6 mL olarak aktarılmıştır. Tüpler, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda,

hareketsiz şekilde donmaya bırakılmıştır. Ön kültür için öze yardımıyla *E. coli* 8739 agar plakalarından birkaç koloni alınarak 15 mL'lik vida kapaklı cam tüp içerisindeki 3 mL NB'ye steril koşullarda eklenmiştir ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde (160x rpm) bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen önkültürden 3 mL NB içerisine 1/100 oranında eklenerek 8 saat boyunca aynı koşullarda büyütülmüştür ve OD₆₀₀'de absorbans ölçümü alınmıştır (OD₆₀₀ = 0,8 ≈ 6x10⁸/mL hücre). Ardından *E. coli* ATCC 8739 kültürüne steril koşullarda agar delici daldırılarak, agarların yaklaşık 2/3'üne kadar dik bir şekilde delinmiştir. Bakteri ile bu şekilde inoküle edilen agarlar, 18 ve 24. saatlerden başlayarak, 7 gün boyunca takip edilmek üzere 37°C 'de inkübasyona bırakılmış ve takip sürecinde fotoğraflanmıştır.

3.6. Bakteriyel Swarming Motilite Testi

Swarm durumunun izlenebilmesi için swarming agar Butler vd. tarafından tanımlandığı şekli ile hazırlanmıştır: 10 gr/L tripton (Neogen), 5 gr/L maya ekstrakt (Pronadisa), 5 gr/L NaCl (Sigma Aldrich), %0,5 glukoz (D-glukoz %99,5 Merck), %0,6 agar ortam bileşenleri (Butler vd., 2010: 3781) dH₂O içerisine eklenerek çözündürülmüştür. Agar, 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir ve 50-55°C'ye soğuyan agara antimikrobiyal ajanlar eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan agarların 15 mL'si 100 mm çaplı petrilere eklenmiştir. Agar petrilere, biyolojik replikelerin her biri için üçer teknik replike olacak şekilde hazırlanmıştır. *E.coli* ATCC 8739 suşu yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan önkültürden 1/100 oranında alınarak NB içerisinde aynı büyüme koşullarında büyütülmüştür. Büyüme sonunda hücre sayıları OD₆₀₀ değerlerine göre oranlanarak (OD₆₀₀ = 1.0 ≈ 1 x 10⁸ hücre) 1x10⁸/mL olacak şekilde hazırlanmış ve bu süspansiyondan 5 µl alınarak, pipet ucu agarın yaklaşık ortasına kadar hassasça ve dik bir açıyla batırılmıştır. Agar petrilere, inoküle edilen kültür emilene kadar hareket ettirilmeden bekletilmiştir ve ardından 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme gözlenmiş ve fotoğraflanmış, ayrıca oluşan koloni boyutu ölçülmüştür.

3.7. Otoagregasyon Testi

Bakteriyel otoagregasyon testi, Montero vd. tarafından belirtildiği şekli ile ancak bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Montero vd., 2017: 10). *E. coli* ATCC 8739 suşu, NB içerisinde 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda OD₆₀₀'de 0,1 absorbansa ayarlanan kültür ortamlarına antimikrobiyal ajan stoklarından eklenerek seri sulandırma yapılmıştır ve çalkalamalı inkübatörde (160x rpm) 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından kültürlerin OD₆₀₀'de absorbans ölçümü alınarak, her kültürden OD₆₀₀ 1.0 optimize edilmesi için gereken kültür miktarları (mL) hesaplanarak, 1844 xg'de 10 dakika

süreyile santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, pelletler fosfat tamponlu tuz (Phosphate Buffered Saline, PBS) içinde OD₆₀₀ 1.0 olacak şekilde süspanse edilmiş ve her bir muamele grubu için her biri 3 mL bakteri süspanسیونu içermek üzere iki adet 15 mL'lik vida kapaklı tüpler hazırlanmıştır. 8 saat boyunca her saatte OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. Ölçümlerden önce bir tüp vortekslenirken diğeri statik bırakılmıştır. OD₆₀₀ ölçümü için örnekler, her bakteri süspanسیونunun 1 cm kadar yüzey bölümünden 150 µL olarak alınmıştır. Deneyler her biri iki teknik replike içermek üzere, üç biyolojik replike olarak tekrarlanmıştır ve alınan OD₆₀₀ absorbans değerlerine göre grafik oluşturulmuştur. Otomatik toplama yüzdesi şu şekilde ifade edilmiştir: $%A = (A_0 - A_t) / A_0 * 100$ A₀, 0. saatteki absorbansı ve A_t, farklı zaman aralıklarındaki absorbansı temsil eder.

Otoagregasyonunun görselleştirilmesi amacıyla Propidium iyodür (PI) boyaması yapılmıştır. PI, membran bütünlüğü bozulan hücrelerde nükleosit asitlere bağlanır ve böylece hücreleri etiketlemek için kullanılır (Unal vd., 2002: 248). AZM ve CHX muamelesini takiben 24 saat sonra kültürlerin OD₆₀₀ ölçümleri alınmıştır. Her bir muamele grubundan 250 µL 1844 xg'de 10 dakika süreyle çöktürülmüştür. Santrifüj sonunda süpernatantlar uzaklaştırılmış ve bakteri pelletleri, öncesinde -20°C'ye soğutulmuş 1 mL %70 EtOH (dH₂O'da)'ün, düşük hızda çalışan vorteks üzerinde damla damla eklenmesiyle fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyon ayrıca PI penetrasyonunu mümkün kılıp, hücrelerin floresa mikroskobu altında görünür olmasını sağlar. Analiz edilecek hücre sayılarında eşitliği sağlamak amacıyla, kontrol grubundan 100 µL hücre süspanسیونu için 200 µL PI solüsyonu (0.1% v/v Triton X-100, 20 µg/mL RNase A ve 20 µg/mL PI; PBS içerisinde) olmak üzere, diğeri muamele grupları için süspanسیون miktarları ve bu miktara göre eklenecek PI solüsyonu, OD₆₀₀ değerlerine göre belirlenmiştir. 30 dakika boyunca karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, örnekler 1844 xg'de 10 dakika 1 mL PBS ile yıkanmış, santrifüj sonunda PBS uzaklaştırılmış ve pelletler 50 µL PBS ile süspanse edilmiştir. Süspanسیونlar, cam lam (IsoLab, 76x26 mm) üzerine 20'şer µL olarak damlatılmıştır, ardından örneklerin üzerine 45°'lik açı ile ve hava kabarcığı olmayacak şekilde cam lamel (IsoLab, 24x24) kapatılarak görüntülenmeye hazır hale getirilen preparatlar (lam ve lameller kullanılmadan önce %70 EtOH ile temizlenmiştir), U-FGNA (eksitasyon: 535 nm, emisyon: 617 nm; Olympus) filtresine sahip flouresan mikroskobu (Olympus BX53, Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak gözlenmiş ve 100X büyütmede görüntülenmiştir. Her örnekten 2 teknik replike olmak üzere 10-15 adet görüntü alınmıştır.

3.8. Kanser Hücrelerinin Büyütülmesi, Alt-Kültürlemesi ve Dondurulması

Tez çalışmasında insan CRC epitel hücre hattı olan HCT-116 (DSMZ, Almanya), önceki çalışmalarımızda belirtilen şekli ile kültür edilmiştir. Hücreler, % 10 FBS (Fetal Sığır Serum), % 2.8 (v/v) NaHCO₃ (stok % 7.5 w/v) ve % 1 pen/strep ile takviye edilerek hazırlanan, dH₂O'da çözünen (10.5 g/L) NaHCO₃ içermeyen ve pH'sı derişik HCl kullanılarak 7.5'e ayarlanan RPMI-1640 toz besi yerinde (Kat. No: 11-100; Biological Industries, İsrail) % 95 hava, % 5 CO₂ içeren inkübatörde, 37°C'de büyütülmüştür. 0.22 µM PES filtre kullanılarak besiyeri sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Trypsin/EDTA (0.25%/0.02% w/v) alt kültürleme veya hücre toplanması sırasında hücreleri yüzeyden ayırmak için kullanılmıştır. Hücre metabolizmasının tayini, hücre canlılığının belirlenmesi ve protein eldesi deneylerinde kullanılmak üzere hücre ekimi için hücreler, tripsin muamelesi ile kaldırılmış ve tripsinin besiyeri ile inhibisyonunu takiben 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Deneylerde 30 pasajın üzerinde hücre kullanılmamıştır (Karacam ve Tuncer, 2022: 1001; Karadağ vd., 2022: 8; Karacam ve Tuncer, 2022: 3). Hücreler %5 DMSO içeren soğuk besiyeri içinde vial kapaklı tüplere aktarıldıktan sonra - 80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.9. HCT-116 Hücre Hattında Adhezyon Testi

E. coli 8739'un HCT-116 insan kolon karsinomu epitel hücrelerine *in vitro* adezyonu, bazı modifikasyonlarla Parveen Rani ve arkadaşları (2018) tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (Parveen Rani vd., 2016: 1910). HCT-116 hücreleri 12 kuyulu plakaya cm² başına 3,5 x 10⁴ hücre olarak ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi (aynı koşullarda iki plate hazırlanarak MTT ve adhezyon testleri için kullanılmıştır). Ertesi gün yaklaşık %80 konfluensiye ulaşan hücreler, besi yerinin uzaklaştırılmasını takiben PBS (pH 7.4) tamponu ile yıkandı. Eşzamanlı olarak, gece boyunca büyüyen *E. coli* 8739 hücreleri, 1844 xg'de 10 dk boyunca santrifüjleme yoluyla toplandı, PBS tamponu ile yıkandı ve 1 x 10⁸ CFU/mL konsantrasyonunda RPMI-1640 ortamında (antibiyotik ve serum içermeyen) yeniden süspanse edildi. Yapışma ve MTT tahlilini gerçekleştirmek için, HCT-116 hücrelerine 500 µL bakteri süspanسیونu eklendi ve 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Süspanسیونdaki bakteriler pipetle uzaklaştırılmış, takibinde HCT-116 hücreleri iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücreler steril dH₂O kullanılarak eppendorf tüplere toplanmıştır. HCT-116 hücrelerine tutunan bakteriler, uygun dilüsyonlar yapılarak agar damlatma deneyleri ve CFU sayım deneyleri ile belirlenmiştir. Agar petriyer gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.10. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Deneyi

MTT deneyi daha önceki çalışmalarımızda belirtildiği şekli ile yapılmıştır (Tunçer vd., 2019: e01336; Karacam ve Tuncer, 2022: 1001; Karadağ vd., 2022: 8).

Özetle HCT-116 hücreleri adhezyon testinde tarif edildiği gibi hazırlanarak *E. coli* 8739 hücreleri ile birlikte inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından besi yerleri uzaklaştırılmış, her bir kuyuya 1:10 oranında besi yeri içerisinde seyreltilmiş, stok konsantrasyonu 5 mg / mL (PBS içinde; 12 mM) olan MTT reaktifinden 750 µL eklenerek, plakalar 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonra her bir kuyuya 750 µL % 10 SDS (v/w) içeren 0.01 N HCl çözeltisi eklenmiş ve plakalar 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyudaki renk değişimi 570 nm absorbansta, mikropilaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Blank olarak MTT ajanı ve SDS eklenmiş ancak hücre içermeyen kuyulardan alınan absorbans değerleri kullanılmıştır.

3.11. Western Blot İçin HCT-116 Hücreleri ile *E.coli* 8739 Hücrelerinin Birlikte İnkübasyonu

E.coli 8739'un HCT-116 insan kolon karsinomu epitel hücrelerine in vitro adezyonu, bazı modifikasyonlarla Parveen Rani ve arkadaşları (2018) tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (Parveen Rani vd., 2016: 1910). HCT-116 hücreleri hücre kültürü plakalarının her bir oyuğuna (altı hazne) RPMI-1640 besiyeri içerisinde $7 \times 10^4/\text{cm}^2$ hücre (7×10^5 hücre) ekildi ve 24 saat boyunca % 95 hava, % 5 CO₂ içeren inkübatörde, 37°C'de büyütülmüştür. *E.coli* 8739 hücreleri ile inoküle edilmeden önce HCT-116 hücreleri FBS içermeyen RPMI-1640 ortamında 16 saat boyunca % 95 hava, % 5 CO₂ içeren inkübatörde, 37°C'de büyütülmüştür. FBS içermeyen RPMI-1640 ortamına spore edildi ve hücreler, PBS (pH 7.4) tamponu ile yıkandı. Eşzamanlı olarak, 24 saat boyunca gece boyunca büyüyen *E.coli* 8739 hücreleri, santrifüjleme yoluyla toplandı, PBS tamponu ile yıkandı ve 1×10^8 CFU/mL konsantrasyonda olacak şekilde RPMI-1640 ortamında (antibiyotik ve serumdan yoksun) yeniden süspanse edildi. HCT-116 hücrelerine 1 mL bakteri süspansiyonu eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerden, Western Blot'ta kullanılmak üzere protein izolasyonu yapıldı.

3.12. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama

3.12.1. *E.coli* 8739 Hücrelerinden Protein İzolasyonu

CHX ve AZM'nin *E. coli* üzerinde motiliteye etkisinin araştırılması kapsamında FliC ifadesi incelenmiştir. Belirtilen konsantrasyonlardaki AZM ve CHX ile inkübe edilen ya da edilmeyen (kontrol) bakteri kültürlerinden 1 ml 10 dakika 1844 xg 'de santrifüjlenmiştir ve supernatantın uzaklaştırılmasını takiben pellet, aynı santrifüj koşullarında PBS ile yıkanmıştır. İzolasyon tamponu hazırlarken soğuk PBS içerisine %0,05 (v/v) Triton X-100 (Merck), 1/100 PMSF (phenylmethylsulfonyl flüoride, ana stok 100 mM olacak şekilde dH₂O ile hazırlanmıştır) eklenmiş ve bakteri pelletleri üzerine 200 µL lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler buz içerisinde tutulmak üzere sonikasyon % 48 güç ile 5 saniye sonikasyon ardından 5 saniye durma şeklinde 20 döngü olarak prop (Bandelin; UW 2200) kullanılarak yapılmıştır. 14.000 xg 'de 15 dakika süreyle +4°C'de yapılan santrifüj sonunda süpernatantlar yeni eppendorflara alınmıştır.

3.12.2. *E.coli* 8739 hücreleri ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinden protein izolasyonu

3 saat boyunca *E.coli* 8739 hücreleri ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinden protein izolasyonu proteaz (Thermo Scientific) ve fosfataz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific) içeren T-PER (Thermo Scientific) protein lizis tamponu kullanılarak yapılmıştır. Besi yerinin uzaklaştırılmasını takiben hücreler buz üzerinde, soğuk PBS kullanılarak yıkanmıştır. Lizis tamponu eklenen hücrelerin kuyulardan kaldırılması için scraper kullanılmıştır. Lizis tamponu içindeki hücreler 1.5 ml ependorf tüplerine toplandıktan sonra, 5'er dakikalık zaman aralıklarında vortekslenmek üzere 30 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda proteinler, 14000xg'de, 4°C'de, 15 dakika boyunca santrifüj uygulanarak toplanmıştır.

Western blot'ta kullanılacak proteinlerin miktar tayini için Bradford ajanı (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için öncelikli olarak BSA (Bovin Serum Albumin)'nin bilinen konsantrasyonları ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulmasında üretici firmanın (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, ABD, Cat.No:23238) talimatları takip edilmiştir. Kullanılan BSA dilüsyonları Tablo 3.2'de verilmiştir. Western blot'ta SDS jelle yüklenecek proteinlerin miktarını belirlemek amacı ile protein konsantrasyonu, elde edilen bu standart eğriye göre belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Western blot için, 50 µg protein, % 12 SDS, % 30 (v/v) β-merkaptoetanol, % 30 (v/v) gliserol, % 0.02 (v/w) bromofenol mavisi, 375 mM Tris HCl (pH 6.8) içeren 6X yükleme boyası ile 95°C'de 6 dakika kaynatılmış, % 10'luk ayırma (separating) jeli ve % 4'lük yığılma (stacking) jeli olacak şekilde hazırlanan SDS-PAGE'e yüklenmiş ve 70V'da stacking jel (üst jel) ve 110V'da separating jel (alt jel) boyunca yürütülmüştür.

% 10'luk ayırma (separating) jeli

- 3,24 mL dH₂O
- 2,08 mL 4x Separating Buffer (Tris (Applichem): 0,5 M 181,7 g/L, SDS (Applichem) 3,84 g/L pH 8,8)
- 29:1 Akrilamid/bisakrilamid (Hoefer): 2,64 mL
- %10 APS (Merck): 40 µL
- Temed (Biorad): 10 µL

% 4'lük yığılma (stacking) jeli

- 1,806 mL dH₂O
- 779 µL 4x Stacking Buffer (Tris (Applichem): 0,5 M 60,56 g/L, SDS (Applichem) 3,84 g/L pH 6,8)
- 29:1 Akrilamid/bisakrilamid (Hoefer): 397 µL
- %10 APS (Merck): 14,98 µL
- Temed (Biorad): 3,74 µL

Jeldeki proteinlerin Poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarımından önce membran 30 saniye metanol ile aktive edilmiş ve ardından 5 dakika 1x transfer tamponunda (1x transfer tampon: 100 mL 10x transfer tamponu, 200 mL metanol, 700 mL dH₂O; 10x transfer tamponu: 25 mM 30,2 g/L Tris (Applichem), 192 mM 144 g/L Glisin (Serva) bileşenleri 1 L steril dH₂O ile çözündürülür) bekletilmiştir. Proteinler Hoefer TE70XP yarı-kuru transfer sistemi (Massachusetts, ABD) kullanılarak 200 mA'da 1.5 saat süreyle poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarılmıştır. Membran, Ponceau S (Serva; 0,2 g Ponceau S solüsyonu, karanlık ortamda 10 ml asetik asit ile çözündürülüp, dH₂O ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır) solüsyonu ile oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 30 dk inkübe edilerek, inkübasyon sonunda membran üzerindeki fazla boyanın giderilmesi amacıyla dH₂O ile yıkanarak Syngene G: BOX (Synoptics Ltd.; Nuffield Road, Cambridge) görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Görüntülenmenin ardından Ponceau S'in membrandan tamamen giderilmesi için yatay çalkalayıcı kullanılarak 3 kez ve her biri 15 dakika olmak üzere 1X TBS-T (Tris-Buffered Saline- % 0.1 Tween20, v/v) ile yıkama

yapılmıştır. 1X TBS-T içerisinde hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında, yatay çalkalayıcıda 1 saat boyunca inkübe edilen membran, takiben 4°C'de gece boyu yatay çalkalayıcıda primer antikor ile inkübe edilmiştir.

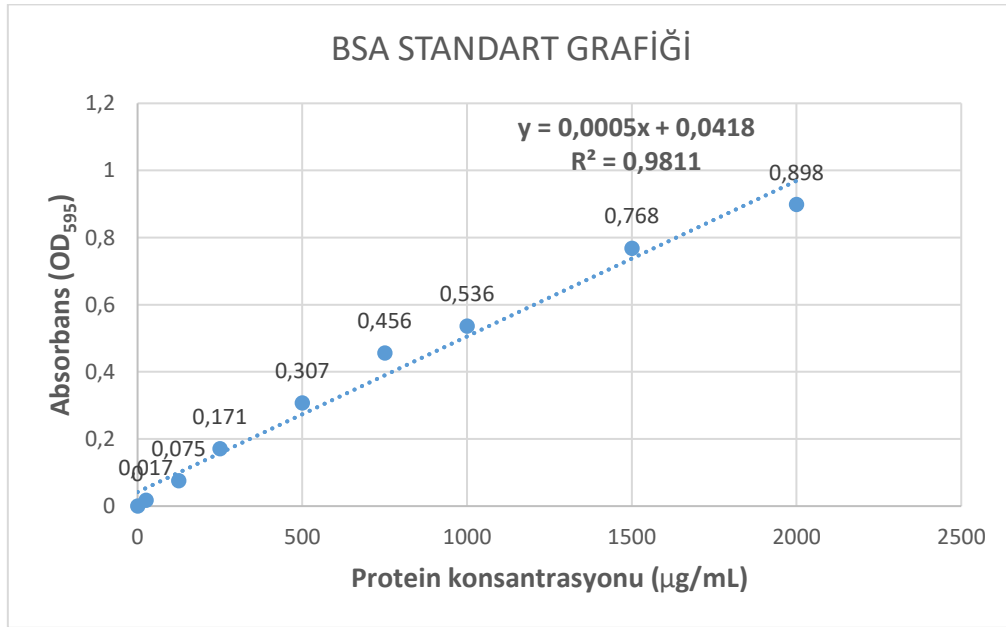
Tablo 3.1. Kullanılan Antikorlar

Primer Antikorlar	Hazırlanma Koşulları	Marka
FliC	1:3000 / yağsız süt	Biorbyt, Kat No: orb240580
Tlr5	1:300 / BSA	Santa Cruz, Kat No: 517439
p65	1:300 / BSA	Santa Cruz, Kat No: sc-8008
p-p65	1:300 / BSA	Santa Cruz, Kat No: sc-136548
ERK _{1/2}	1:750 / yağsız süt	Santa Cruz, Kat No: sc-93
pERK _{1/2}	1:750 / yağsız süt	Santa Cruz, Kat No: sc-16982
GAPDH	1:1000 / yağsız süt	Santa Cruz, Kat No: sc-25778
Sekonder Antikorlar	Hazırlanma Koşulları	Marka
Goat Anti-Rabbit IgG	1:1000 / yağsız süt	Bioss, Kat No: bs-0295G-HRP
Donkey Anti-Mouse IgG	1:5000 / yağsız süt	Santa Cruz, Kat No: sc-2314

Primer antikor toplandıktan sonra membran yatay çalkalayıcı kullanılarak 3 kez ve her biri 15 dakika olmak üzere 1X TBS-T ile yıkanmış ardından HRP konjuge ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İkinci antikor uzaklaştırılmış ve membran oda sıcaklığında her bir yıkama 15 dak olmak üzere 3 kez 1X TBS-T ile yıkanmıştır. Gerekliğinde, membranlar 30 dak oda sıcaklığında 0,1 M Glisin (pH: 2) ile ve/veya 1 dak 100°C'de stripping tamponu (65,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM 2-Mercaptoetanol; %2 SDS; dH₂O içinde) ile muamele edilmiştir, ardından 1X TBS-T ile seri yıkama adımları uygulanmıştır. Bandlar ECL solüsyonu (membran Serva ve/veya Advansta markalı ECL solüsyonları ile 3 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir) kullanılarak Syngene G: BOX (Synoptics Ltd.; Nuffield Road, Cambridge) görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Görüntüler, yükleme kontrolü (Poncuae S ile görüntülenen membran) ile Bio-Rad ImageLab Software 6.1 yazılımı kullanılarak normalize edilmiştir ve ekspresyon farkları kat değişimi olarak sunulmuştur.

Tablo 3.2. Standart Test Tüpü ve Mikroplaka Protokolleri için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500 µg/mL)

Ependorf etiketi	Dilüsyon miktarı	BSA(2mg/mL) kaynağı ve hacmi	Final BSA Konsantrasyonu
A	0	300 µL stok BSA	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL stok BSA	1500 µg/mL
C	325 µL	325 µL stok BSA	1000 µg/mL
D	175 µL	175 µL B dilüsyonu	750 µg/mL
E	325 µL	325 µL C dilüsyonu	500 µg/mL
F	325 µL	325 µL E dilüsyonu	250 µg/mL
G	325 µL	325 µL F dilüsyonu	125 µg/mL
H	400 µL	100 µL G dilüsyonu	25 µg/mL
I	400 µL	0	0 µg/ mL =Blank



Şekil 3.1. BSA Standart Grafiği

3.13. ATR-FTIR Spektroskopi Ölçümleri ve Veri Analizi

Antimikrobiyal varlığında büyütülen *E. coli* 8739 hücreleri ATR-FTIR spektroskopi tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bakteri süspansiyonları, hazırlanırken 1×10^8 /mL hücre yoğunluğuna eşitlendikten sonra PBS ile çözündürülmüşlerdir ve elde edilen süspansiyondan 2 μ L, ATR (Attenuated Total Reflectance) ünitesinin (MIRacle, PIKE) Zn/Se kristali üzerine yerleştirilerek inert azot gazı (N₂) ile 3 dakika süreyle kurutulmuştur. Örnekler ATR-FTIR spektrometresi (Frontier FTIR Spectrometer, Perkin Elmer) ile 4 cm^{-1} çözünürlük, 32 tarama olarak $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında toplanmıştır. Spektrumların eldesi Spectrum One (Perkin Elmer) yazılımı ile spektral veri analizi OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen spektrumlardan elde edilen her bir gruba ait ham spektrumlara 64 taban noktası ile Rubberband düzeltme yöntemi kullanılarak $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede temel çizgi (baseline) düzeltilmesi yapılmıştır. Spektrumların görsel ifadesinde ise her bir grubun temel çizgi düzeltilmesi yapılmış ortalama spektrumları kullanılmıştır. Çeşitli biyomoleküllere özgü bantların bütünleşik alanları, OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı ile belirlenen frekans aralıklarının integral alanları alınarak analiz edilmiştir. Ayrıca bant taban çizgisinin orta noktasından bandın tepe noktasına dikey olarak sanal bir çizgi çizilerek, çizginin uzunluğu sanal bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Daha sonra 0 olan nokta işaretlenerek bant genişliği değerleri elde edilmiştir.

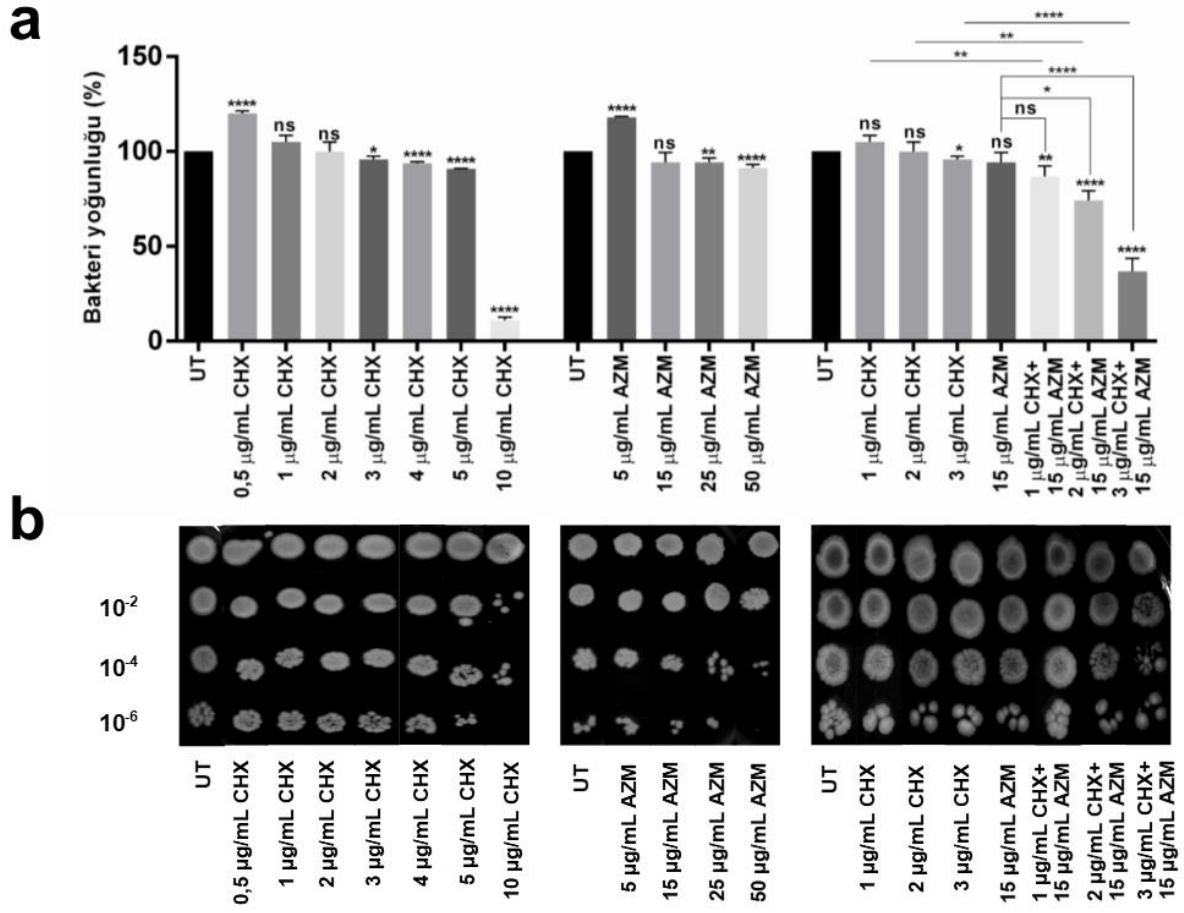
3.14. İstatiksel Analizler

Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri ve grafik çizimleri GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Veriler unpaired t-test uygulanarak analiz edilmiş olup anlamlılık dereceleri $p < 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ ***, $p \leq 0,0001$ **** olarak belirtilmiştir. Sonuçlar ortalama (Mean) \pm standart hata (SEM-standard error of the mean) olarak ifade sunulmuştur. Deneyler teknik replikeler içermek üzere en az iki biyolojik replike olarak tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR

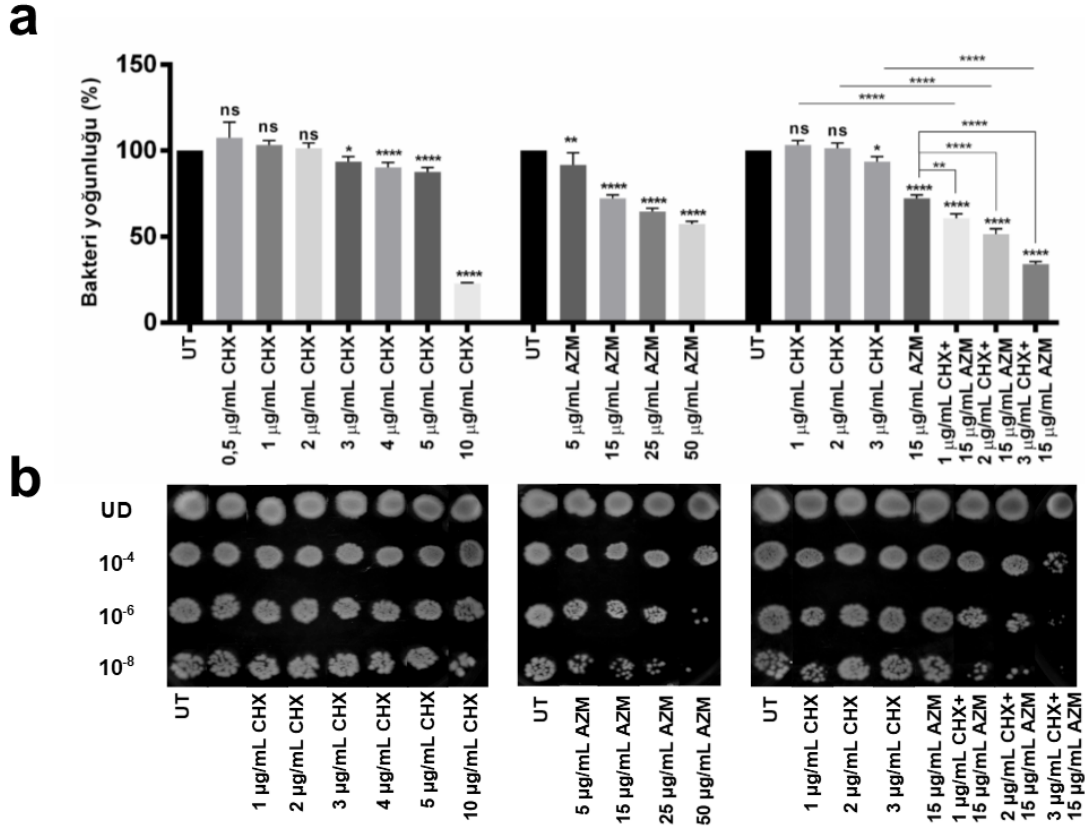
4.1. Klareksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteri Büyümesi zerine Etkisi

CHX ve AZM antimikrobiyelerinin tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* 8739 ve *E. coli* DH5 α suşları üzerinde antibakteriyel aktivitelemi, 8. ve 24. saatlerde 600 nm'de optik yoğunluklar llerek ve sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak araştırılmıştır (şekil 4.1-4.2 ve şekil 4.3-4.4). CHX'in 0,5 μ g/mL ile 10 μ g/mL arasında ve AZM'nin 5 μ g/mL ile 50 μ g/mL arasında değişen konsantrasyonlarındaki antibakteriyel aktivitelemi ve kombine uygulamaların büyüme üzerine etkisi makrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda CHX ve AZM kombinasyonunun, her iki suş için de büyüme inhibisyonunu arttırdığı hem 8. saat sonuçlarında hemde 24. saat sonuçlarında görülmektedir.



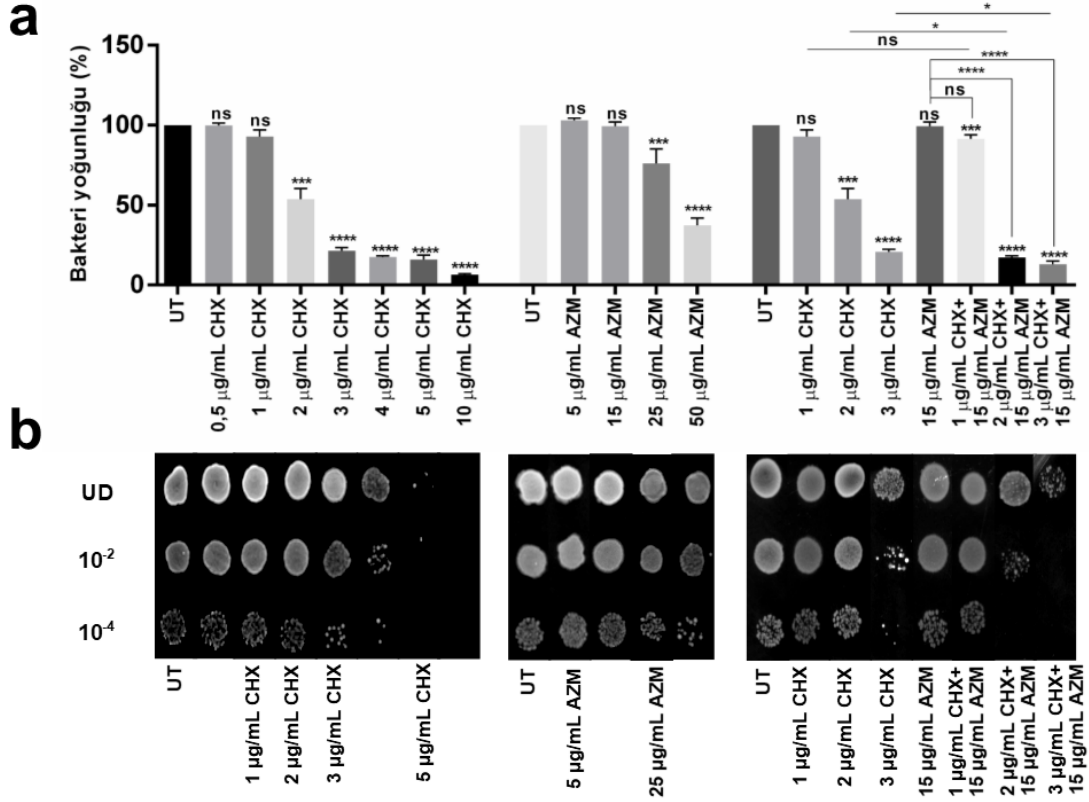
Şekil 4.1. *E. coli* ATCC 8739'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulamasını, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.

CHX ve AZM antimikrobiyallerinin tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* 8739 üzerinde 8. Saatteki antibakteriyel aktiviteleri, **a)** 600 nm'de optik yoğunluklar ölçülerek ve **b)** sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler, her biri en az üç teknik kopya içeren ve en az iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Antimikrobiyal uygulanan grupların tamamı UT grubu ile ve kombinasyon gruplarının tamamı ise kombinasyon grubunu oluşturan dozlar ile t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır ($p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).



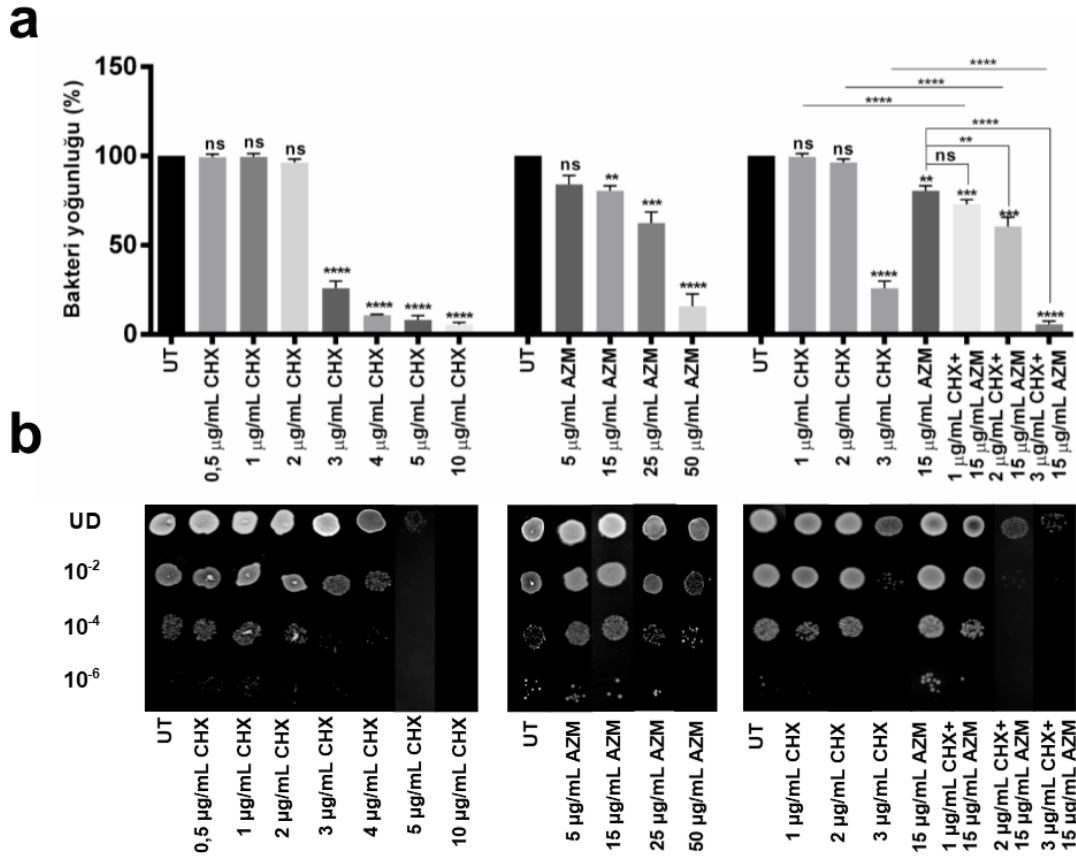
Şekil 4.2. *E. coli* ATCC 8739’da CHX ve AZM’nin Kombine Uygulamasını, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.

CHX ve AZM antimikrobisyonlarının tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* 8739 üzerinde 24. Saatteki antibakteriyel aktiviteleri, **a**) 600 nm’de optik yoğunluklar ölçülerek ve **b**) sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler, her biri en az üç teknik kopya içeren ve en az iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Antimikrobiyal uygulanan grupların tamamı UT grubu ile ve kombinasyon gruplarının tamamı ise kombinasyon grubunu oluşturan dozlar ile t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır ($p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).



Şekil 4.3. *E. coli* DH5α’da CHX ve AZM’nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.

CHX ve AZM antimikrobisyonlarının tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* DH5α üzerinde 8. Saatteki antibakteriyel aktiviteleri, **a**) 600 nm’de optik yoğunluklar ölçülerek ve **b**) ve sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler, her biri en az üç teknik kopya içeren ve en az iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Antimikrobiyal uygulanan grupların tamamı UT grubu ile ve kombinasyon gruplarının tamamı ise kombinasyon grubunu oluşturan dozlar ile t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır ($p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

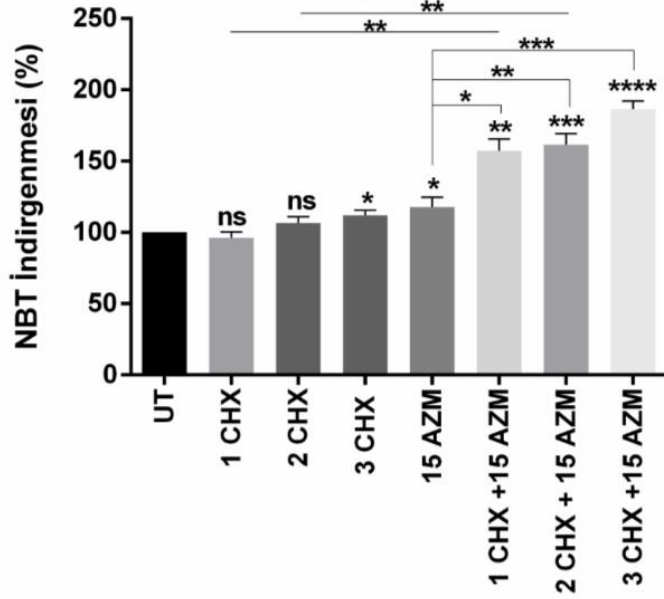
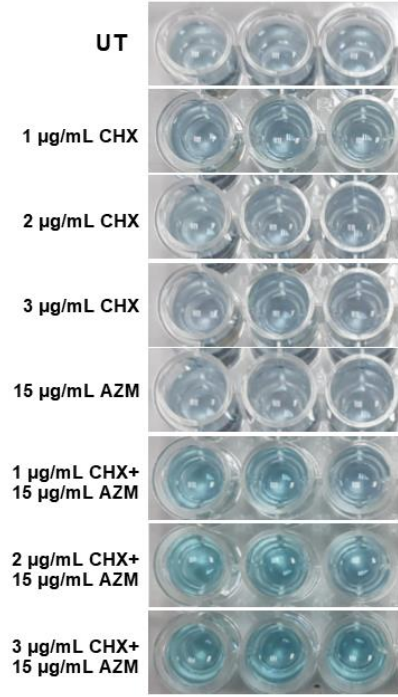


Şekil 4.4. *E. coli* DH5α'da CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Büyüme İnhibisyonunu Arttırır.

CHX ve AZM antimikrobiyallerinin tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* DH5α üzerinde 24. Saatteki antibakteriyel aktiviteleri, **a**) 600 nm'de optik yoğunluklar ölçülerek ve **b**) ve sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler, her biri en az üç teknik kopya içeren ve en az iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Antimikrobiyal uygulanan grupların tamamı UT grubu ile ve kombinasyon gruplarının tamamı ise kombinasyon grubunu oluşturan dozlar ile t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır ($p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

4.2. Kloresidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi

Tek başına veya kombinasyon halinde CHX ve AZM ile 24 saat boyunca muamele edilen *E. coli* ATCC 8739'da oksidatif stres, NBT testi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.5a'da görüldüğü üzere 15 µg/ml AZM oksidatif strese neden olurken, CHX ve AZM'nin kombine uygulaması, CHX konsantrasyonuna bağlı olarak bu etkiyi arttırmıştır. Şekil 4.5b'de ise yapılan NBT testlerinden birine ait olmak üzere temsili plaka görüntüsü yer almaktadır.

a**b**

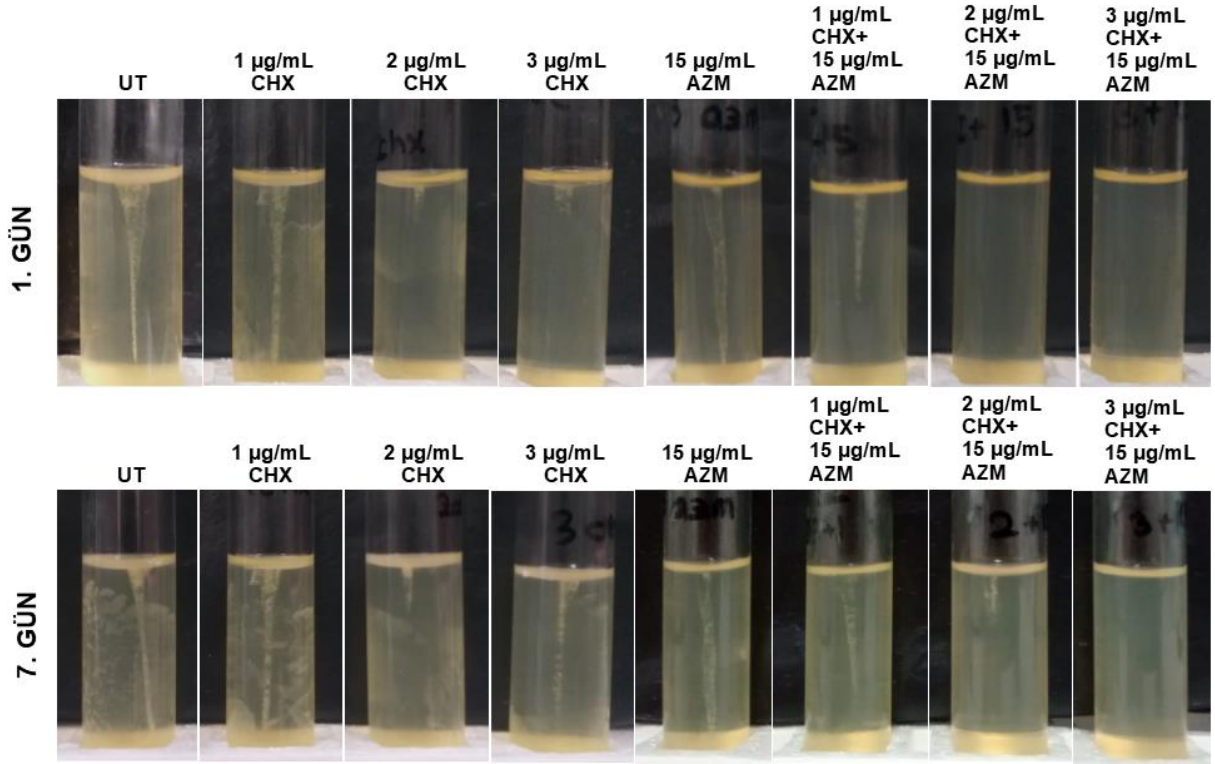
Şekil 4.5. CHX Ve AZM'nin Kombine Uygulamasını, Oksidatif Stresi Arttırır

a-b) *E. coli* ATCC 8739 CHX, AZM veya CHX + AZM ile 24 saat inkübe edildikten sonra oksidatif stres, NBT indirgenme deneyi ile belirlenmiştir. Her grup için NBT'nin indirgenme seviyeleri, muamele görmemiş kontrol (UT) grubuna göre normalize edilerek yüzde (%) değişim olarak verilmiştir. Deneyler, her biri üç teknik replike içermek üzere iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için t-test kullanılmıştır. ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, $\neq p \leq 0.05$, ns: non-significant).

4.3 Kloresidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteriyel Motilite Üzerindeki Etkisi

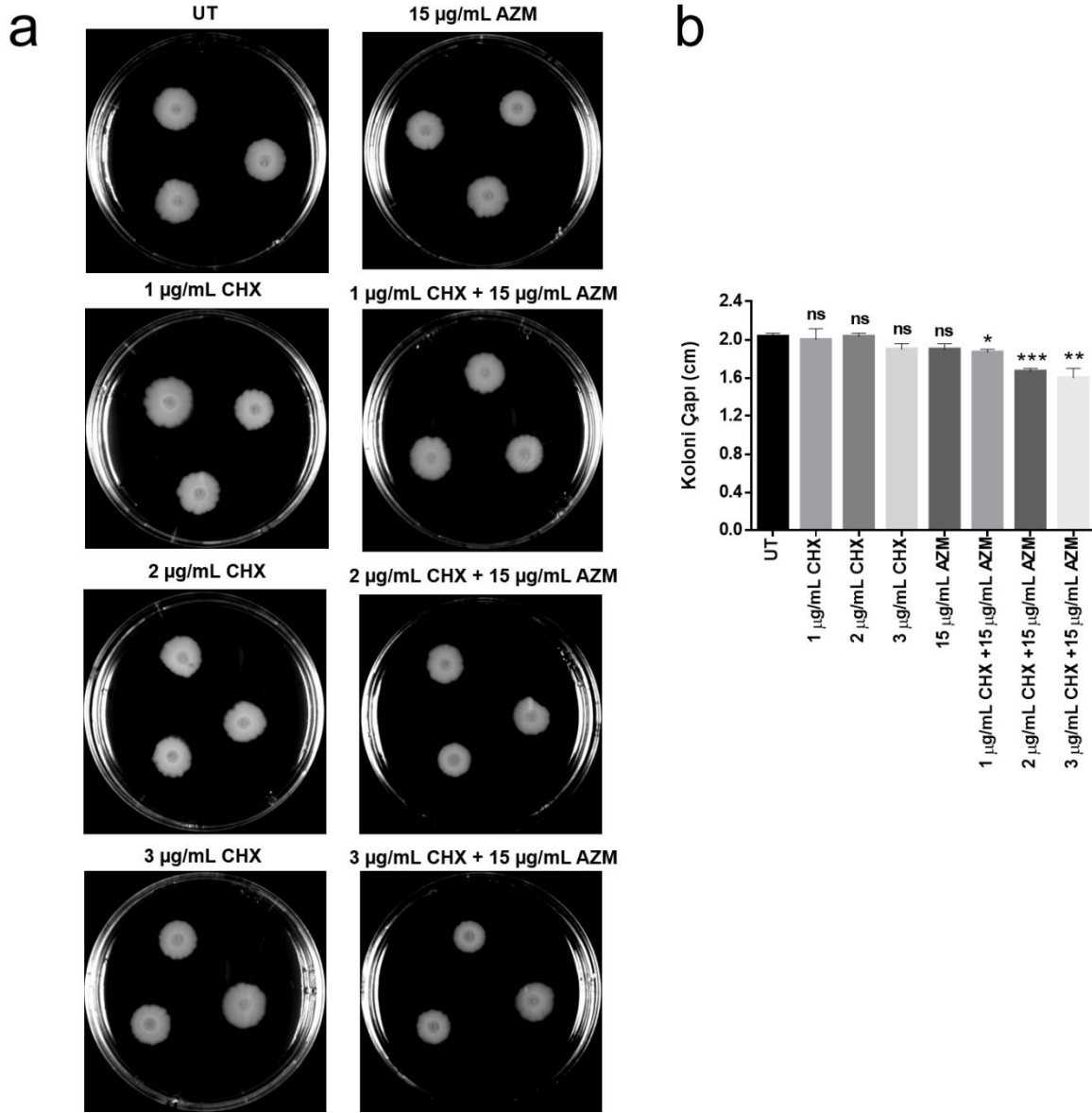
AZM ve CHX'in tek başına ve kombinasyon halinde uygulandığında *E. coli* motilitesi üzerindeki etkisi, yarı-katı agar motilite testi ve swarming motilite testi kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 4.6- Şekil 4.7). Agar motilite testinde hareketsiz bakteriler genellikle aşılmanın yapıldığı bıçak çizgisiyle sınırlı büyüme gösterirken, hareketli bakteriler agarın aşılama bölgesinden başlayarak yayılırlar ve ortamı gözle görülür şekilde bulanıklaştırırlar (Palma vd., 2022: 563). Agar motilite testi 7 gün boyunca takip edilerek 1. gün ve 7. gün sonuçları Şekil 4.6'da sunulmuştur. CHX'in artan konsantrasyonlarında tüplerdeki bulanıklığın doza bağımlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. 2 µg/mL CHX + 15 µg/mL AZM ve 3 µg/mL CHX + 15 µg/mL AZM gruplarında ise büyüme inhibisyonu gözlenmektedir. Swarm motilite testinde koloni morfolojileri görüntülenmiştir (Şekil 4.7).

Antimikrobiyal kombinasyon dozlarında koloni çap genişliklerinin küçüldüğü, swarm hareket fenotipinin inhibe olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Motilite Yeteneğini Azaltır.

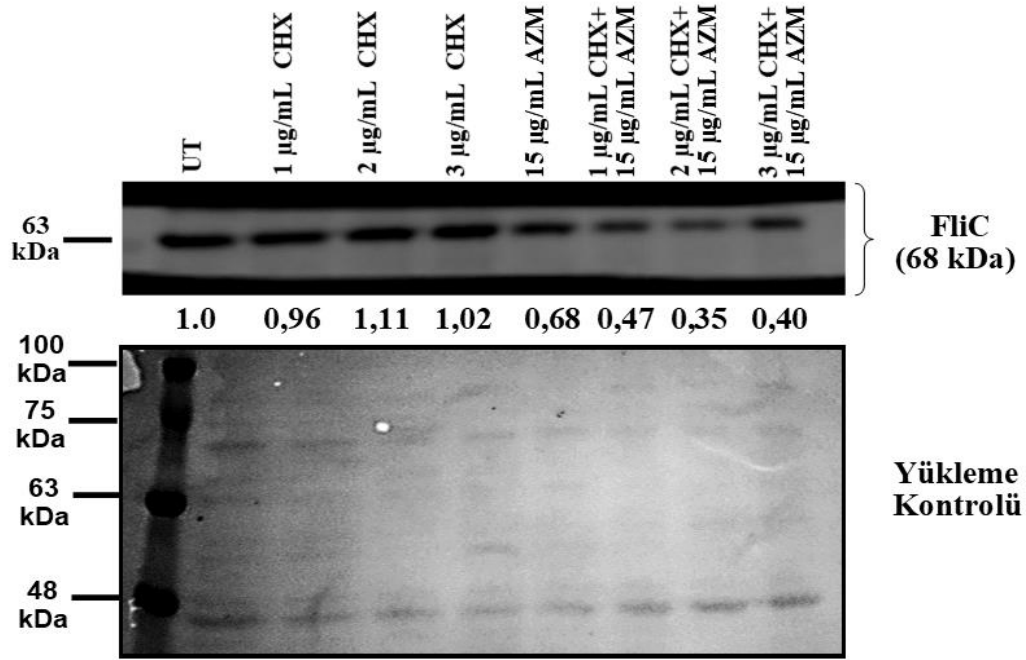
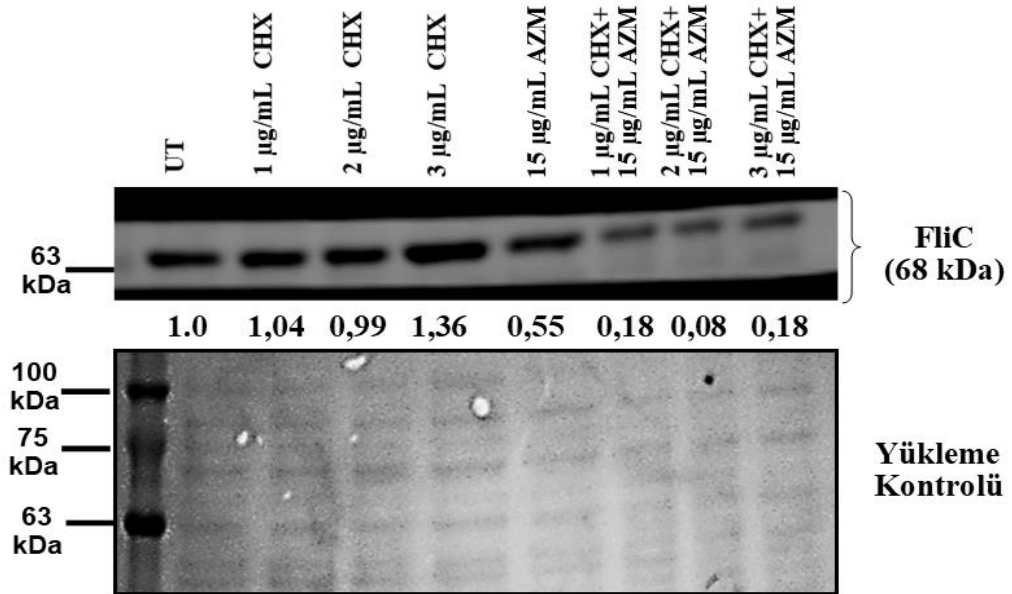
7 gün boyunca sadece CHX, sadece AZM ve CHX + AZM ortamları üzerinde *E. coli* 8739 suşunun hareketliliğini gösteren temsili tüpler.



Şekil 4.7. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, Swarm Motilite Yeteneğini Azaltır.

Sadece CHX, sadece AZM ve CHX + AZM ile muamele edilmiş swarm agar plakalar üzerinde *E.coli* 8739 suşunun 3 gün sonundaki **a)** koloni görünüşleri ve **b)** koloni çap ölçümleri

Bahsedildiği üzere *E. coli*, hareket için çoklu flagellum (çoğul: flagella) kullanır (Sim vd., 2017: 2). *E. coli*'de *fliC* geni tarafından kodlanan flagellin, flagella filamentlerinin ünitesidir (Reid vd., 1999: 153). 8 ve 24 saat boyunca tek başlarına ya da kombine halde CHX ve AZM ile muamele edilen *E. coli* ATCC 8739'da motilite ile ilgili olarak FliC ifadesindeki değişim, western blot ile araştırılmıştır. Şekil 4.8a'da ve Şekil 4.8b'de görüldüğü üzere AZM tek başına kullanıldığında FliC ifadesinde düşük seviyeli bir azalma söz konusu iken olurken bu azalma, CHX ile kombine uygulamalarda CHX dozuna bağlı olarak artmıştır.

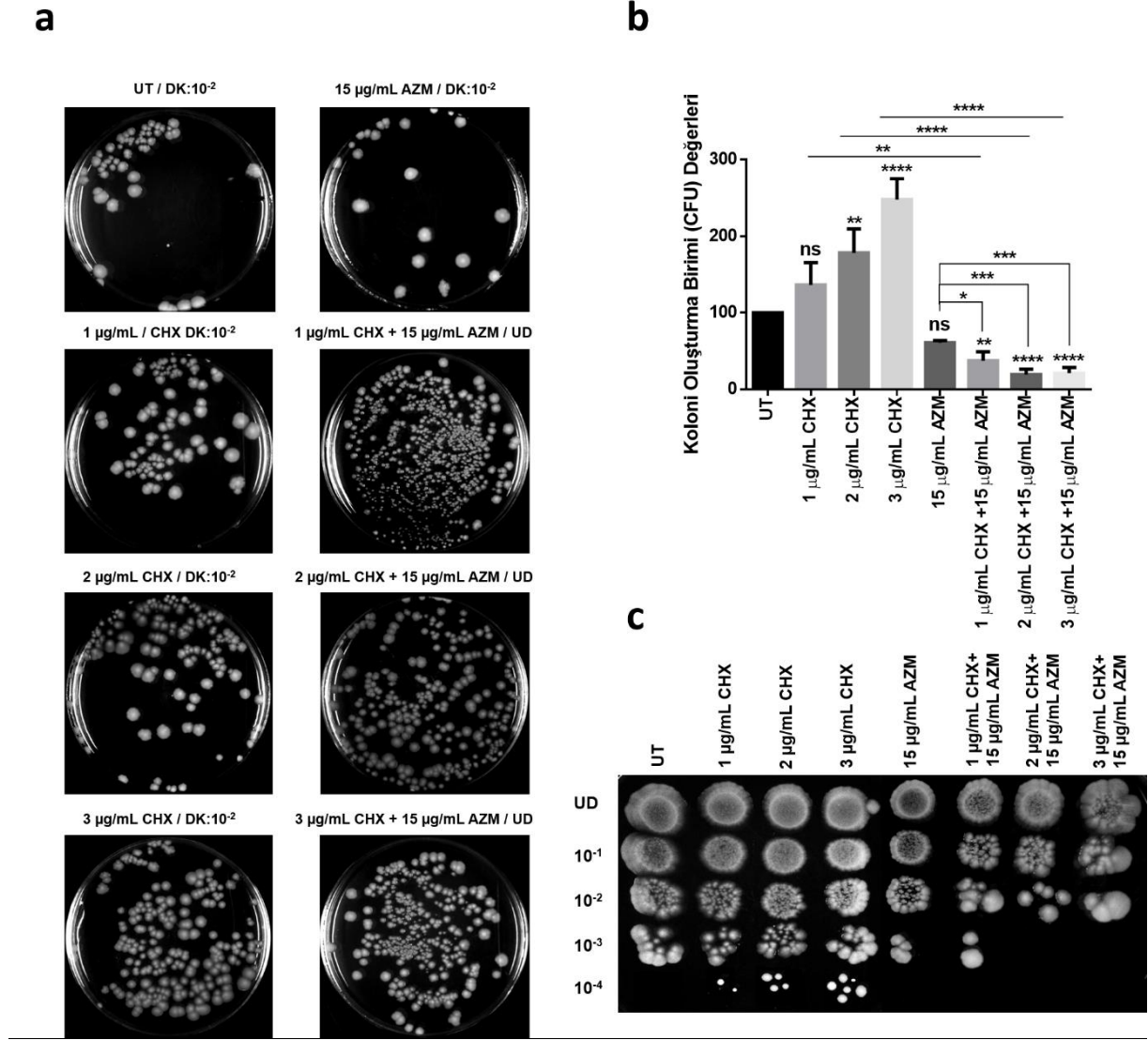
a**b**

Şekil 4.8. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, FliC İfadesini Azaltır.

E. coli ATCC 8739 suşunun sadece CHX, sadece AZM ve CHX + AZM ortamları ile inkübasyonunun a) 8. saatindeki ve b) 24. saatindeki FliC protein ekspresyon seviyeleri Western blot ile görüntülenmiştir ve yükleme kontrolü ile normalizasyon sonucu ekspresyon farkları kat değişimi olarak verilmiştir.

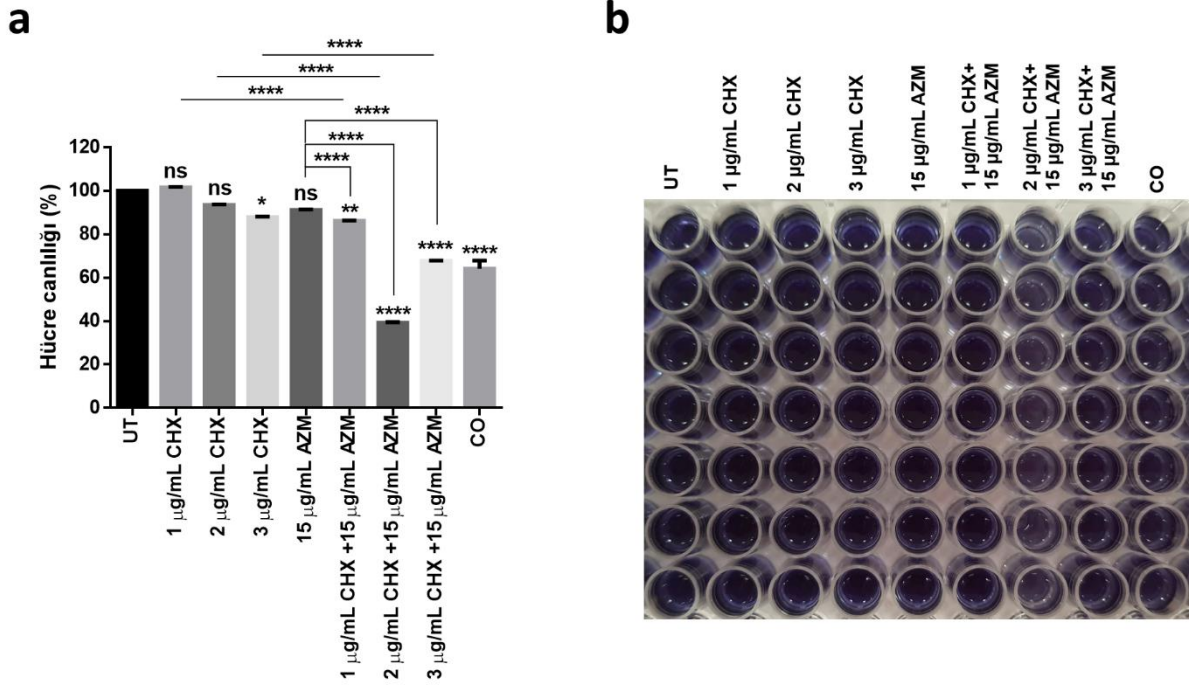
4.4 Klareksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Bakteriyel Adhezyon Üzerindeki Etkisi

E. coli 8739 üzerinde CHX ve AZM'nin tek başlarına ve kombinasyon halinde uygulanmasının HCT-116 kolon karsinomu hücrelerine adhezyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *E. coli* 8739 ve HCT-116 hücrelerinin birlikte inkübe edilmesinin ardından HCT-116 hücrelerine yapışan *E. coli* 8739 hücrelerinin sayısı koloni oluşturan birimler hesaplanarak belirlenmiştir (Şekil 4.9a-b) ve agar spot plakalar ile bakteri sayıları arasındaki fark görsel olarak sunulmuştur (Şekil 4.9c). Sonuçlara göre CHX ile artan bakteriyel adhezyonun, CHX ve AZM kombinasyonu ile engellendiği görölmektedir. Ayrıca *E. coli* 8739 ve HCT-116 hücrelerinin birlikte inkübe edilmesinin ardından HCT-116 hücrelerinin canlılık değerleri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.10a-b).



Şekil 4.9. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması *E. coli* 8739'un HCT-116 Kolon Karsinomu Hücrelerine Adhezyonunu Engeller ve Hücre Canlılığını Azaltır.

a-b) Adhezyon testi sonucunda HCT116 hücrelerine yapışan *E.coli* 8739 hücrelerinin sayısı koloni oluşturan birimler sayılarak ve **c)** agar spot plaka testi ile belirlenmiştir. Her grup, muamele görmemiş kontrol (UT) grubuna göre normalize edilerek yüzde (%) değişim olarak verilmiştir. Deneyler, her biri en az üç teknik replike içermek üzere iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için t-test kullanılmıştır. (CO; cells only, DK; dilüsyon katsayısı, UD; Un-diluted. $p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, $\neq p \leq 0.05$, ns: non-significant).

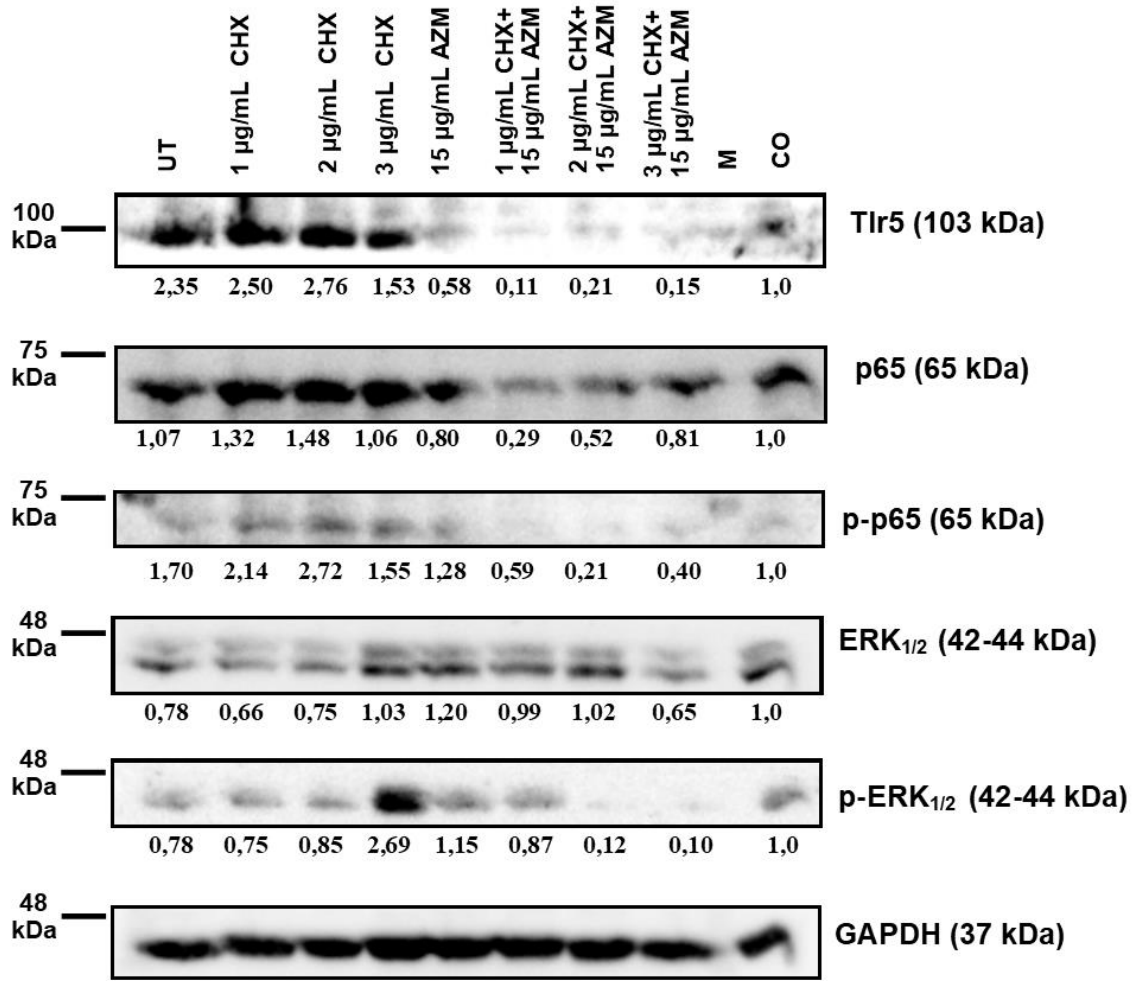


Şekil 4.10. *E.coli* 8739 Üzerinde CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması, HCT-116 Kolon Karsinomu Hücrelerinin Canlılığını Azaltır.

a-b) Her grup için MTT'nin indirgenme seviyeleri, muamele görmemiş kontrol (UT) grubuna göre normalize edilerek yüzde (%) değişim olarak verilmiştir. Deneyler, her biri en az üç teknik replike içermek üzere iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için t-test kullanılmıştır. (CO; cells only. $p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***, $p \leq 0.0001$ ****, $\neq p \leq 0.05$, ns: non-significant).

4.5. Klareksidin ve Azitromisin'in Tek Başına veya Kombinasyon Halinde MAPK ve NF- κ B Hücre Sinyal Yolakları Üzerindeki Etkileri

Flagella, TLR5 aracılı konakçı immün yanıtının anormal stimülasyonu yoluyla patogeneze rol oynar. UT ve CHX gruplarında artan TLR5 ifadesinin CHX ve AZM kombinasyon gruplarında baskılandığı görülmektedir. TLR5, p38, JNK (c-Jun N-terminal kinaz 1) ve ERK1–2 (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 ve 2) gibi NF- κ B ve MAPK'lere bağımlı genlerin transkripsiyonunu uyarır (Batah vd., 2016; 117). Bu nedenle HCT-116 hücrelerinde flagellin-TLR5 etkileşimi tarafından indüklenen NF- κ B ve MAP kinaz sinyal yolaklarının aktivasyonu incelenmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi kombine uygulama, p65 ve ERK_{1/2} aktivasyonunu azaltmıştır.

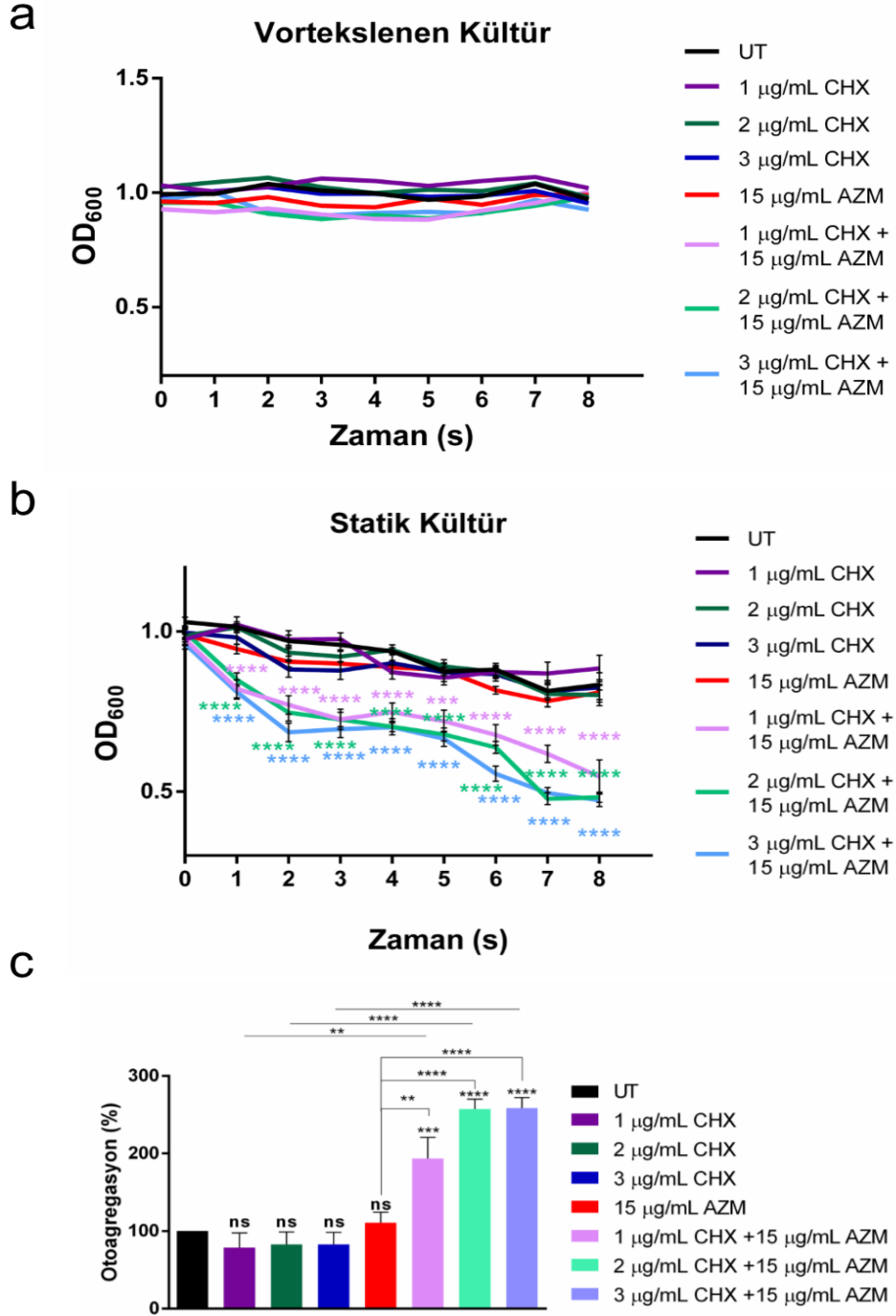


Şekil 4.11 CHX ve AZM'nin Kombine Uygulandığı Bakteriler HCT-116 Hücrelerinde Flic ile Uyarılan TLR5 Yolağında P65 ve ERK_{1/2} Aktivasyonunu Baskılar.

4.6 CHX ve AZM'nin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Otoagregasyon Etkisi

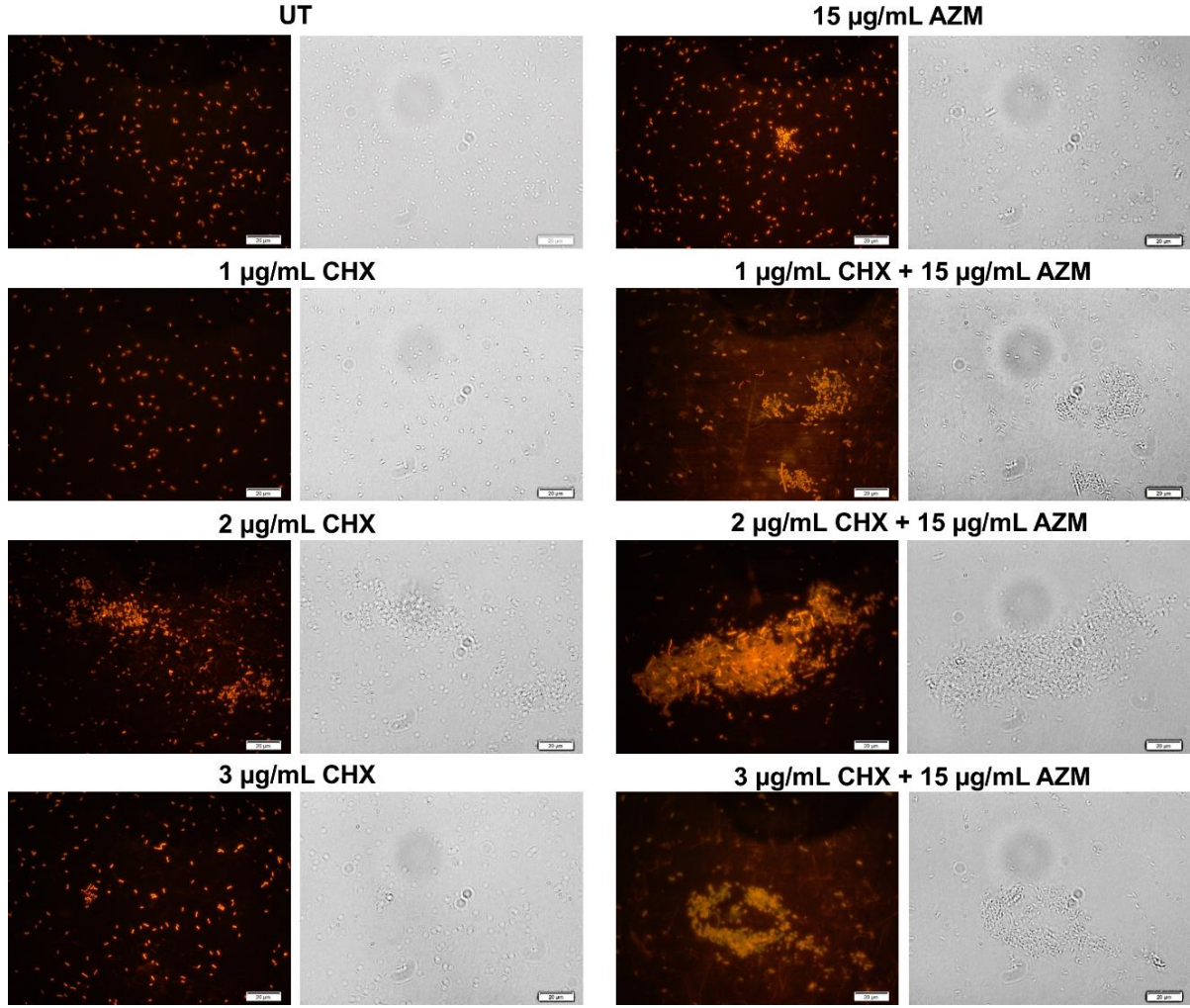
Bakteri hücrelerinin oksidatif stres gibi çevresel strese karşı bir savunma mekanizması olarak kümelenme davranışı gösterdiği bilinmektedir (Trunk vd., 2018:140). Sedimentasyon testi, kümelenen bakterilerin buldukları sıvı içerisinde dibe çökme davranışının analizine dayanır (Trunk vd., 2018:140). 24 saat boyunca CHX ve AZM'nin tek başına veya kombine muamelesine tabi tutulan *E. coli* ATCC 8739 suşunda otoagregasyon, statik bırakılan veya vortekslenen kültürlerin 600 nm'de optik yoğunluğunun ölçümü ile belirlenmiştir. Şekil 4.12a'da görüldüğü gibi vortekslenen kültürlerde optik yoğunluk, gruplar arası farklılık göstermezken, statik olarak bırakılan kültürlerde CHX ve AZM kombinasyonu çökme hızını arttırmıştır (Şekil 4.12b). Daha iyi bir görsel ifade için ise Şekil 11c'de, 0. Saat ile 8. Saat arasındaki çökme hızı farkı gruplar arasında otoagregasyon yüzdesi olarak verilmiştir ve

kombinasyon gruplarındaki otoagregasyon artışı net olarak görülmektedir (Şekil 4.12c). CHX ve AZM'nin kombine uygulamasının *E. coli*'de otoagregasyona neden olduğu, flouresan mikroskop görüntülerinde de görülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması Otoagregasyonu Teşvik Eder.

a) Her deney grubu için vortekslenen ve **b)** statik bırakılan kültürlerin OD₆₀₀ değerleri verilmiştir. Deneyler, her biri üç teknik replike içermek üzere iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. **c)** 8. saatteki otoagregasyon yüzdesi. İstatiksel anlamlılık kontrol (UT) grubuna göre, t-test kullanılarak belirlenmiştir (p ≤ 0.01 **, p ≤ 0.001 ***, p ≤ 0.0001 ****, ns: non-significant).



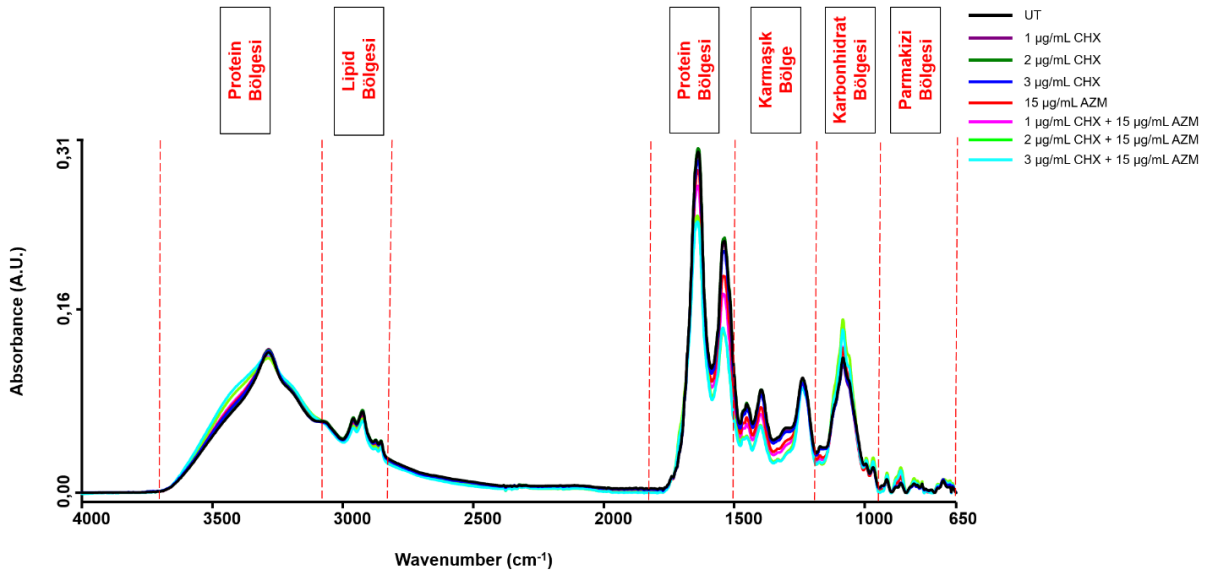
Şekil 4.13. CHX ve AZM'nin Kombine Uygulaması Otoagregasyonu Teşvik Eder.

CHX ve AZM muameleri sonunda *E. coli* ATCC 8739'da otoagregasyon, PI boyamasını takiben flouresans mikroskobu (100x objektif) kullanılarak görüntülenmiştir. Aynı görüntüler beyaz ışık ile de alınarak birlikte sunulmuştur.

4.7 CHX ve AZM Antimikrobislerinin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde *E. coli* 8739 Suşu Üzerindeki Biyokimyasal Değişimlerinin ATR-FTIR Spektroskopisi ile Tanımlanması

Kızılötesi spektroskopisinden elde edilen spektrumlar, bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısıyla ortamdaki mevcut moleküllerin konsantrasyonu ile yapı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler verir (Garip vd., 2009: 1304; Ozek Simsek vd., 2010: 45). Kızılötesi spektral bölge ($4000-650\text{ cm}^{-1}$) çeşitli hücrel moleküllerin farklı fonksiyonel gruplarından ortaya çıkan moleküler titreşimleri temsil etmektedir. Bu moleküler titreşimlerdeki modülasyonlar, kilit taşı biyomoleküllerin yapısını ve işlevselliğini etkilemektedir (Gurbanov vd., 2021: 200). Çalışmanın bu bölümünde CHX ve AZM

antimikrobiyallerinin tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* 8739 suşunun hücresel bileşenleri üzerinde meydana getirdiği değişimler ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Spektral bantlar, ortalama spektrumlar kullanılarak; protein (3300 cm^{-1} -3000 cm^{-1} ; 1800 cm^{-1} -1500 cm^{-1}), lipid (3100 cm^{-1} -2800 cm^{-1}), karmaşık (1500 cm^{-1} -1200 cm^{-1}), karbonhidrat ve nükleik asit (1200 cm^{-1} -900 cm^{-1}), parmakizi (true fingerprint; 900 cm^{-1} -650 cm^{-1}) bölgeleri olmak üzere 5 alt spektral bölgede incelenmiştir (Şekil 4.14). Spektrumun farklı spektral bölgelerinde absorbans değerleri en yüksek olan bantlar seçilerek bant alanları (band area), bant alan oranları ve bant genişlikleri (bandwidth) gibi spektral parametreler analiz edilmiştir (Tablo 4.1). Analiz edilen bantlardaki değişimler 3700-2800 cm^{-1} ve 1800-650 cm^{-1} spektral ana bölgelerinde sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

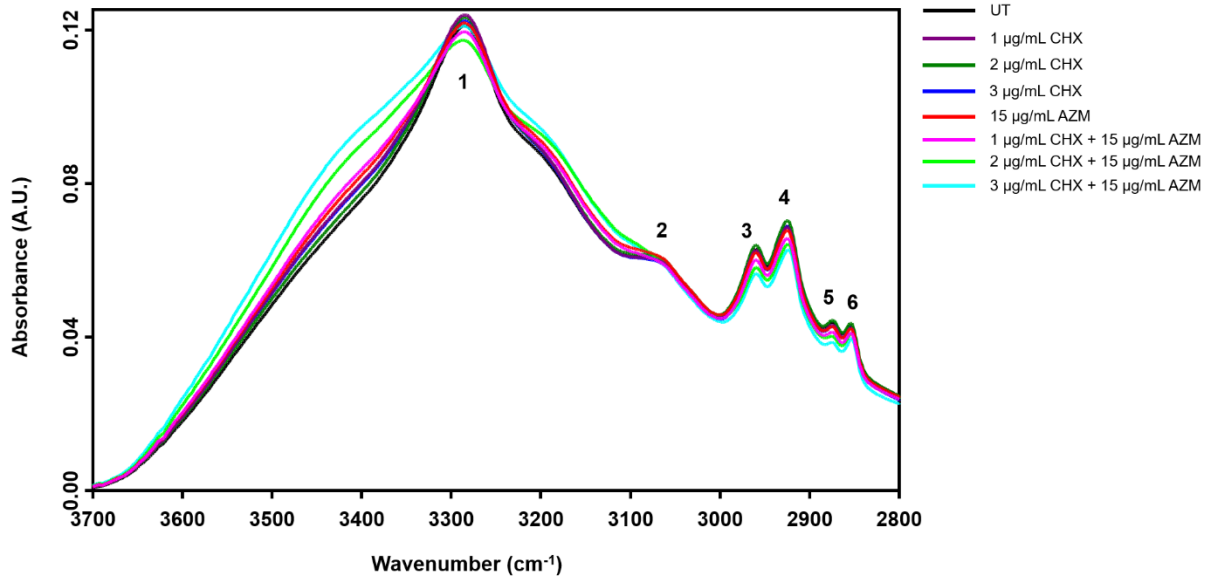


Şekil 4.14 Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen *E. coli* 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (4000–650 Cm^{-1}) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.

Taban çizgisi düzeltmesi, 64 taban noktası ile Rubberband düzeltme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Spektrumlar, OPUS 5.5 (Bruker) yazılımında işlenmiştir.

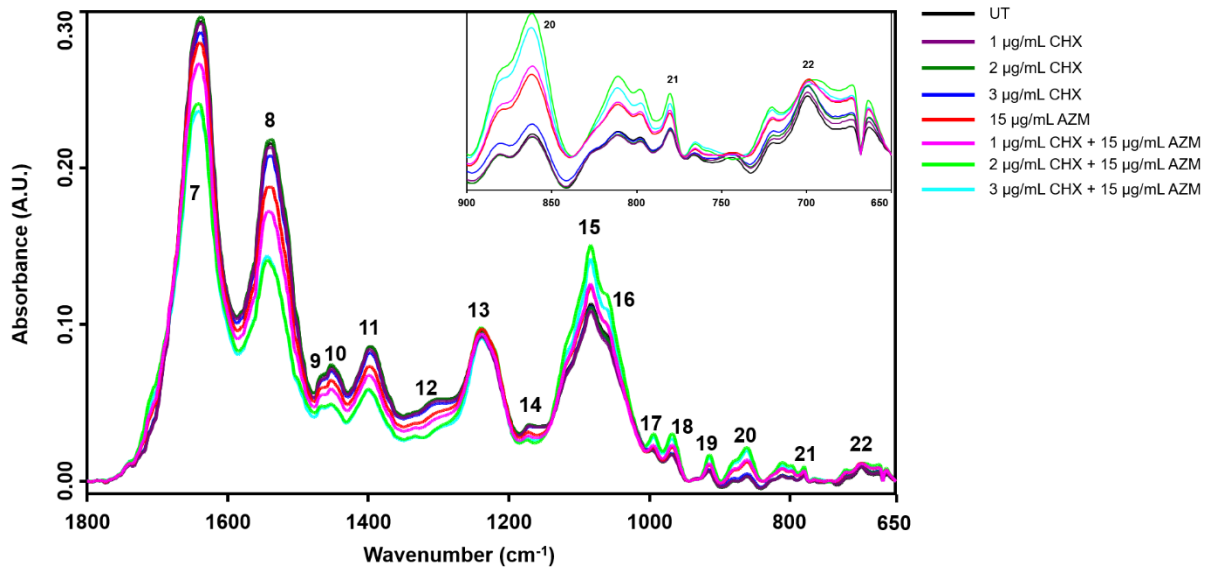
Tablo 4.1. *E.coli* 8739 Suşuna Ait Bir IR Spektrumunun Bant Atamaları.

Spektral Bölge	Band no	Dalga Boyu (cm ⁻¹)	Bant Tanımı	Kaynak
Lipid Bölgesi (3100 cm ⁻¹ – 2800 cm ⁻¹)	1	2960	CH ₃ antisimetrik gerilmeleri	Ceylani vd., 2022: 114825
	2	2924	CH ₂ antisimetrik gerilmeleri	Ceylani vd., 2022: 114825
	3	2874	CH ₃ simetrik gerilmeleri	Ceylani vd., 2022: 114825
	4	2853	CH ₂ simetrik gerilmeleri	Ceylani vd., 2022: 114825
Protein Bölgesi (3300-3000; 1800 cm ⁻¹ – 1500 cm ⁻¹)	5	3290	Amid A	Faghihzadeh, 2018
	6	3060	Amid B	Faghihzadeh, 2018
	7	1640	Amid I	Ardahanli vd., 2022: 106873
	8	1535	Amid II	Ardahanli vd., 2022: 106873
Karmaşık Bölge (1500 cm ⁻¹ – 1200 cm ⁻¹)	9	1466	Lipit asil zincirinin CH ₂ makaslama modu	Zanyar vd., 2008: 152
	10	1452	CH ₂ bükme	Wang vd., 2012: 4
	11	1400	CH ₃ simetrik deformasyonu	Zanyar vd., 2008: 150
	12	1307	Amid III	Sheng vd., 2015: 21
	13	1240	PO ₂ ⁻ antisimetrik gerilmeleri	Gurbanov ve Yıldız, 2017: 120
Karbonhidrat ve Nükleik asit Bölgesi (1200 cm ⁻¹ – 900 cm ⁻¹)	14	1170	C-OH antisimetrik gerilmeleri	Yonar vd., 2022: 166473
	15	1080	PO ₂ ⁻ simetrik gerilmeleri	Garip vd., 2007: 187
	16	1053	Sakkaritlerin C–C, C–O, C–O–C, ve C–O–P grupları	Zanyar vd., 2008: 140
	17	995	C-O riboz, C-C	Zanyar vd., 2008: 137
	18	965	C-O deoksiriboz, C-C	Zanyar vd., 2008: 136
	19	916	C-O-C halka titreşimi	Wang vd., 2012: 4
Parmakizi Bölgesi (900 cm ⁻¹ – 600 cm ⁻¹)	20	860	CH ₂ deformasyonu	Kizil vd., 2002: 3915
	21	780	Urasil bazlı halka breathing germe modu	Jin ve Martin, 2017: 408
	22	700	Düzlem dışı C-H bükülmesi	Navas vd., 2008: 145; Buzoianu ve Socaciu 2014: 547



Şekil 4.15. Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen *E. coli* 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (3700–2800 cm^{-1}) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.

Taban çizgisi düzeltmesi, 64 taban noktası ile Rubberband düzeltme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Spektrumlar, OPUS 5.5 (Bruker) yazılımında işlenmiştir.

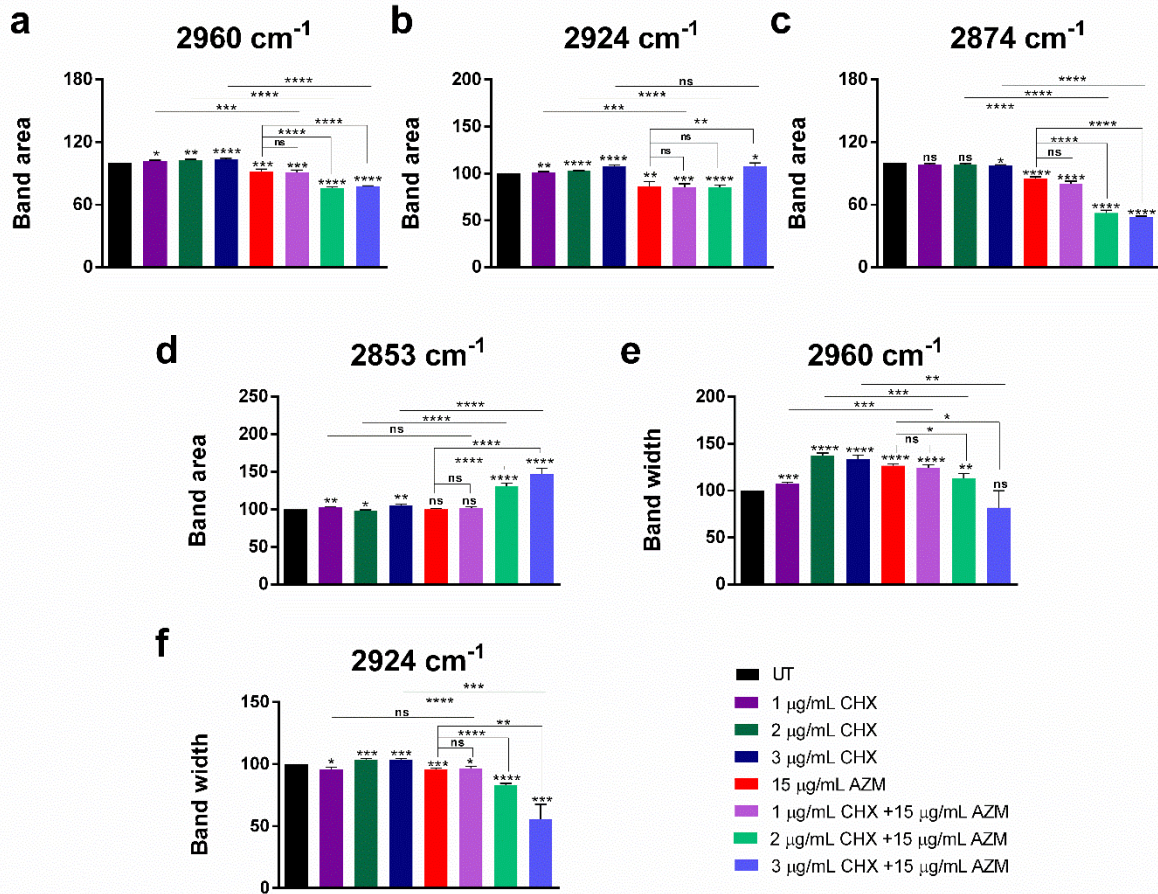


Şekil 4.16. Antimikrobiyal Varlığında veya Yokluğunda Büyütülen *E. coli* 8739 Suşuna Ait Tüm Kızılötesi Spektral Bölgesinin (1800–650 cm^{-1}) Ortalama Taban Çizgisi Düzeltilmiş Spektrumları.

Taban çizgisi düzeltmesi, 64 taban noktası ile Rubberband Lastikbant düzeltme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Spektrumlar, OPUS 5.5 (Bruker) yazılımında işlenmiştir.

4.7.1. Lipid (3100-2800 cm⁻¹) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler

Çeşitli bakteri zarı amfifillerinin zincirleri (örneğin, fosfolipidler) ve yan zincir titreşimleri, CH₃, CH₂ ve CH fonksiyonel gruplarının -CH gerilme titreşimleri nedeniyle gözlenen 3100-2800 cm⁻¹ civarındaki bölgedeki tepe noktaları ile karakterize edilebilir (Şekil 4.15). Bu bölgede 2960 cm⁻¹, 2923 cm⁻¹, 2876 cm⁻¹, 2851 cm⁻¹ dalga boylarında yer alan bantlar sırasıyla yağ asitlerinin CH₃ antisimetrik, CH₂ antisimetrik, CH₃ simetrik, CH₂ simetrik grupları ile ilişkilendirilir (Zanyar vd., 2008: 159) (Şekil 4.17). CH₃ antisimetrik ve simetrik gerilmelerinin antimikrobiyal kombinasyonu uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.17a; Şekil 4.17c). CH₂ antisimetrik ve simetrik bant alanlarının ise tek başına CHX uygulanan gruplarda arttığı görülmektedir (Şekil 4.17b; Şekil 4.17d) CH₂ antisimetrik gerilme bantlarının bant genişliği, lipid molekülünün hareket hızları ile ilgili olduğu için membran dinamiği hakkında bilgi verir (Ceylani vd., 2022: 114825). Bu bantların bant genişliklerindeki artış, membran dinamiğinde bir artış anlamına gelir. Ayrıca, membran organizasyonunun bozulmasının, membran akışkanlığındaki azalma ile doğrudan ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Ceylani vd., 2022: 114825). Bu nedenle, lipid içeriğindeki ve membran dinamiklerindeki değişiklikler, daha güvenilir olarak bant alan oranları ve Bw_{2922} / Bw_{2955} hesaplanarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.18).

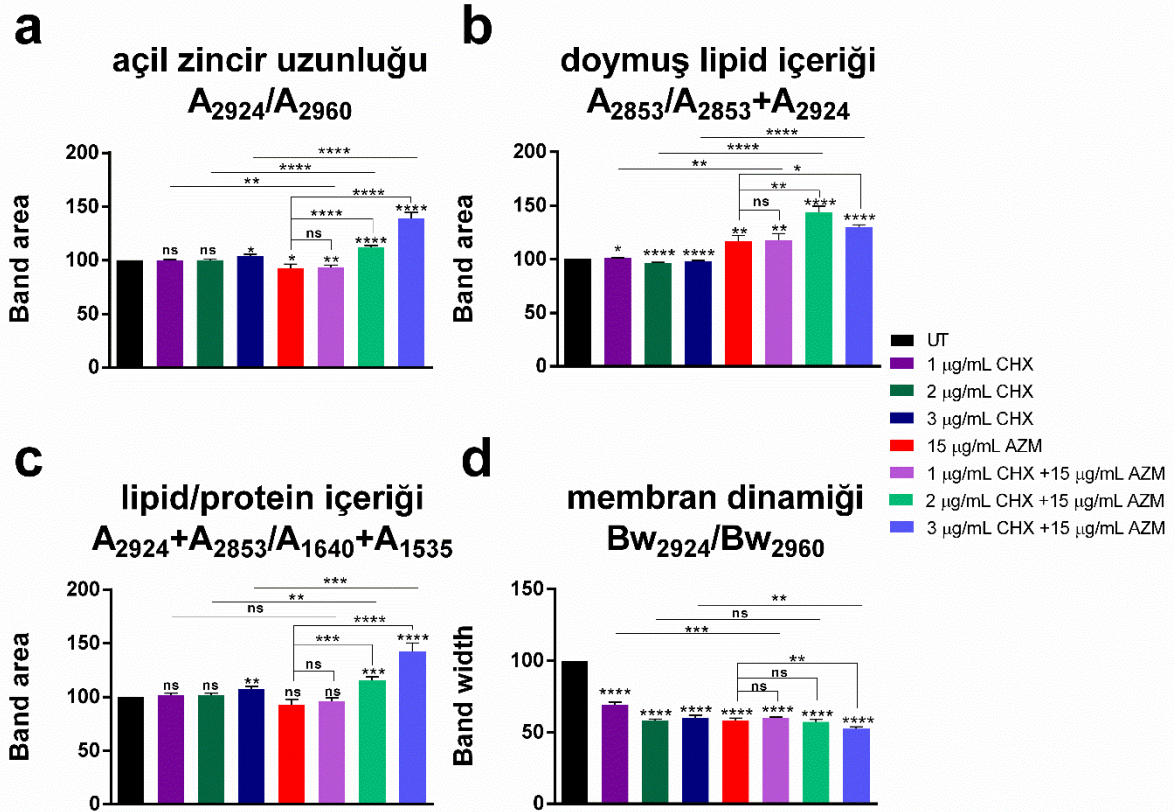


Şekil 4.17. Lipid Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.

Her grup, UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

CH₂ antisimetrik (2924 cm⁻¹) ve CH₃ antisimetrik (2960 cm⁻¹) gruplarının oranı doymuş yağ asitlerinin açıl zincir uzunluğu hakkında bilgi vermektedir (Shapaval vd., 2019: 6). Daha yüksek değeri, nispeten daha uzun zincirli lipidlerin varlığına işaret ederken, daha düşük değeri, daha kısa zincirli ve/veya daha fazla dallı olanların varlığı anlamına gelir (Yonar vd., 2022: 166473). Şekil 4.18a'dan görüldüğü üzere kombinasyon gruplarında A₂₉₂₄/A₂₉₆₀ oranı önemli derecede artmıştır. Kızılötesi spektrumun C-H gerilmeler bölgesinde yer alan 2851 cm⁻¹ ve 2923 cm⁻¹'deki bantları, birincil olarak doymuş zincirler olmak üzere lipid açıl ile doğrudan ilişkili olan membran lipidlerinin simetrik CH₂ gerilme durumundan kaynaklanmaktadır (Beljebbar ve Manfait, 2011:138). Sonuçlarımız A₂₈₅₃/A₂₉₂₄₊₂₈₅₃ oranının kombinasyon gruplarında arttığını göstermektedir (Şekil 4.18b). Ayrıca lipid/protein içeriğinin yüksek antimikrobiyal kombinasyon dozlarında arttığı görülmektedir (Şekil 4.18c).

BW₂₉₂₂ / BW₂₉₅₅ oranı ise membran dinamiği hakkında bilgi sağlamaktadır ve bu orandaki azalmalar membran organizasyonunun bozulması ile doğrudan ilişkilidir. Çalıştığımız tüm deney gruplarında bu oranın anlamlı derecede azaldığı görülmektedir (Şekil 4.18d).



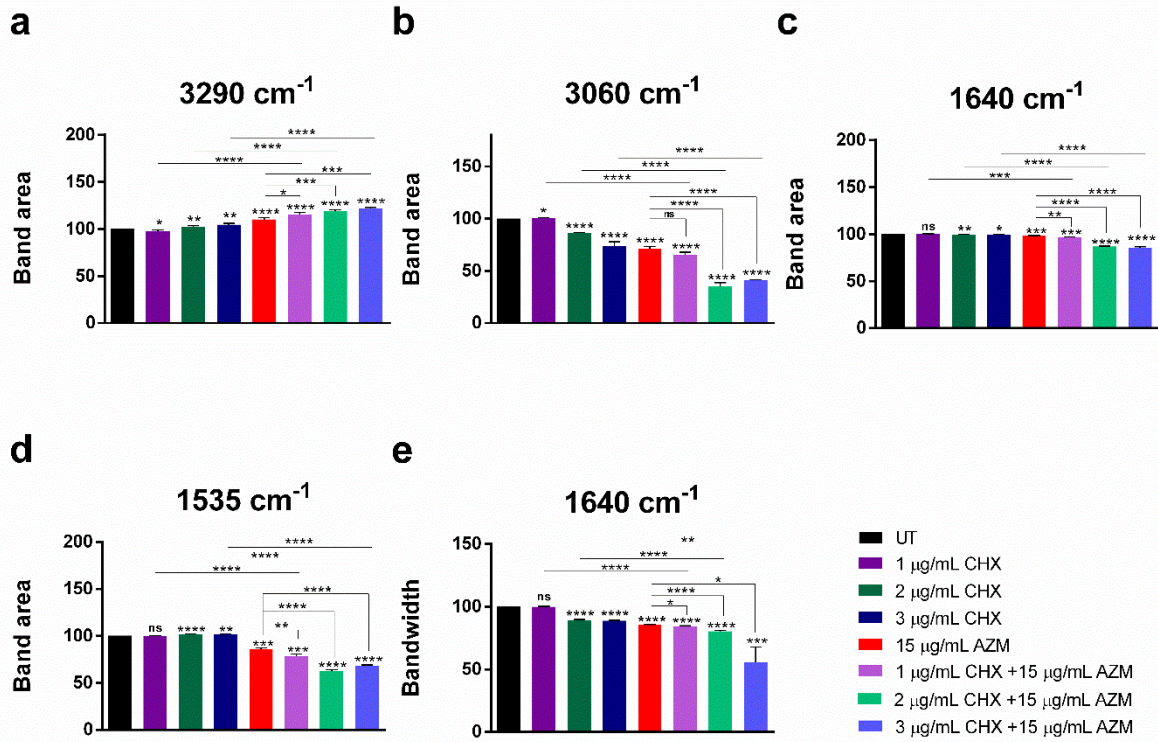
Şekil 4.18. Lipid İçeriği ve Membran Dinamikleri Hakkında Bilgi Veren Bant Oranlarındaki Değişiklikler.

Her grup, UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

4.7.2. Protein ($3300-2800\text{ cm}^{-1}$; $1800-1500\text{ cm}^{-1}$) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler

3300 cm^{-1} ve 3060 cm^{-1} 'deki zirveler, proteinlerde sırasıyla amid A ve amid B'nin N-H gerilmesini gösterir (Şekil 4.15). Ayrıca, protein bölgesi için sorumlu piklerin çoğu, esasen, proteinlerin ve peptitlerin amid I ve amid II'sinin hakim olduğu 1800 cm^{-1} ve 1500 cm^{-1} 'deki pikleri içerir (Şekil 4.16). Amid A yoğunluğunun çalışılan antimikrobiyal dozların tamamında ve daha anlamlı olarak kombinasyon gruplarında arttığı görülmektedir. Proteinlerin amid B, amid I ve amid II gruplarına atanan 3060 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} ve 1535 cm^{-1} spektral bant alanlarının ise özellikle kombinasyon gruplarında azaldığı görülmektedir. 1640 cm^{-1} 'deki

Amide I bant genişliği, protein karbonilasyonunun bir göstergesidir ve kombinasyon gruplarında bu bantın genişliği anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.19).

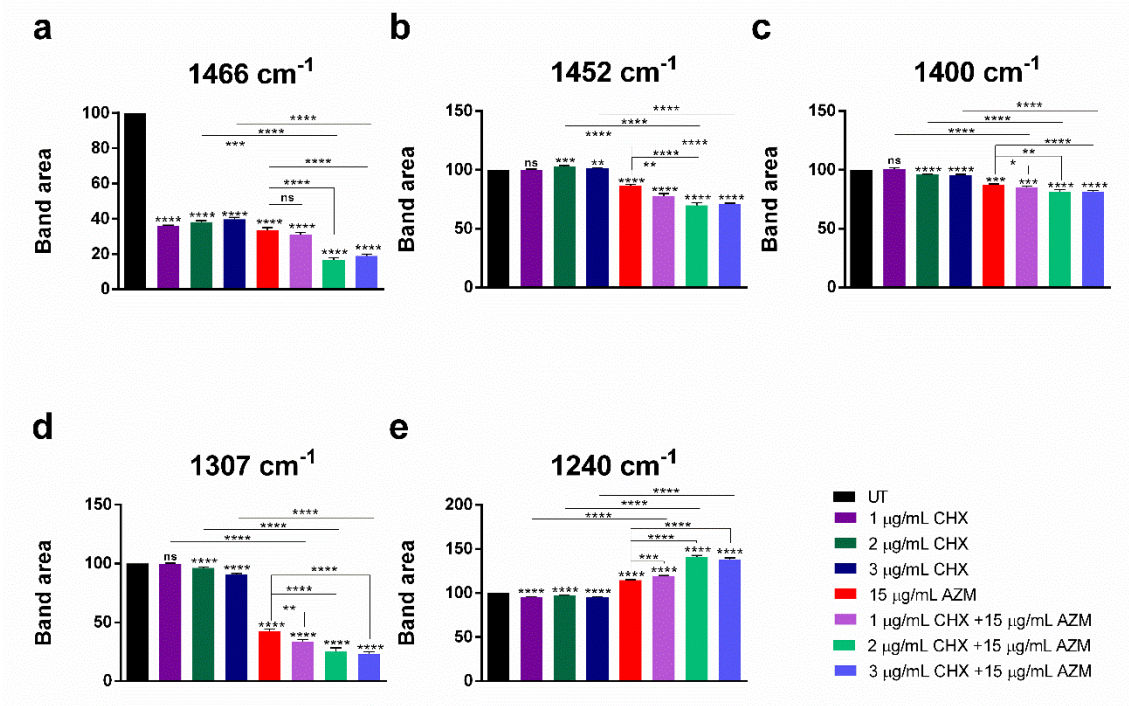


Şekil 4.19. Protein Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.

Her grup, UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

4.7.3. Karmaşık (1500-1200 cm⁻¹) Bölgede Öne Çıkan Değişimler

1500-1200 cm⁻¹ spektral bölge aralığındaki bantlar lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler hakkında bilgi verir (Vodnar ve Scaciu, 2012:66) (Şekil 4.16). Bu bölgede 1466 cm⁻¹, 1452 cm⁻¹, 1400 cm⁻¹, 1307 cm⁻¹ ve 1240 cm⁻¹ dalgaboylarında yer alan bandlar analiz edilmiştir. 1466 cm⁻¹, 1452 cm⁻¹, 1400 cm⁻¹ bantları protein ve lipidlerin CH₂ ve CH₃ gruplarının deformasyonu hakkında bilgi verir. Bu bantların CHX ve AZM kombinasyonu gruplarında anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. 1307 cm⁻¹ bandı proteinlerin amid III yapısına atfedilmiştir ve bu bantın absorbans değeri kombinasyon gruplarında azalmaktadır. 1240 cm⁻¹ nükleik asitlerin PO₂⁻ antisimetrik gerilmelerine atanmıştır ve bu bantın absorbans değeri kombinasyon gruplarında artmaktadır (Şekil 4.20).



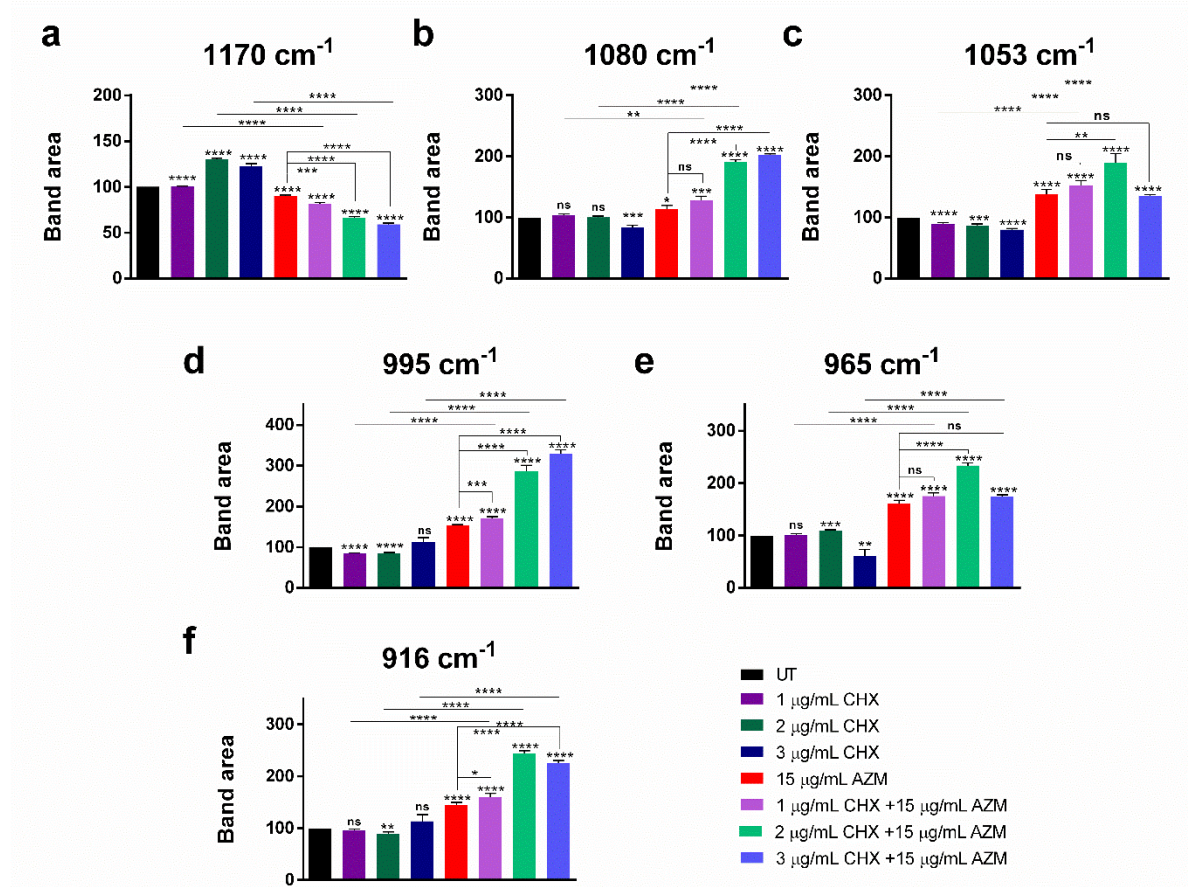
Şekil 4.20. Karmaşık Bölgedeki Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.

Her grup için mutlak yoğunluk, 'e' şekli hariç olmak üzere UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

4.7.4. Karbonhidrat ve Nükleik Asit (1200-900 cm^{-1}) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler

Parmak izi bölgenin 1200-900 cm^{-1} spektral alt bölgesindeki başlıca bantlar karbonhidratlar ve nükleik asitlerle ilişkili fosfat grupları hakkında bilgi verir (Vodnar ve Scaciu, 2012:66) (Şekil 4.16). Bu bölgede 1170 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 1053 cm^{-1} , 995 cm^{-1} ve 965 cm^{-1} dalgaboylarında yer alan bantları analiz edilmiştir. 1170 cm^{-1} bandı, karbonhidratların C-OH antisimetrik gerilmelerine atanmıştır ve bu bantın alan değerleri kombinasyon gruplarında anlamlı bir azalma sergilemektedir (Şekil 4.21a). 1080 cm^{-1} bandı nükleik asitlerin mannoz ve mannoz-6-fosfat gruplarını ile ilişkili olup (Zanyar vd., 2008: 146), absorbans değeri kombinasyon gruplarında önemli derecede artmıştır (Şekil 4.21b). Sakkaritlerin C-C, C-O, C-O-C ve C-O-P grupları ile ilişkili olduğu bildirilen 1053 cm^{-1} bandının (Zanyar vd., 2008: 146) absorbans değeri yalnızca CHX uygulanan gruplarda azalırken, AZM ve CHX+AZM gruplarında artmıştır (Şekil 4.21c). 995 cm^{-1} ve 965 cm^{-1} dalgaboylarında yer alan bu bantlar ise riboz ve deoksiribozların C-O, C-C gruplarına atanmış olup bu bantların absorbans değerleri kombinasyon gruplarında artmaktadır (Şekil 4.21d-e).

Bu bölgede yer alan 916 cm^{-1} bandı ise karbonhidratların C–O, COH, and C–C halka titreşimlerine atfedilmiştir (Zanyar vd., 2008: 146). Bu bandın yoğunluğu UT grubuna kıyasla, kombinasyon gruplarında anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 4.21f).



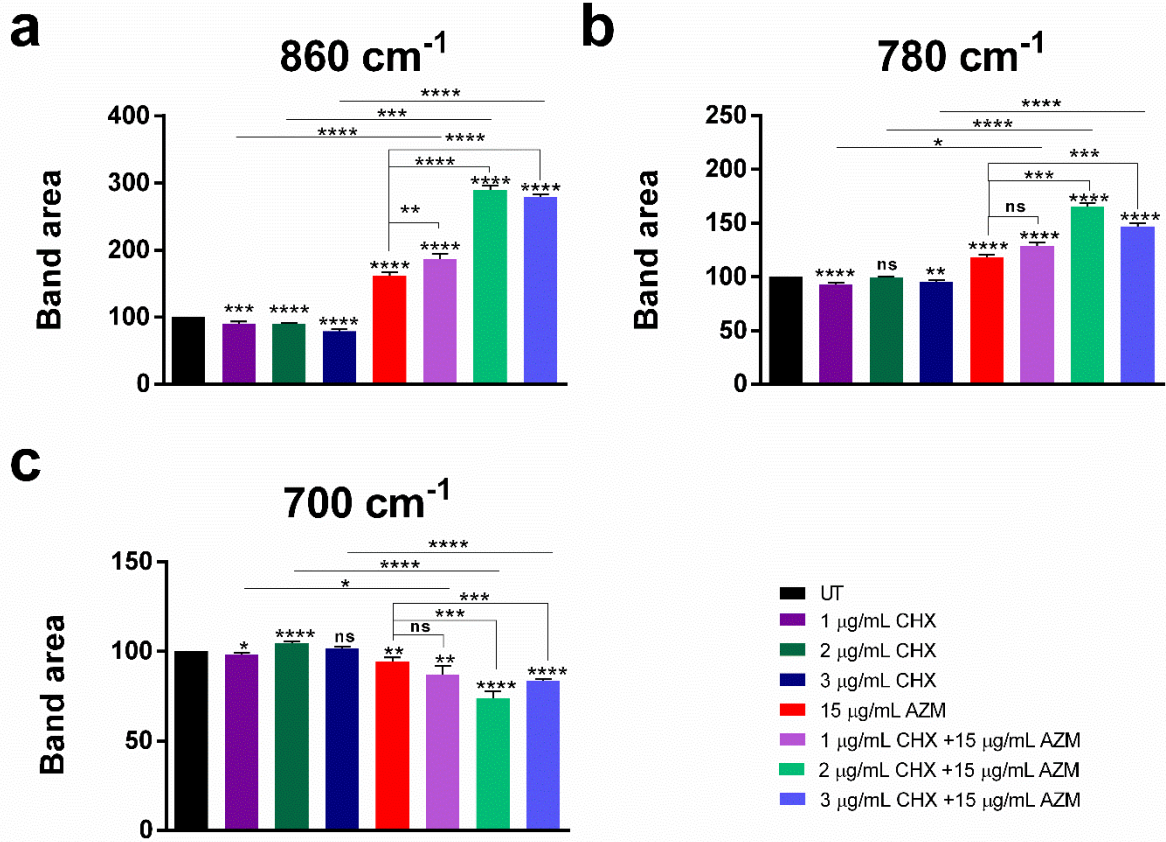
Şekil 4.21. Karbonhidrat ve Nükleik Asit Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.

Her grup, UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

4.7.5. Parmakizi ($900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$) Bölgesinde Öne Çıkan Değişimler

Parmakizi bölgesi olarak adlandırılan bu spektral bölgede 860 cm^{-1} , 780 cm^{-1} , 700 cm^{-1} dalgaboylarında 3 bant analiz edilmiştir (Şekil 4.16). 860 cm^{-1} bandı protein ve lipitlerdeki CH_2 deformasyonu bilgisi sağlar ve bu bant alanının yalnızca CHX uygulanan gruplarda azalırken, AZM ve CHX+AZM gruplarında artmıştır (Şekil 4.22a). Urasil bazlı halka breathing (solunum) germe modu 780 cm^{-1} bant alanı da yalnızca CHX uygulanan gruplarda azalırken, AZM ve CHX+AZM gruplarında artmıştır (Şekil 4.22b). Bu bölgede yer alan 700

cm^{-1} bandı ise düzlem dışı C-H bükülmesi olarak tanımlanmıştır ve kombinasyon gruplarında azalma görülmektedir (Şekil 4.22c).



Şekil 4.22. Parmakizi Bölgesinin Spektral Bant Alanlarındaki ve Bant Genişliklerindeki Değişiklikler.

Her grup, UT grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Karşılaştırma için t-test kullanılmıştır ($p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant).

5. SONUÇ – TARTIŞMA

Gelişen antibiyotik direnci küresel ölçekte bir sorundur. Artan dozlarda antibiyotik kullanımıyla birlikte, antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkması ve yayılması, antibiyotiklerin terapötik potansiyelini tehlikeye sokmaktadır (Sultan vd., 2018: 2066). Bakteriyel patojenler çoğu zaman birden fazla antibiyotiğe karşı çoklu mekanizmalar geliştirmektedir (Tyers ve Wright, 2019: 142). Direnç, yeni ajanların keşfindeki yenilik eksikliği nedeniyle daha da önemli bir sorun haline gelmektedir (Tyers ve Wright, 2019: 142). Direnç gelişimini önlemek için kullanılan terapötik yaklaşımlardan biri antimikrobiyal ajanların kombine uygulamalarıdır (Liu vd., 2020: 200). Kombinasyonlar, antibiyotikler ve antibiyotik olmayan ajanlar veya çoklu antibiyotik kombinasyonlarını içerir (Umemura vd., 2022: 524). Literatürde, antibiyotik – antibiyotik kombinasyon uygulamaları kapsamında birçok farklı antibiyotik ve bakteri ile yapılmış çalışmalar mevcut iken (Pietsch vd., 2021: 615618), antibiyotiklerin antibiyotik olmayan ajanlarla kombine uygulamaları kapsamında antibiyotik – antiseptik kombinasyon yaklaşımlarının araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır (Pietsch vd., 2021: 615618).

Antimikrobiyal ajanların keşfi ve uygulanması ve özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısında antiseptik ve dezenfektan formunda biyositlerin kullanılması, çoğu bulaşıcı hastalığın kontrolünü sağlamıştır. CHX gibi katyonik antibakteriyellerin, çoklu ilaca dirençli suşların ve hastane kaynaklı enfeksiyonların yayılmasını azaltmada yardımcı olduğu gösterilmiştir (Grare vd., 2010: 436). Ayrıca CHX, çok çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı aktif olduğu bilinen bir antiseptiktir (Grare vd., 2010: 436). Antimikrobiyal ajanlar arasındaki sinerji ise, ajanların birleşik etkisinin, bağımsız aktivitelerinin toplamından daha büyük olduğu anlamına gelir (Leekha vd., 2011: 161). Bu tezde, CHX ve AZM muamelerinin tek başına veya kombinasyon halinde *E. coli* üzerindeki etkileri incelenmiş olup elde edilen sonuçlar kombinasyonun, ajanların bireysel etkilerine kıyasla büyüme inhibisyon etkinliklerini arttırdığını, oksidatif strese neden olduğunu, flagellin ifadesini ve bakteriyel hareketliliği azalttığını ve otoagregasyonu teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca kombine uygulama, bakterinin epitel hücrelere tutunma kabiliyetini azaltmış ve epitel hücrelerde flagella ile aktive olan MAPK (Mitojenle aktive olan protein kinaz) ve NF-κB (Nükleer faktör-kappa B) yollarını aşağı regüle etmiştir. FTIR kullanılarak yapılan ayrıntılı biyomoleküler analizler, kombinasyonun bakterilerin zar özelliklerinde değişikliklere yol açtığını ve proteinler ve nükleik asitler gibi hücresel moleküller üzerinde de etkileri olduğunu ortaya koymuştur.

Reaktif oksijen türleri (ROS), kısmen indirgenmiş oksijen türevleridir. Bunlara süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve tekli (singlet) oksijen (1O_2) dahildir. ROS, bakteri metabolizmasının kaçınılmaz bir sonucu olarak hücre içinde üretilebilir veya çevreden türetilir (Borisov vd., 2021: 839). Antibiyotik tedavisine yanıt olarak oluşan ROS, DNA, lipid ve proteinlerde ölümcül hasara neden olabilir ve bu nedenle antibiyotiklerin birincil hedefleri üzerindeki zararlı etkileri ile birlikte hücre ölümüne katkıda bulunabilir (Fang, 2013: 416; Dong vd., 2015: 2181). Bakterilerin antibiyotiklerle muamelesini takiben ROS'un indüklenmesi, kinolonlar (Dwyer vd., 2009: 482), aminoglikozitler (Kolodkin-Gal vd., 2008: e319), kloramfenikol (Albesa vd., 2004: 605), ampisilin (Kohanski vd., 2008: 679), trimetoprim ve rifampisin (Kolodkin-Gal vd., 2008: e319) için raporlanmıştır. Oksidatif stres indüksiyonunun ilk olarak Arriaga-Alba ve çalışma arkadaşları tarafından *Salmonella typhimurium*'da bir antibiyotiğin etki mekanizmasının bir parçası olduğu gösterilmiştir (Arriaga-Alba vd., 2000: 156). Antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'daki birçok oksidatif stres genini yukarı regüle ettiği gösterildi. Antibiyotiklere maruz kalındığında antioksidan enzimlerin indüklenmesi, bakterilerdeki oksidatif stresin antibiyotiğin öldürücülüğüne katkıda bulunduğunu göstermiştir (Yeom vd., 2010: 22689; Dwyer vd., 2015: 313). *Escherichia coli*'de ROS'u (hidroksil radikalleri) antibiyotik ölümcüllüğüne bağlayan potansiyel bir yol, Wang ve Zhao tarafından değerlendirilmiştir. Norfloksasinin, katalaz geni *katG*'den yoksun *E. coli*'de izogenik mutantlarına göre daha öldürücü olduğunu bulmuşlardır (Wang ve Zhao, 2009: 1395). Benzer şekilde, ampisilin ve kanamisin de bir alkil hidroperoksit redüktaz *ahpC* *E. coli* mutantına karşı artan öldürücülük göstermiştir. Genel olarak, bu araştırmalar, *E. coli*'nin antibiyotiklerle tedavisinin bakterideki süperoksit seviyelerini arttırdığını göstermiştir (Wang ve Zhao, 2009: 1395). Bu çalışmalar ile de gösterildiği üzere antibiyotikler ikincil etki olarak ROS üretimini arttırabilir ve bu yol ile antibakteriyel aktivitelere katkı sağlayabilirler. Sonuçlarımızda CHX ve AZM kombinasyonlarının ROS üretimini anlamlı düzeylerde arttırdığı gözlenmektedir. *Acinetobacter baumannii* ile yapılan bir çalışmada araştırmacılar CHX'in antibakteriyel aktivitesinin, artan ROS üretimi ve daha yüksek lipid peroksidasyonundan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır (Biswas vd., 2019: e0224107). Literatür taramalarında daha önce AZM'nin ROS üretimini arttırdığını gösteren çalışmaya denk gelinmemiş olsa da *P. aeruginosa*'daki oksidatif stres tepkisini bozduğu (Nalca vd., 2006: 1680), sağlıklı memeli hücrelerinde mitokondriyal toksisiteye, aşırı ROS üretime ve DNA oksidatif hasarına neden olduğu Jiang vd. tarafından gösterilmiştir (Jiang vd., 2019: 110). Ayrıca Salimi vd. sıçanların kardiyomyosit mitokondrilerinde AZM kaynaklı ROS oluşumuna bağlı olarak, mitokondriyal

membran geçirgenliği ve mitokondriyal şişme ve sitokrom c salınımı bildirmiştir (Salimi vd., 2016: 82). Kohanski vd. (2007), bakterisidal antibiyotiklerin varlığında öldürücü hidroksil radikal üretiminin genel mekanizmasının, trikarboksilik asit döngüsü metabolizmasındaki değişiklikler, demir-kükürt kümelerinin dengesizleşmesi ve demirin yanlış düzenlenmesi nedeniyle NADH'nin geçici olarak tükenmesini içerdiğini göstermiştir (Kohanski vd., 2007: 797). Transkripsiyonu ve/veya translasyonu inhibe eden antibiyotiklerin bakteriyel toksin-antitoksin kromozomal modülü mazEF'i tetiklediği ve ROS tarafından mazEF aracılı hücre ölümüne neden olduğu da gösterilmiştir (Kohanski vd., 2007: 797). Bu süreç, iletişim sinyalleme peptidi EDF'yi (hücre dışı ölüm faktörü) gerektirir (Kolodkin-Gal ve Engelberg-Kulka, 2008: 3169). ROS'un antibiyotik aracılı hücre ölümündeki rolü, ROS savunmasına ait genlerdeki mutasyonların ilaç duyarlılığını arttırdığı gerçeğiyle de desteklenmektedir (Goswami vd., 2006: 949; Tamae vd., 2008: 5981). AZM'nin translasyon üzerindeki etkisi düşünöldüğünde, bakteride ROS indükleyici bir etki göstermesi önerilebilir.

E. coli 'de hareketlilik, çeşitli çevresel ipuçlarını tespit etmede ve konakçı hücrelerde kolonizasyonda önemli bir rol oynar ve bu şekilde potansiyel bir virölans faktörü olarak değerlendirilir (Haiko ve Westerlund-Wikstrom 2013; McWilliams ve Torres 2014; Chaban vd., 2015: 93). *E. coli* hücrelerinin hareketliliği, hücre yüzeyinde rastgele dağıtılan 6-8 kamçı tarafından desteklenir. Flagella aracılı hareketlilik, swimming ve swarming hareketlerini içerir. Burada swimming, bakteri hücrelerinin düşük agarlı bir kültür ortamından (%0,3-0,4 agar) birkaç flagella kullanarak istenen yüzeye yer değiştirmesi olarak tanımlanır (Darnton vd., 2007: 1758; Swiecicki vd., 2013: 1491). Buna karşılık, bakteri translokasyonu için daha zor olan yarı katı-katı ortamlarda (%1.5 agar ve üstü) swarming gözlenir. Swarm, hücrelerin toplu hareketini içerir (Gomez-Gomez vd., 2007: 5). *E. coli* 'de swarm, yüzey aktif madde biyosentezi, çeşitli flagellaların katılımı ve spesifik stator kodlu gen ekspresyonu ile ilişkilidir (Kearns, 2010: 637). Antibiyofilm ve antivirölans aktiviteleri olan bileşiklerin çoğu kombinasyon terapilerinde kullanılmıştır. Bahari vd. yaptıkları çalışmada, kurkumin ve AZM'nin tek başına ve kombinasyon halinde alt MİK'lerinin, *P. aeruginosa* 'da biyofilm oluşumunun yanı sıra sürü ve seğirme (twitching) motilitelerini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (Bahari vd., 2017: 21). Farklı bir çalışmada ise AZM alt-inhibitör konsantrasyonlarına (4-8 µg/ml) maruz kalma, *P. mirabilis* suşlarında motilite kaybına ve *P. aeruginosa* suşlarında motilitede önemli bir azalmaya neden olmuştur (Molinari vd., 1992: 470; Molinari vd., 1993: 681). *Salmonella enterica* üzerinde yapılan bir çalışmada AZM'sinin (10 µg/ml), hem kümelenme hem de yüzme hareketliliklerini sınırlayabildiği gösterilmiştir

(Matsui vd., 2005: 3400). AZM'sinin, biyofilm oluşumunu ve üriner kateterlere yapışmayı engellediği, yüzme hareketliliğini ve virülans faktörlerinin üretimini azalttığı Xu vd. tarafından gösterilmiştir (Xu vd., 2019: 569). Bir alkaloid olan piperinin, siprofloksasin ve AZM antibiyotiklerinin *E. coli* CFT073 biyofilmlerine nüfuzunu ve sonuç olarak bu antibiyotiklerin önceden oluşturulmuş biyofilmleri dağıtma kabiliyetini arttırdığı gözlenmiştir (Dusane vd., 2014: e112093). Ek olarak AZM'nin *P. aeruginosa*'nın swarm motillitesini baskıladığı Tan vd. tarafından gösterilmiştir (Tan vd., 2016: 317). *B. cenocepacia*'da CHX'in adezin kodlayan bir genin down regülasyonu (*adhA*) ve kemotaksi ve motilite ile ilgili proteinleri kodlayan birçok genin up regülasyonu, sesil hücrelerin biyofilmden kaçmaya çalıştığını gösterir (Coenye vd., 2011: 1912). CHX ve AZM kombinasyonlarının sinerjistik etkisi swarm motilite sonuçlarımızda da gözlemlenebilmektedir.

Bakteriyel tutunma, yani bakterilerin diğer hücelere veya cansız yüzeylere bağlanması, bakterilerin hayatta kalmasını ve gelişmesini sağlayan temel bir özelliktir. Bakteriler, bir konakçı içinde hem ekolojik nişlerde hem de *in vivo* olarak büyümenin uygun olduğu mikro ortamlardaki bölgelere bağlanma yeteneğine sahiptir. Bu özellik, bulaşıcılık ve yapışkanlık arasında kurulan önemli paralellikler ile uzun zamandır bilinmektedir (Beachey, 1981: 325). Yüzeye tutunmanın, hastalık semptomlarında ilerleme ile ilişkisi, enterik, solunum ve oral enfeksiyonların çoğu için geçerlidir (Ofek vd., 2003). Bu nedenle, bu alan, bakteriyel bulaşıcı hastalıkları önleme ve tedavi etme girişiminde yeni terapötikler için giderek daha fazla kaynak haline geliyor. Antibiyotik direnci artmaya devam ettikçe, bu giderek daha önemli hale gelecektir. Bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmek için yeni yöntemler arasında, yapışma önleyici terapiler, önemli bir seçici baskı olan bakterilerin ölümüne doğrudan neden olmadıkları için belirli avantajlara sahiptir. Bakteriler için öldürücü olanın altındaki antibiyotik konsantrasyonlarının, adezinlerin ekspresyonunu ve bakteri yüzeyinin özellikleri dahil olmak üzere hücrenin biyokimyasını çeşitli seviyelerde etkileyerek, organizmaların çeşitli düzenleyici mekanizmalarını bozma yeteneğine sahip olduğu iyi bilinmektedir. Minimal altı inhibitör konsantrasyonlu (alt MİK) antibiyotiklerin, hem biyotik hem de abiyotik olmak üzere yüzeye yapışmayı azaltabileceği gösterilmiştir (Mortensen vd., 2011: 27). Bu, patojen tarafından konakçı dokuyla etkileşimin ilk aşamasında kullanılan, bakterilerin yüzey hidrofobiklik karakterindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Siprofloksasinin alt MİK seviyeleri, üropatojenik *E. coli*'de bakteri yüzeyinin hidrofobik doğasında ve ayrıca epitel hücrelerine yapışma yeteneklerinde bir azalmaya neden olmuştur (Wojnicz vd., 2007: 700). MİK altı β -laktamlar piperasilin ve imipenemin de morfoloji,

hareketlilik ve hidrofobiklik üzerindeki etkileri yoluyla *P. aeruginosa*'nın yapışması üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır (Fonseca ve Sousa, 2007: 236). Antibiyotiklerin MİK altı konsantrasyonlarının, insan solunum mukozasının *ex vivo* *H. influenza* ile enfeksiyonu sırasında mukozal yüzeyde meydana gelen hasarı azalttığı da gösterilmiştir, bu etkinin orta kulak iltihabı ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi koşullarla ilgili olması muhtemeldir (Roberts vd., 1993: 201). Bununla birlikte, öldürücü olmayan antibiyotik seviyelerinin, UPEC'in kateterlere bağlanması gibi bazı bakterilerin adezyon seviyelerini artırabileceğine dair raporlar da vardır (Balagué vd., 2003: 401). Farklı antibiyotiklerin alt MİK'lerinin etkisi, bakteriyel tutunmaya bağlı olarak değişir. Rifampin tedavisi, *S. aureus*'un fibronektin bağlanmasını azaltmıştır. Tersine, alt MİK oksasilin ile muamele edilen *S. aureus* önemli ölçüde artan bağlanma göstermiştir (Rasigade vd., 2011: 1). Alt MİK antibiyotiklerin kullanımıyla ilgili başka bir sorun, teorik olarak bakteri direncini teşvik edebilmesidir. Farmakokinetiği nedeniyle antibiyotik tedavisi alan herhangi bir hastada MİK altı antibiyotik ilaç düzeylerinin görülebileceğine dikkat edilmelidir; bu özellikle nispeten zayıf antibiyotik penetrasyonu olan bazı dokularda doğrudur (Cars, 1991: 23). Bu nedenle, antibiyotik tedavisinin seyri boyunca bazı noktalarda, istilacı bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye ve enfeksiyonun temizlenmesine katkıda bulunan bazı anti-adhesin etkileri olabileceğini önermek mantıklıdır; ancak, bu etkinin boyutu bilinmemektedir. Çalışmamızın sonucunda ise CHX ve AZM kombinasyon tedavisinin *E. coli* 8739 hücrelerinin, HCT-116 kolon kanseri hücrelerine adhezyonunu engellediği gösterilmektedir.

Bağırsak kolonizasyonu ve epitelyal adezyon, birçok enteropatojenin patogeneğinde çok önemli erken olaylardır, bu da daha sonra konakçı epitel hücrelerinin bakteriyel istilasına ve yayılmış enfeksiyona olanak sağlayabilir (Xu vd., 2018: 1234). Çoğu enterobakteri, konakçıya tutunmak için Gram negatif bakterilerin dış zar yüzeyinden çıkıntı yapan yapışkan filamentli bir organel olan fimbriaları kullanır (Xu vd., 2018: 1234). *E. coli* hücrelerinin flagellar motilitesi, konak kolonizasyonunda önemli bir rol oynar (Haiko ve Westerlund-Wikstrom, 2013: 1260; Liu vd., 2017: 75). *fliC* ekspresyon seviyesindeki azalmanın flagella sentezini inhibe ettiği ve bunun sonucunda swim ve swarm hareketliliğinin engellenmesine neden olduğu (Hidalgo vd., 2011: 6857), swarm hareketliliğini uyaran koşulların yüksek seviyelerde flagellin üretimi ile sonuçlandığını bilinmektedir (Young vd., 1999: 2830). Makrolid antibiyotiklerin alt MİK konsantrasyonlarının ise flagellin ifadesinde kısmi inhibisyona neden olduğu ve bazı makrolidlerin ise tip IV pili oluşumunu etkileyerek motiliteyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Altenburg vd., 2011: 70). Örneğin, alt MİK 'lerde AZM

gibi bazı makrolid antibiyotiklerin, flagellar ekspresyonunun azalması nedeniyle *P. mirabilis* ve *P. aeruginosa* 'nın motilitesini engelleyebildiği daha önce gösterilmiştir (De Clercq vd., 2002: 2727; Kawamura-Sato vd., 2001: 51). Benzer şekilde Horii vd., mupirosin alt MİK'lerinin *P. mirabilis* ve *P. Aeruginosa* 'da flagellin ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir (Horii vd., 2003: 1175). Bu tez çalışmasında motiliteyle ilgili olarak, CHX ve AZM muamelerinin FliC ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmış olup sonuçlar, CHX'in flagellin ifadesindeki AZM aracılı kısmi azalmayı arttırdığını ortaya koymuştur. Bu veri, motilite sonuçları ile de uyumludur. Ayrıca, tek başına kullanıldığında 3 µg/mL CHX'in FliC ifadesinde bir artışa neden olduğu görülmektedir. Bu artış, bakterinin bir antimikrobiyal konsantrasyon gradyanından uzaklaşmak için başvurduğu bir mekanizmanın parçası olabilir (Emerson vd., 2008: 761).

Çeşitli bakteriyel yüzey yapıları, konakçı örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler), örneğin Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) tarafından tanınan moleküller olan mikropla ilişkili moleküler modeller (MAMP'ler) olarak işlev görür. PRR algılaması, doğuştan gelenin aktivasyonuna ve adaptif bağışıklık sisteminin modülasyonuna yol açar. Bu MAMP'lerden biri, bakteri kamçısını oluşturan kurucu protein olan flagellindir (Steimle vd., 2019; e3000334). Aslında bakteriyel flagellinler, solunum epitel hücrelerinin apikal zarında ve bağırsak epitel hücrelerinin bazolateral kutbunda eksprese edilen TLR5 tarafından spesifik olarak tanınır. Bağdaştırıcı protein MyD88 aracılığıyla bu etkileşim, mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'ler) ve nükleer faktör-kappa B'yi (NF-κB) içeren bağışıklık yanıtı sinyal yollarını aktive eder (Batah vd., 2016; 117). NF-κB transkripsiyon faktörleri ailesi, TNF-α ve IL-6 ekspresyonunu kontrol eden immün ve inflamatuvar yanıtların merkezi düzenleyicileridir ve memelilerde beş üye içerir: RELA (p65 olarak da bilinir), c-REL, RELB, NF-κB1 (p105 olarak da bilinir) ve NF-κB2 (p100 olarak da bilinir). p65, güçlü bir transkripsiyonel aktivasyon alanı içerir ve çoğu NF-κB transkripsiyonel aktiviteden sorumludur (Bao vd., 2015; e0125910). Yapılan bir çalışmada flagella veya flagellinin TLR5 ile etkileşime girdiği, NF-κB yolunun, *C. difficile* flagellin tarafından aktive edilen ve proinflamatuvar gen ekspresyonunun ve proinflamatuvar mediatör sentezinin yukarı regülasyonuna yol açan baskın TLR5 ile ilişkili yol olduğu gösterilmiştir (Batah vd., 2016; 117). Kommensal *E. coli* suşu MG1655 tarafından NF-κB'nin aktivasyonu ve interlökin-8 (IL-8) ve CCL-20'nin indüksiyonu, ilk olarak insan bağırsak epitel hücresi (IEC'ler) hatları HT29-19A ve Caco-2'de *in vitro* olarak incelenen bir çalışmada flagellinin, TLR5 ile etkileşimi ve ardından adaptör protein MyD88'in alınması yoluyla bu proinflamatuvar yolu

tetiklediği gösterilmiştir (Bambou vd., 2004; 42984). Rolli ve arkadaşlarının rekombinant *Salmonella* flagellini ile enjekte edilen fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmada, TLR5'in farelerin tüm organlarda yapısal olarak ifade edildiği gösterilmiştir (Rolli vd., 2010: 1). Bu organlarda flagellin, güçlü bir NFκB ve MAPK aktivasyonu ortaya çıkararak ve organlar arası varyasyonlarla değerlendirilen farklı sitokinlerin önemli üretimini indüklemiştir (Rolli vd., 2010: 1). Flagellin ayrıca bağırsakta belirgin bir kaspaz-3 ve PARP aktivasyonunu tetiklemiştir ve bu organda apoptozu teşvik etme yeteneği gösterilmiştir. Bakteriyel flagellin, farelerde prototipik doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini ortaya çıkararak akciğer, ince bağırsak, karaciğer ve böbrekte çok sayıda proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar ve ayrıca bağırsakta apoptotik sinyali aktive eder (Rolli vd., 2010: 1). Bu nedenle, bu bakteriyel protein, kamçılı mikroorganizmalara bağlı olarak sepsiste sistemik enflamasyon ve bağırsak bariyeri yetmezliğinin kritik bir aracısını temsil edebilir (Rolli vd., 2010: 1). Çalışmamızın sonuçlarına göre CHX ve AZM kombinasyonu p65 ve ERK aktivasyonunu baskılamıştır. Bu açıdan inflamasyon üzerine etkileri de ileriki çalışmalarda araştırılmalıdır.

Pek çok doğal çevre koşulunda bakterilerin, yüzeye bağlı biyofilmler veya serbest yüzen agregatlar gibi çok hücreli yapılar oluşturmayı tercih ettikleri iyi bilinmektedir. Bu yapılar içinde hücreler, ultraviyole ışığına, asitlere, deterjanlara veya antimikrobiyal ajanlara maruz kalma gibi çeşitli stres faktörlerinden korunur (Laganenka vd., 2016: 2). Birçok bakteri, biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerinde yoğun, tek veya çok mikrobiyal agregatların oluşmasına ve bunlara tutunmasına izin vermek için ayrıntılı mekanizmalar geliştirmiştir (Costerton vd., 1987: 440; An ve Friedman, 1998: 339; Schluter vd., 2015: 142). Tek tür kümelerinin oluşumuna otoagregasyon adı verilir. *E. coli* (Girón vd., 1991: 710; Czczulin vd., 1997: 4136; Prigent-Combaret vd., 2000: 455; Schembri vd., 2001: 1422; Sherlock vd., 2005: 1955; Girard vd., 2010: 10617; Nakao vd., 2012: e51241), *Salmonella spp.* (Collinson vd., 1993: 13), *Klebsiella pneumoniae* (Favre-Bonte vd., 1995: 1318), *Edwardsiella tarda* (Gao vd., 2015: 6078), *Citrobacter freundii* (Bai vd., 2012: e33054), *Yersina pestis* (Vadyvaloo vd., 2015: 1198) ve *Proteus mirabilis* (Rocha vd., 2007: 319; Alamuri vd., 2010: 4882) dahil olmak üzere *Enterobacteriaceae* familyasında otoagregasyon yaygındır ve sıklıkla self-recognizing hücre yüzeyi uzantıları yoluyla oluşur. *E. coli* 'de otoagregasyon, mikroskobik hücre kümelerinin ortaya çıkması olarak gözlenir ve bu da statik sıvı kültürlerde hücrelerin makroskopik topaklaşmasına ve yerleşmesine yol açabilir (Laganenka vd., 2016: 2). *E. coli* 'deki otoagregasyonun ana belirleyicisi, ototransporter ailesine ait olan dış zar proteini antijen 43'tür (Ag43) (Laganenka vd., 2016: 2). CHX'in bakterilerin motilite ve

otoagregasyon yetenekleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı olsa da *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada CHX muamelesinin agregasyonu arttırdığı gözlenmiştir (Singkham-In vd., 2022: 8308). Literatürde AZM'nin otoagregasyon üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışma ise bulunmamaktadır. Sonuçlarımız CHX ve AZM'nin otoagregasyon üzerinde sinerjistik bir etki gösterdiğini önermekte olup bu durum, artmış çevresel stresle ilişkilendirilebilir. Ek oldukça yeni bir çalışmada artan otoagregasyon, motilitede azalma ile birlikte anılmakta olup bu sonuçlar bulgularımızı destekler niteliktedir (He vd., 2022: 2237). Otoagregasyonun ve motilitenin bakteri kolonizasyonu, hayatta kalma ve yayılmada farklı roller oynadığı görülmektedir. Ag43 ve flagella arasında meydana gelen dinamiklerinin araştırıldığı bir çalışmada Ag43 aşırı ekspresyonunun, hareketliliği engelleyen baskın bir toplanma fenotipine neden olduğu gösterilmiştir (Ulett vd., 2006: 2101). Sonuçlarına göre, Ag43'ü aşırı eksprese eden *E. coli*'nin doğal olarak oluşan faz varyantları, hareketlilikte ciddi bir azalma gösterir, bu da bu zıt fenotipler arasındaki bir dengenin bakteriyel hareketin kontrolüne katkıda bulunabileceğini düşündürür. Düşük flagella ekspresyonu koşullarında, Ag43'ün aracılık ettiği agregasyonu engelleyemezken, hareketli olmayan flagellanın uyarılmasının Ag43 aracılı kümelenmeyi önleyebildiğini göstermektedir. Araştırmacılar, bakterilerin bu iki önemli fenotipin ekspresyonu arasında, hayatta kalma ve virülans yeteneklerinin tam repertuarından yararlanmak için geçiş yaptığı bir mekanizmayı temsil ettiği sonucuna varmışlardır (Ulett vd., 2006: 2101). Bu sonuçlar ile bağlantılı olarak, 2 µg/mL CHX + 15 µg/mL AZM kombinasyonunda FliC ekspresyonunun diğer kombinasyon dozlarına kıyasla daha fazla azaldığı görülmektedir, otoagregasyon görüntülerinde ise en yoğun agregasyonun 2 µg/mL CHX + 15 µg/mL AZM kombinasyonunda olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, FTIR spektroskopi kullanılarak CHX ve AZM ile tedavi edilen *E. coli* 8739 hücrelerinde biyomoleküler modülasyonlar da araştırılmıştır. Gram negatif bakteriler, dış zar adı verilen ek bir zar sergiler (Lasch ve Naumann, 2015: 6). Dış membran, hücreleri safra tuzlarına, enzimleri sindirerek bozunmaya karşı koruyan ve hücrelerin hidrofobik ilaçların ve antibiyotiklerin bu özel tabakadan yayılmasını engelleyen başlıca geçirgenlik bariyeridir (Lasch ve Naumann, 2015: 6). Amfifilik polisakkarit (LPS), Gram-negatif bakterilerin dış zarının önemli bir bileşenidir; lipid A, çekirdek bölge ve O-antijeninden oluşur ve genel olarak korunur (Gunawan vd., 2020: 5558). Dış zarlipopolisakkaritleri (LPS'ler), çeşitli gözenek oluşturucu proteinleri ve porinleri içerir (Lasch ve Naumann, 2015: 6). LPS, tam moleküler yapıları farklı bakteri türleri arasında farklılık gösterse de, O-spesifik yan zincir (O-antijenikten sorumlu bir hetero-oligosakkarit), iç ve dış çekirdek bölgeleri ve

lipid A adı verilen bir lipid çapadan oluşur (Lasch ve Naumann, 2015: 6; Gunawan vd., 2020: 5558). Birkaç bakteriyel membran amfifilinin zincirleri (örneğin, fosfolipidler) ve yan zincir titreşimleri, CH₃, CH₂ ve CH fonksiyonel gruplarının -CH gerilme titreşimleri nedeniyle gözlenen 3100-2800 cm⁻¹ civarındaki bölgedeki tepe noktaları ile karakterize edilebilir. (Lasch ve Naumann 2000: 110;). CH₂ titreşiminin azalan yoğunluk oranının membran akışkanlığının değişimini gösterdiğini bildirilmiştir (Fang vd., 2007: 2636). -CH titreşiminin modifikasyonu, bakteri lizisi olarak yorumlanır.

Klorheksidin *A. baumannii* suşları üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmanın FTIR sonuçlarında, fosfolipidlerin fosfatlarının gerilme modları, fosfolipidlerin CH₂ omurgasının bükülmesi, fosfolipidler ve lipid esterlerinin deformasyonunu gösteren IR spektrumlarında önemli kaymalar gözlenmiştir ve araştırmacılar CHX'in etki mekanizmalarından birinin fosfolipidlerin ve membran lipid esterlerinin hasarı üzerinden sağlandığını vurgulamışlardır (Biswas vd., 2019: e0224107). *C. albicans* ile yapılan bir çalışmada ise, alt-inhibitör klorheksidin konsantrasyonunun, palmitik ve stearik asitte bir artışa ve palmitoleik ve oleik asitte bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Abu-Elteen ve Whittaker, 1997: 69).

AZM'nin Gram-negatif bakterilerin OM'si ile etkileşimi, kromofor, 1-N-fenil-naftilamin (NPN) 'nin kullanıldığı, zaman çözümlü floresan bazlı bir deney kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Loh vd., 1984: 546). Hidrofilikten hidrofobik bir ortama geçiş, NPN'nin floresan yoğunluğunu dört kat artırır. AZM'nin Gram-negatif bakteriler ve NPN içeren solüsyonlara eklendiği deneyler, floresan yoğunluğunda, lipozom bazlı veya LPS'den zarar görmüş sistemlerde tekrarlanamayan ani bir artış göstermiştir (Farmer vd., 1992: 27; Imamura vd., 2005: 1377). Bu, AZM ile bakteriyel LPS arasında, NPN'nin OM'nin hidrofobik iç kısmına verimli bir şekilde taşınmasına izin veren hızlı bir etkileşime işaret etmektedir. Ortaya çıkan yorum, AZM'ye maruz kalmanın, OM'nin dış zarının geçirgenliğinde ani bir artış sağlamasıdır (Sharifian Gh vd., 2018: 569). AZM ile yapılan membran çalışmaları AZM'nin anyonik fosfolipidlere elektrostatik olarak bağlandığını göstermektedir. Bu durum, fosfolipid baş kısmının hareketliliğini azaltır, ancak hidrofobik asil zincirlerinin akışkanlığını artırır (Sharifian Gh vd., 2018: 569). Benzer şekilde, atomik kuvvet mikroskobu kullanan tamamlayıcı çalışmalar, zarın fosfolipid organizasyonunda AZM kaynaklı varyasyonları ortaya çıkarmıştır. AZM'nin kendisini fosfolipid baş grupları ve lipid açıl zincirleri arasındaki arayüzde çift tabakaya yerleştirdiği ve böylece fosfolipid organizasyonunu bozduğu öne sürülmüştür (Fa vd., 2007: 1830; Sharifian Gh vd., 2018: 569).

1800-1500 cm^{-1} spektral bölgesindeki amid I ve amid II bandlarına ait titreşimler protein ikincil yapılarındaki olası değişimler hakkında bilgi verir (Haris ve Severcan, 1999: 210). Amid I bandı, C=O grubunun gerilmesinden kaynaklanır (Parker, 1971: 165). Amid II bandı, birincil amidlerdeki NH_2 deformasyonundan ve ikincil amidlerde N-H bükülmesi ve C-N gerilmesinin karışık titreşiminden gelir (Parker, 1971: 165). Özellikle kombinasyon gruplarının amid band alanlarındaki önemli düşüş, protein konsantrasyonlarında bir azalmayı göstermiş bulunmaktadır.

Kızılötesi spektroskopi ayrıca hücre duvarı peptidoglikan hakkında bilgi sağlayabilir (Kardas vd., 2014: 17). C-C-O, O-C-O ve C-O-C titreşimleriyle birleştirilmiş düzlem dışı titreşim yüzeyinin deformasyonel C-CH 'sinden kaynaklanan bantların ortaya çıktığı 1200-900 cm^{-1} arasındaki spektral bölge, polisakkaritlerin ve türevlerinin yapısal analizi için özellikle önemlidir, çünkü glikozit bağının tipi ve monosakkarit (glukopiranoz) birimlerinin konformasyonu hakkında bilgi verir (Ye vd., 2019: 373). Hücre duvarındaki değişiklikler açısından kombinasyon grubunda polisakkaritlerin C-O-C ve P-O-C simetrik gerilmesi kontrol grubu değerlerinden daha düşüktür, bu da hücre duvarı polisakkaritlerinin miktarındaki bir azalmanın göstergesidir. Bakterilerin çevrelerine daha iyi uyum sağlamak için hücre duvarlarının çapraz bağlanma derecesini, glikan iplik kuvvetlerini ve peptidoglikan yüzey yoğunluğunu değiştirdiği bilinmektedir, ancak bu adaptasyonların spesifik avantajları net değildir (Kardas vd., 2014: 17).

Özetle, CHX ve AZM'nin eşzamanlı kullanımı, ajanların anti-bakteriyel etkilerini arttırmıştır. CHX'in geleneksel antibiyotiklerle kombinasyonu, antibiyotik direnciyle mücadelede yeni bir strateji olabilir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., ... & Guyard, C.** (2014). The Legionella pneumophila collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Applied and environmental microbiology*, 80(4), 1441-1454.
- Abu-Elteen, K. H., & Whittaker, P. A.** (1997). Effect of sub-inhibitory concentration of chlorhexidine on lipid and sterol composition of shape Candida albicans. *Mycopathologia*, 140(2), 69-76.
- Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., ... & Jhugroo, P.** (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
- Aizawa, S. I.** (2015). Flagella. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 125-146). Academic Press.
- Alamuri, P., Löwer, M., Hiss, J. A., Himpl, S. D., Schneider, G., & Mobley, H. L.** (2010). Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen Proteus mirabilis. *Infection and immunity*, 78(11), 4882-4894.
- Albesa, I., Becerra, M. C., Battán, P. C., & Páez, P. L.** (2004). Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(2), 605-609.
- Allison, C., Emody, L., Coleman, N., & Hughes, C.** (1994). The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of Proteus mirabilis. *Journal of Infectious Diseases*, 169(5), 1155-1158.
- Almaaytah, A., Alnaamneh, A., Abualhajaa, A., Alshari, N., & Al-Balas, Q.** (2016). In vitro synergistic activities of the hybrid antimicrobial peptide MelitAP-27 in combination with conventional antibiotics against planktonic and biofilm forming bacteria. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22(4), 497-504.
- Altenburg, J., De Graaff, C. S., Van Der Werf, T. S., & Boersma, W. G.** (2011). Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics—part 1: biological mechanisms. *Respiration*, 81(1), 67-74.

- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., Logan, S. M., & Aderem, A.** (2005). Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9247-9252.
- Andersson, D. I., & Hughes, D.** (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465-478.
- Ardahanlı, İ., Özkan, H. İ., Özel, F., Gurbanov, R., Teker, H. T., & Ceylani, T.** (2022). Infrared spectrochemical findings on intermittent fasting-associated gross molecular modifications in rat myocardium. *Biophysical Chemistry*, 289, 106873.
- Arriaga-Alba, M.; Rivera-Sánchez, R.; Parra-Cervantes, G.; Barro-Moreno, F.; Flores-Paz, R.; García-Jeménez, E.** Antimutagenesis of beta-carotene to mutations induced by quinolone on *Salmonella typhimurium*. *Arch. Med. Res.* 2000, 31, 156–161.
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B.** (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683.
- Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., & Haghi, F.** (2017). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 21-28.
- Bai, L., Xia, S., Lan, R., Liu, L., Ye, C., Wang, Y., ... & Xu, J.** (2012). Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. *PLoS One*, 7(3), e33054.
- Balagopal, S., & Arjunker, R.** (2013). Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical sciences and Research*, 5(12), 270.
- Balagué, C., Fernández, L., Pérez, J., & Grau, R.** (2003). Effect of ciprofloxacin on adhesive properties of non-P mannose-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 401-404.
- Ball, P. R., Shales, S. W., & Chopra, I.** (1980). Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochemical and biophysical research communications*, 93(1), 74-81.
- Bambou, J. C., Giraud, A., Menard, S., Begue, B., Rakotobe, S., Heyman, M., ... & Gaboriau-Routhiau, V.** (2004). In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *Journal of biological chemistry*, 279(41), 42984-42992.

- Bao, W., Wang, Y., Fu, Y., Jia, X., Li, J., Vangan, N., ... & Wang, Z.** (2015). mTORC1 regulates flagellin-induced inflammatory response in macrophages. *PLoS One*, 10(5), e0125910.
- Bastos-Arrieta, J., Revilla-Guarinos, A., Uspal, W. E., & Simmchen, J.** (2018). Bacterial biohybrid microswimmers. *Frontiers in Robotics and AI*, 97
- Batah, J., Denève-Larrazet, C., Jolivot, P. A., Kuehne, S., Collignon, A., Marvaud, J. C., & Kansau, I.** (2016). Clostridium difficile flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe*, 38, 116-124.
- Bhattacharyya, S., Walker, D. M., & Harshey, R. M.** (2020). Dead cells release a ‘necrosignal’ that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms. *Nature communications*, 11(1), 1-12.
- Beachey, E. H.** (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases*, 143(3), 325-345.
- Beljebbar, A., & Manfait, M.** (2011). Fourier transform infrared microspectroscopy for cancer diagnostic of C6 glioma on animal model. *Fourier transforms-new analytical approaches and FTIR strategies*, 131-146.
- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J. M., & Henry, N.** (2008). A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS biology*, 6(7), e167.
- Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., Murray, W. J., Tobe, T., Fernandez, R., & Schoolnik, G. K.** (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli. *Science*, 280(5372), 2114-2118.
- Biswas, D., Tiwari, M., & Tiwari, V.** (2019). Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *PLoS one*, 14(10), e0224107.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J.** (1988). Experimental Campylobacter jejuni infection in humans. *Journal of infectious diseases*, 157(3), 472-479.
- Bock, L. J., Wand, M. E., & Sutton, J. M.** (2016). Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against Klebsiella pneumoniae clinical isolates and adapted strains. *Journal of Hospital Infection*, 93(1), 42-48.

- Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., & Forte, E.** (2021). ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria. *Antioxidants*, *10*(6), 839.
- Brochado, A. R., Telzerow, A., Bobonis, J., Banzhaf, M., Mateus, A., Selkrig, J., ... & Typas, A.** (2018). Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*, *559*(7713), 259-263.
- Butler, M. S., & Paterson, D. L.** (2020). Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. *The Journal of antibiotics*, *73*(6), 329-364.
- Butler, M. T., Wang, Q., & Harshey, R. M.** (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(8), 3776-3781.
- Buzoianu, A. D., & Socaciu, C.** (2014). Untargeted metabolomics for sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* ssp. *carpatica*) berries and leaves: Fourier transform infrared spectroscopy as a rapid approach for evaluation and discrimination. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *42*(2), 545-550.
- Caceres, S. M., Malcolm, K. C., Taylor-Cousar, J. L., Nichols, D. P., Saavedra, M. T., Bratton, D. L., ... & Nick, J. A.** (2014). Enhanced in vitro formation and antibiotic resistance of nonattached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates through incorporation of neutrophil products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(11), 6851-6860.
- Caldwell, M. B., Guerry, P., Lee, E. C., Burans, J. P., & Walker, R. I.** (1985). Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, *50*(3), 941-943.
- Cambiaso-Daniel, J., Boukovalas, S., Bitz, G. H., Branski, L. K., Herndon, D. N., & Culnan, D. M.** (2018). Topical antimicrobials in burn care: part I—topical antiseptics. *Annals of plastic surgery*.
- Cars, O. T. T. O.** (1991). Pharmacokinetics of antibiotics in tissues and tissue fluids: a review. *Scand J Infect Dis*, *74*(suppl), 23-33.
- Ceylani, T., Teker, H. T., Samgane, G., & Gurbanov, R.** (2022). Intermittent fasting-induced biomolecular modifications in rat tissues detected by ATR-FTIR spectroscopy and machine learning algorithms. *Analytical Biochemistry*, 114825.
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M.** (2015, October). The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 46, pp. 91-103). Academic Press.

- Chen, Y. H., Lu, P. L., Tsai, J. J., Chen, T. P., & Peng, C. F.** (2004). In vitro activities of antibiotic combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 20(6), 261-267.
- Cheung, H. Y., Wong, M. M. K., Cheung, S. H., Liang, L. Y., Lam, Y. W., & Chiu, S. K.** (2012). Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(5), e36659.
- Collinson, S. K., Doig, P. C., Doran, J. L., Clouthier, S., Trust, T. J., & Kay, W. W.** (1993). Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *Journal of bacteriology*, 175(1), 12-18.
- Coenye, T., Van Acker, H., Peeters, E., Sass, A., Buroni, S., Riccardi, G., & Mahenthiralingam, E.** (2011). Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), 1912-1919.
- Corno, G., Coci, M., Giardina, M., Plechuk, S., Campanile, F., & Stefani, S.** (2014). Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities. *Frontiers in microbiology*, 5, 297.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J.** (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
- Czeczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., ... & Nataro, J. P.** (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 65(10), 4135-4145.
- Darnton, N. C., Turner, L., Rojevsky, S., & Berg, H. C.** (2007). On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(5), 1756-1764.
- Darshan, N., & Manonmani, H. K.** (2016). Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *Amb Express*, 6(1), 1-12.
- Davies, G. E., Francis, J., Martin, A. R., Rose, F. L., & Swain, G.** (1954). 1: 6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("hibitane"). Laboratory investigation of a new

- antibacterial agent of high potency. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 9(2), 192.
- De Clercq, E., Eckstein, F., Sternbach, H., & Merigan, T. C.** (2002). Antimicrob. Agents Chemother. *B* (9), 2727.
- De Jongh, K. S., Rotman, E. I., & Murphy, B. J.** (1993). The identification of phosphorylation sites in large membrane proteins following their isolation by SDS-PAGE. In *Techniques in Protein Chemistry IV* (pp. 179-186). Academic Press.
- Denyer, S. P., & Stewart, G. S. A. B.** (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation*, 41(3-4), 261-268.
- Derbie, A., Mekonnen, D., Woldeamanuel, Y., & Abebe, T.** (2020). Azithromycin resistant gonococci: a literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-7.
- Dockrell, H. M., Goering, R. V., Roitt, I., Wakelin, D., & Zuckerman, M.** (2004). Attacking the enemy: Antimicrobial agents and chemotherapy. *Medical Microbiology. Netherlands: Elsevier Mosby*, 473-507.
- Dong, T. G., Dong, S., Catalano, C., Moore, R., Liang, X., & Mekalanos, J. J.** (2015). Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2181-2186.
- Dowling, A., O'Dwyer, J., & Adley, C.** (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*, 1, 536-545.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G.** (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of basic microbiology*, 53(1), 1-8.
- Dubey, K. K., & Sharma, M.** (2020). Reprogramming of antibiotics to combat antimicrobial resistance. *Archiv der Pharmazie*, 353(11), 2000168.
- Dunne Jr, W. M.** (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.
- Dusane, D. H., Hosseinidoust, Z., Asadishad, B., & Tufenkji, N.** (2014). Alkaloids modulate motility, biofilm formation and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(11), e112093.

- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., & Collins, J. J.** (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current opinion in microbiology*, *12*(5), 482-489.
- Dwyer, D.J.; Collins, J.J.; Walker, G.C.** (2015). Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015, *55*, 313–332.
- Echols, K., Graves, M., LeBlanc, K. G., Marzolf, S., & Yount, A.** (2015). Role of antiseptics in the prevention of surgical site infections. *Dermatologic Surgery*, *41*(6), 667-676.
- Eckburg, P. B., Lister, T., Walpole, S., Keutzer, T., Utley, L., Tomayko, J., ... & Coleman, S.** (2019). Safety, tolerability, pharmacokinetics, and drug interaction potential of SPR741, an intravenous potentiator, after single and multiple ascending doses and when combined with β -lactam antibiotics in healthy subjects. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(9), e00892-19.
- Emerson, J. E., Stabler, R. A., Wren, B. W., & Fairweather, N. F.** (2008). Microarray analysis of the transcriptional responses of *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress. *Journal of medical microbiology*, *57*(6), 757-764.
- Erhardt, M.** (2016). Strategies to block bacterial pathogenesis by interference with motility and chemotaxis. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 185-205.
- Etebu, E., & Arikekpar, I.** (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, *4*(2016), 90-101.
- Fa, N., Lins, L., Courtoy, P. J., Dufrêne, Y., Van Der Smissen, P., Brasseur, R., ... & Mingeot-Leclercq, M. P.** (2007). Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1768*(7), 1830-1838.
- Faghihzadeh, F.** (2018). *Kinetic, Metabolic and Macromolecular Response of Bacteria to Antimicrobial Agents*. University of Rhode Island.
- Fang, F. C.** (2013). Antibiotic and ROS linkage questioned. *Nature biotechnology*, *31*(5), 415-416.
- Fang, J., Lyon, D. Y., Wiesner, M. R., Dong, J., & Alvarez, P. J.** (2007). Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environmental science & technology*, *41*(7), 2636-2642.

- Farmer, S., Li, Z., & Hancock, R. E.** (1992). Influence of outer membrane mutations on susceptibility of *Escherichia coli* to the dibasic macrolide azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(1), 27-33.
- Favre-Bonte, S., Darfeuille-Michaud, A., & Forestier, C.** (1995). Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infection and immunity*, 63(4), 1318-1328.
- Fenchel, T.** (2002). Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science*, 296(5570), 1068-1071.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B., & Hancock, R. E.** (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1-21.
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M., & Klemm, P.** (2007). Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infection and immunity*, 75(1), 30-34.
- Firth, A., & Prathapan, P.** (2020). Azithromycin: the first broad-spectrum therapeutic. *European journal of medicinal chemistry*, 207, 112739.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S.** (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Fonseca, A. P., & Sousa, J. C.** (2007). Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *International journal of antimicrobial agents*, 30(3), 236-241.
- Fox, L. J., Kelly, P. P., Humphreys, G. J., Waigh, T. A., Lu, J. R., & McBain, A. J.** (2022). Assessing the risk of resistance to cationic biocides incorporating realism-based and biophysical approaches. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(1), kuab074.
- Friedlander, R. S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M., Kolter, R., & Aizenberg, J.** (2013). Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5624-5629.
- Fung, M.F.K., Senterman, M.K., Mikhael, N.Z., Lacelle, S., and Wong, P.T.T.** (1996) Pressure-tuning fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. *Biospectroscopy*, 2: 155–165.

- Galdiero, F., Carratelli, C. R., Nuzzo, I., Bentivoglio, C., & Galdiero, M.** (1988). Phagocytosis of bacterial aggregates by granulocytes. *European journal of epidemiology*, 4(4), 456-460.
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., ... & Opavski, N.** (2022). Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*, 11(4), 427.
- Gao, Z. P., Nie, P., Lu, J. F., Liu, L. Y., Xiao, T. Y., Liu, W., ... & Xie, H. X.** (2015). Type III secretion system translocon component EseB forms filaments on and mediates autoaggregation of and biofilm formation by *Edwardsiella tarda*. *Applied and environmental microbiology*, 81(17), 6078-6087.
- Gardel, C. L., & Mekalanos, J. J.** (1996). Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infection and immunity*, 64(6), 2246-2255.
- Garip, S., Bozoglu, F., & Severcan, F.** (2007). Differentiation of mesophilic and thermophilic bacteria with Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 61(2), 186-192.
- Garip, S., Gozen, A. C., & Severcan, F.** (2009). Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chemistry*, 113(4), 1301-1307.
- Gilbert, P., & Moore, L. E.** (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of applied microbiology*, 99(4), 703-715.
- Girard, V., Côté, J. P., Charbonneau, M. È., Campos, M., Berthiaume, F., Hancock, M. A., ... & Mourez, M.** (2010). Conformation change in a self-recognizing autotransporter modulates bacterial cell-cell interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10616-10626.
- Girón, J. A., Torres, A. G., Freer, E., & Kaper, J. B.** (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular microbiology*, 44(2), 361-379.
- Gjerme, P.** (1974). Chlorhexidine in dental practice. *Journal of Clinical Periodontology*, 1(3), 143-152.

- Goswami, M., Mangoli, S. H., & Jawali, N.** (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 949-954.
- Gould, K.** (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 572-575.
- Grare, M., Dibama, H. M., Lafosse, S., Ribon, A., Mourer, M., Regnouf-de-Vains, J. B., ... & Duval, R. E.** (2010). Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(5), 432-438.
- Guerry, P.** (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in microbiology*, 15(10), 456-461.
- Guillemot, D.** (1999). Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology*, 2(5), 494-498.
- Gunawan, C., Faiz, M. B., Mann, R., Ting, S. R., Sotiriou, G. A., Marquis, C. P., & Amal, R.** (2020). Nanosilver targets the bacterial cell envelope: the link with generation of reactive oxygen radicals. *ACS applied materials & interfaces*, 12(5), 5557-5568.
- Gurbanov, R., Karadağ, H., Karaçam, S., & Samgane, G.** (2021). Tapioca starch modulates cellular events in oral probiotic *Streptococcus salivarius* strains. Probiotics and antimicrobial proteins, 13(1), 195-207
- Gurbanov, R., & Yıldız, F.** (2017). Molecular profile of oral probiotic bacteria to be used with functional foods. *Food and Health*, 3(3), 117-131.
- Haaber, J., Cohn, M. T., Frees, D., Andersen, T. J., & Ingmer, H.** (2012). Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *PloS one*, 7(7), e41075.
- Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C., & Lee, J. H.** (2017). Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Experimental & molecular medicine*, 49(9), e373-e373.
- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B.** (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267.

- Hancock, R. E., & Brinkman, F. S.** (2002). Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual review of microbiology*, 56(1), 17-38.
- Haris, P. I., & Severcan, F.** (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1-4), 207-221.
- Harshey, R. M.** (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology*, 57, 249.
- Hasman, H., Chakraborty, T., & Klemm, P.** (1999). Antigen-43-mediated autoaggregation of Escherichia coli is blocked by fimbriation. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4834-4841.
- He, S., Zhan, Z., Shi, C., Wang, S., & Shi, X.** (2022). Ethanol at Subinhibitory Concentrations Enhances Biofilm Formation in Salmonella Enteritidis. *Foods*, 11(15), 2237.
- Heidary, M., Ebrahimi Samangani, A., Kargari, A., Kiani Nejad, A., Yashmi, I., Motahar, M., ... & Khoshnood, S.** (2022). Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, e24427.
- Henrichsen, J.** (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews*, 36(4), 478-503.
- Heras, B., Totsika, M., Peters, K. M., Paxman, J. J., Gee, C. L., Jarrott, R. J., ... & Schembri, M. A.** (2014). The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 457-462.
- Hidalgo, G., Chan, M., & Tufenkji, N.** (2011). Inhibition of Escherichia coli CFT073 fliC expression and motility by cranberry materials. *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6852-6857.
- Horii, T., Morita, M., Muramatsu, H., Muranaka, Y., Kanno, T., & Maekawa, M.** (2003). Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1175-1179.

- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B.** (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.
- Imada, K.** (2018). Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophysical reviews*, 10(2), 559-570.
- Imamura, Y., Higashiyama, Y., Tomono, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Ohno, H., ... & Kohno, S.** (2005). Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1377-1380.
- Irazoki, O., Campoy, S., & Barbé, J.** (2017). The transient multidrug resistance phenotype of *Salmonella enterica* swarming cells is abolished by sub-inhibitory concentrations of antimicrobial compounds. *Frontiers in microbiology*, 8, 1360.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R.** (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *science*, 327(5963), 291-295.
- Jakobsen, L., Andersen, A. S., Friis-Møller, A., Jørgensen, B., Krogfelt, K. A., & Frimodt-Møller, N.** (2011). Silver resistance: an alarming public health concern?. *International journal of antimicrobial agents*, 5(38), 454-455.
- James, C. E., & Winterhalter, M.** (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893-903.
- Jayathilake, P. G., Li, B., Zuliani, P., Curtis, T., & Chen, J.** (2019). Modelling bacterial twitching in fluid flows: a CFD-DEM approach. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Jelić, D., & Antolović, R.** (2016). From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics*, 5(3), 29.
- Jiang, X., Baucom, C., & Elliott, R. L.** (2019). Mitochondrial toxicity of azithromycin results in aerobic glycolysis and DNA damage of human mammary epithelia and fibroblasts. *Antibiotics*, 8(3), 110.
- Jin, N., Zhang, D., & Martin, F. L.** (2017). Fingerprinting microbiomes towards screening for microbial antibiotic resistance. *Integrative Biology*, 9(5), 406-417.
- Jones, C. G.** (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontology 2000*, 15, 55-62.

- Kampf, G.** (2018). Chlorhexidine digluconate. In *Antiseptic stewardship* (pp. 429-534). Springer, Cham.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A.** (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300.
- Karacam, S., & Tuncer, S.** (2022). Exploiting the acidic extracellular pH: evaluation of *Streptococcus salivarius* M18 postbiotics to target cancer cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 995-1011.
- Karaçam, S., & Tunçer, S.** (2022). Lyophilized cell-free supernatants of the oral probiotics *Streptococcus salivarius* M18 and *Streptococcus salivarius* K12 show promises for milk safety. *Letters in Applied Microbiology*, (0), 1-10
- Karadağ, H., Tunçer, S., Karaçam, S., & Gurbanov, R.** (2022). Tapioca starch and skim milk support probiotic efficacy of *Lactiplantibacillus plantarum* post-fermentation medium against pathogens and cancer cells. *Archives of Microbiology*, 204(6), 1-13.
- Kardas, M., Gozen, A. G., & Severcan, F.** (2014). FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria. *Aquatic toxicology*, 155, 15-23.
- Kawai, T., & Akira, S.** (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
- Kawamura-Sato, K., Hasegawa, T., Yamashino, T., Ohta, M., & Iinuma, Y.** (2001). Postantibiotic suppression effect of macrolides on the expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Journal of infection and chemotherapy*, 7(1), 51-54.
- Kearns, D. B.** (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644.
- Khoshnood, S., Shirani, M., Dalir, A., Moradi, M., Haddadi, M. H., Sadeghifard, N., ... & Heidary, M.** (2022). Antiviral effects of azithromycin: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147, 112682.
- Kim, W., Killam, T., Sood, V., & Surette, M. G.** (2003). Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *Journal of bacteriology*, 185(10), 3111-3117.

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J.** (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J.** (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., & Collins, J. J.** (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135(4), 679-690.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechère, J. C.** (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology*, 182(21), 5990-5996.
- Kolodkin-Gal, I., & Engelberg-Kulka, H.** (2008). The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3169-3175.
- Kolodkin-Gal, I., Sat, B., Keshet, A., & Kulka, H. E.** (2008). The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics. *PLoS biology*, 6(12), e319.
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E., Irie, Y., ... & Bjarnsholt, T.** (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio*, 7(2), e00237-16.
- Laganenka, L., Colin, R., & Sourjik, V.** (2016). Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nature communications*, 7(1), 1-11.
- Lai, S., Tremblay, J., & Déziel, E.** (2009). Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental microbiology*, 11(1), 126-136.
- Leaper, D.** (2011). Topical antiseptics in wound care: time for reflection. *International Wound Journal*, 8(6), 547.
- Leaper, D. J., Schultz, G., Carville, K., Fletcher, J., Swanson, T., & Drake, R.** (2012). Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?. *International wound journal*, 9, 1-19.

- Leaper, D., Assadian, O., & Edmiston, C. E.** (2015). Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, *173*(2), 351-358.
- Lee, J. H.** (2019). Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *Journal of Microbiology*, *57*(3), 181-184.
- Leekha, S., Terrell, C. L., & Edson, R. S.** (2011, February). General principles of antimicrobial therapy. In *Mayo clinic proceedings* (Vol. 86, No. 2, pp. 156-167). Elsevier.
- Lim, K. S., & Kam, P. C. A.** (2008). Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. *Anaesthesia and intensive care*, *36*(4), 502-512.
- Lipsky, B. A., & Hoey, C.** (2009). Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical infectious diseases*, *49*(10), 1541-1549.
- Liu, F., Fu, J., Liu, C., Chen, J., Sun, M., Chen, H., ... & Wang, X.** (2017). Characterization and distinction of two flagellar systems in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* PCN033. *Microbiological research*, *196*, 69-79.
- Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M., & Balaban, N. Q.** (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science*, *367*(6474), 200-204.
- Loh, B. E. R. N. A. D. E. T. T. E., Grant, C. H. R. I. S. T. O. P. H. E. R., & Hancock, R.** (1984). Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *26*(4), 546-551.
- Loree J, Lappin SL.** (2021). Bacteriostatic Antibiotics. In: StatPearls. *StatPearls Publishing*, Treasure Island (FL); 2021. PMID: 31613458.
- Ma, L., Chang, F. Y., Fung, C. P., Chen, T. L., Lin, J. C., Lu, P. L., ... & Siu, L. K.** (2005). Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type β -lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microbial Drug Resistance*, *11*(1), 31-39.
- Macfarlane, S., Hopkins, M. J., & Macfarlane, G. T.** (2001). Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infection and immunity*, *69*(2), 1120-1126.

- Macnab, R. M.** (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology*, 57, 77.
- Mariathasan, S., & Monack, D. M.** (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 31-40.
- Maris, P.** (1995). Modes of action of disinfectants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(1), 47-55.
- Matsui, H., Eguchi, M., Ohsumi, K., Nakamura, A., Isshiki, Y., Sekiya, K., ... & Omura, S.** (2005). Azithromycin inhibits the formation of flagellar filaments without suppressing flagellin synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3396-3403.
- Maurice, F., Broutin, I., Podglajen, I., Benas, P., Collatz, E., & Dardel, F.** (2008). Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. *EMBO reports*, 9(4), 344-349.
- McDonnell, G., & Russell, A. D.** (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147-179.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., & Levy, S.** (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 77(7), 3974-3977.
- McWilliams, B. D., & Torres, A. G.** (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectrum* 2: EHEC-0003–2013.
- Melaugh, G., Hutchison, J., Kragh, K. N., Irie, Y., Roberts, A., Bjarnsholt, T., ... & Allen, R. J.** (2016). Shaping the growth behaviour of biofilms initiated from bacterial aggregates. *PloS one*, 11(3), e0149683.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A.** (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nature immunology*, 7(6), 569-575.
- Mohr, K. I.** (2016). History of antibiotics research. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 237-272.

- Molinari, G., Guzman, C. A., Pesce, A., & Schito, G. C.** (1993). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *31*(5), 681-688.
- Molinari, G., Paglia, P., & Schito, G. C.** (1992). Inhibition of motility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* by subinhibitory concentrations of azithromycin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *11*(5), 469-471.
- Mollaoglu, A. D., Gurbanov, R., Severcan, M., & Severcan, F.** (2021). CoronaVac (Sinovac) COVID-19 vaccine-induced molecular changes in healthy human serum by infrared spectroscopy coupled with chemometrics. *Turkish Journal of Biology*, *45*(7), 549-558.
- Montero, D. A., Velasco, J., Del Canto, F., Puente, J. L., Padola, N. L., Rasko, D. A., ... & Vidal, R.** (2017). Locus of adhesion and autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-13.
- Mortensen, N. P., Fowlkes, J. D., Maggart, M., Doktycz, M. J., Nataro, J. P., Drusano, G., & Allison, D. P.** (2011). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on enteroaggregative *Escherichia coli* and the role of the surface protein dispersin. *International journal of antimicrobial agents*, *38*(1), 27-34.
- Mukherjee, S., & Kearns, D. B.** (2014). The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. *Annual review of genetics*, *48*, 319.
- Munita, J. M., & Arias, C. A.** (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 4-2.
- Murray, T. S., Ledizet, M., & Kazmierczak, B. I.** (2010). Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of medical microbiology*, *59*(Pt 5), 511.
- Müller, G., & Kramer, A.** (2008). Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(6), 1281-1287.

- Nachamkin, I. R. V. I. N. G., Yang, X. H., & Stern, N. J.** (1993). Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(5), 1269-1273.
- Nakamura, S., & Minamino, T.** (2019). Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules*, *9*(7), 279.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N., & Uhlin, B. E.** (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS one*, *7*(12), e51241.
- Nalca, Y., Jansch, L., Bredenbruch, F., Geffers, R., Buer, J., & Häussler, S.** (2006). Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(5), 1680-1688.
- Nan, B.** (2017). Bacterial gliding motility: rolling out a consensus model. *Current Biology*, *27*(4), R154-R156.
- Nan, B., & Zusman, D. R.** (2016). Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Molecular microbiology*, *101*(2), 186-193.
- Nan, B., McBride, M. J., Chen, J., Zusman, D. R., & Oster, G.** (2014). Bacteria that glide with helical tracks. *Current Biology*, *24*(4), R169-R173.
- Naqvi, S. A. R.** (2022). ^{99m}Tc-labeled antibiotics for infection diagnosis: Mechanism, action, and progress. *Chemical Biology & Drug Design*, *99*(1), 56-74.
- National Center for Biotechnology Information** (2022). PubChem Compound Summary for CID 5967, Chlorhexidine acetate. Retrieved September 2, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorhexidine-acetate>.
- Naumann, D. & Lasch P.** (2015). Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1-32.
- Naumann, D.** (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of analytical chemistry*, *102*, 131.
- Naumann, D., Schultz, C., Sabisch, A., Kastowsky, M., & Labischinski, H.** (1989). New insights into the phase behaviour of a complex anionic amphiphile: architecture and dynamics of bacterial deep rough lipopolysaccharide membranes as seen by FTIR, X-ray, and molecular modelling techniques. *Journal of molecular structure*, *214*, 213-246.

- Navas, N., Romero-Pastor, J., Manzano, E., & Cardell, C.** (2008). Benefits of applying combined diffuse reflectance FTIR spectroscopy and principal component analysis for the study of blue tempera historical painting. *analytica chimica acta*, 630(2), 141-149.
- Naveed, M., Chaudhry, Z., Bukhari, S. A., Meer, B., & Ashraf, H.** (2020). Antibiotics resistance mechanism. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment* (pp. 292-312). Elsevier.
- Newell, D. G., McBRIDE, H. A. R. O. L. D., & Dolby, J. M.** (1985). Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. *Epidemiology & Infection*, 95(2), 217-227.
- Nicolaou, K. C., & Rigol, S.** (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of antibiotics*, 71(2), 153-184.
- Nikaido, H., & Pagès, J. M.** (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 340-363.
- Ofek, I., Hasty, D. L., & Doyle, R. J.** (2003). *Bacterial adhesion to animal cells and tissues*. ASM press.
- Oliver, M. E., & Hinks, T. S.** (2021). Azithromycin in viral infections. *Reviews in medical virology*, 31(2), e2163.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*, 54, 49.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E.** (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2671-2679.
- Ozek Simsek, N., Sara, Y., Onur, R., & Severcan, F.** (2010). Low dose simvastatin induces compositional, structural and dynamic changes in rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue. *Bioscience reports*, 30(1), 41-50.

- Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P.** (2022). Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms*, *10*(3), 563.
- Pandey N, Cascella M.** (2021). Beta Lactam Antibiotics. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Park, B. W., Zhuang, J., Yasa, O., & Sitti, M.** (2017). Multifunctional bacteria-driven microswimmers for targeted active drug delivery. *ACS nano*, *11*(9), 8910-8923.
- Parker, F. S.** (1971). Amides and amines. In *Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology, and medicine* (pp. 165-172). Springer, Boston, MA.
- Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., & Vos, R.** (2014). Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, *143*(2), 225-245.
- Partridge, J. D.** (2022). Surveying a Swarm: Experimental Techniques To Establish and Examine Bacterial Collective Motion. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(3), e01853-21.
- Parveen Rani, R., Anandharaj, M., Hema, S., Deepika, R., & David Ravindran, A.** (2016). Purification of antilisterial peptide (Subtilosin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1910.
- Piddock, L. J.** (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 382-402.
- Piddock, L. J.** (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(8), 629-636.
- Pietsch, F., Heidrich, G., Nordholt, N., & Schreiber, F.** (2021). Prevalent synergy and antagonism among antibiotics and biocides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, *11*, 615618.
- Pollitt, E. J., & Diggle, S. P.** (2017). Defining motility in the Staphylococci. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(16), 2943-2958.
- Poole, K.** (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(1), 20-51.

- Pratt, L. A., & Kolter, R.** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, *30*(2), 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C.** (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental microbiology*, *2*(4), 450-464.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C.** (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology*, *12*(11), 509-517.
- Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., ... & Dumitrescu, O.** (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, *11*(1), 1-9.
- Ravichandar, J. D., Bower, A. G., Julius, A. A., & Collins, C. H.** (2017). Transcriptional control of motility enables directional movement of *Escherichia coli* in a signal gradient. *Scientific reports*, *7*(1), 1-14.
- Reid, S. D., Selander, R. K., & Whittam, T. S.** (1999). Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *181*(1), 153-160.
- Reygaert, W. C.** (2017). *Antimicrobial mechanisms of Escherichia coli* (Vol. 5, pp. 81-97). London, UK: IntechOpen.
- Reygaert, W. C.** (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, *4*(3), 482.
- Rezzoagli, C., Archetti, M., Mignot, I., Baumgartner, M., & Kümmerli, R.** (2020). Combining antibiotics with antivirulence compounds can have synergistic effects and reverse selection for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS biology*, *18*(8), e3000805.
- Rice, L.B., Sahn, D., & Bonomo, R.** (2003) Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: DC: ASM Press, 1084–7.

- Roberts, D. E., Read, R. C., Cole, P. J., & Wilson, R. O. B. E. R. T.** (1993). Haemophilus influenzae infection of human respiratory mucosa in low concentrations of antibiotics. *Am Rev Respir Dis*, *148*, 201-207.
- Rocha, S. P., Elias, W. P., Cianciarullo, A. M., Menezes, M. A., Nara, J. M., Piazza, R. M., ... & Pelayo, J. S.** (2007). Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *51*(2), 319-326.
- Rolli, J., Loukili, N., Levrant, S., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Waeber, B., ... & Liaudet, L.** (2010). Bacterial flagellin elicits widespread innate immune defense mechanisms, apoptotic signaling, and a sepsis-like systemic inflammatory response in mice. *Critical Care*, *14*(4), 1-11.
- Rossez, Y., Wolfson, E. B., Holmes, A., Gally, D. L., & Holden, N. J.** (2015). Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS pathogens*, *11*(1), e1004483.
- Roy, K., Hilliard, G. M., Hamilton, D. J., Luo, J., Ostmann, M. M., & Fleckenstein, J. M.** (2009). Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature*, *457*(7229), 594-598.
- Salimi, A., Eybagi, S., Seydi, E., Naserzadeh, P., Kazerouni, N. P., & Pourahmad, J.** (2016). Toxicity of macrolide antibiotics on isolated heart mitochondria: a justification for their cardiotoxic adverse effect. *Xenobiotica*, *46*(1), 82-93.
- Schembri, M. A., Christiansen, G., & Klemm, P.** (2001). FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *41*(6), 1419-1430.
- Schluter, J., Nadell, C. D., Bassler, B. L., & Foster, K. R.** (2015). Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME journal*, *9*(1), 139-149.
- Shapaval, V., Brandenburg, J., Blomqvist, J., Tafintseva, V., Passoth, V., Sandgren, M., & Kohler, A.** (2019). Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy. *Biotechnology for biofuels*, *12*(1), 1-12.
- Sharifian Gh, M., Wilhelm, M. J., & Dai, H. L.** (2018). Azithromycin-induced changes to bacterial membrane properties monitored in vitro by second-harmonic light scattering. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *9*(6), 569-574.

- Sheng, D., Xu, F., Yu, Q., Fang, T., Xia, J., Li, S., & Wang, X.** (2015). A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1099, 18-23.
- Sherlock, O., Vejborg, R. M., & Klemm, P.** (2005). The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and immunity*, 73(4), 1954-1963.
- Sim, M., Koirala, S., Picton, D., Strahl, H., Hoskisson, P. A., Rao, C. V., ... & Aldridge, P. D.** (2017). Growth rate control of flagellar assembly in *Escherichia coli* strain RP437. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Singkham-In, U., Phuengmaung, P., Makjaroen, J., Saisorn, W., Bhunyakarnjanarat, T., Chatsuwat, T., ... & Leelahavanichkul, A.** (2022). Chlorhexidine Promotes Psl Expression in *Pseudomonas aeruginosa* That Enhances Cell Aggregation with Preserved Pathogenicity Demonstrates an Adaptation against Antiseptic. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8308.
- Soren, O., Brinch, K. S., Patel, D., Liu, Y., Liu, A., Coates, A., & Hu, Y.** (2015). Antimicrobial peptide novicidin synergizes with rifampin, ceftriaxone, and ceftazidime against antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6233-6240.
- Soutourina, O. A., & Bertin, P. N.** (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 27(4), 505-523.
- Spellberg, B., Bartlett, J. G., & Gilbert, D. N.** (2013). The future of antibiotics and resistance. *New England Journal of Medicine*, 368(4), 299-302.
- Steimle, A., Menz, S., Bender, A., Ball, B., Weber, A. N., Hagemann, T., ... & Frick, J. S.** (2019). Flagellin hypervariable region determines symbiotic properties of commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS biology*, 17(6), e3000334.
- Stevenson, E., Minton, N. P., & Kuehne, S. A.** (2015). The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. *Trends in microbiology*, 23(5), 275-282.
- Strateva, T., & Yordanov, D.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), 1133-1148.

- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R.** (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2066.
- Swiecicki, J. M., Sliusarenko, O., & Weibel, D. B.** (2013). From swimming to swarming: Escherichia coli cell motility in two-dimensions. *Integrative biology*, *5*(12), 1490-1494.
- Taillandier, E., Peticolas, W. L., Adam, S., Huynh-Dinh, T., & Igolen, J.** (1990). Polymorphism of the d (CCCGCGGG) 2 double helix studied by FT-ir spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, *46*(1), 107-112.
- Tamae, C., Liu, A., Kim, K., Sitz, D., Hong, J., Becket, E., ... & Miller, J. H.** (2008). Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *190*(17), 5981-5988.
- Tamma, P. D., Cosgrove, S. E., & Maragakis, L. L.** (2012). Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, *25*(3), 450-470.
- Tan, H., Zhang, L., Weng, Y., Chen, R., Zhu, F., Jin, Y., ... & Wu, W.** (2016). PA3297 counteracts antimicrobial effects of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in microbiology*, *7*, 317.
- Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M.** (2008). Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagellar motor. *International review of cell and molecular biology*, *270*, 39-85.
- Tezel, U., & Pavlostathis, S. G.** (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current opinion in biotechnology*, *33*, 296-304.
- Tolmasky, M. E.** (2000). Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 transposon paradigm. *RNA*, *5*(10), 11.
- Trunk, T., Khalil, H. S., & Leo, J. C.** (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS microbiology*, *4*(1), 140-164.
- Tunçer, S., Çolakoğlu, M., Uluşan, S., Ertaş, G., Karasu, Ç., & Banerjee, S.** (2019). Evaluation of colloidal platinum on cytotoxicity, oxidative stress and barrier permeability across the gut epithelium. *Heliyon*, *5*(3), e01336.

- Tunçer, S., & Gurbanov, R.** (2023). Non-growth inhibitory doses of dimethyl sulfoxide alter gene expression and epigenetic pattern of bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(1), 299-312.
- Tvrda, E.** (2019). NBT test. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 195-205). Academic Press.
- Tyers, M., & Wright, G. D.** (2019). Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(3), 141-155.
- Ulett, G. C., Webb, R. I., & Schembri, M. A.** (2006). Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *152*(7), 2101-2110.
- Umemura, T., Kato, H., Hagihara, M., Hirai, J., Yamagishi, Y., & Mikamo, H.** (2022). Efficacy of Combination Therapies for the Treatment of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections Based on Meta-Analyses. *Antibiotics*, *11*(4), 524.
- Unal, R., Yousef, A. E., & Dunne, C. P.** (2002). Spectrofluorimetric assessment of bacterial cell membrane damage by pulsed electric field. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *3*(3), 247-254.
- Vaccari, L., Molaei, M., Niepa, T. H., Lee, D., Leheny, R. L., & Stebe, K. J.** (2017). Films of bacteria at interfaces. *Advances in colloid and interface science*, *247*, 561-572.
- Vadyvaloo, V., Viall, A. K., Jarrett, C. O., Hinz, A. K., Sturdevant, D. E., & Hinnebusch, B. J.** (2015). Role of the PhoP–PhoQ gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract. *Microbiology*, *161*(Pt 6), 1198.
- Van der Woude, M. W., & Henderson, I. R.** (2008). Regulation and function of Ag43 (flu). *Annu. Rev. Microbiol.*, *62*, 153-169.
- Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S.** (2018). How macrolide antibiotics work. *Trends in biochemical sciences*, *43*(9), 668-684.
- Verma, T., Aggarwal, A., Singh, S., Sharma, S., & Sarma, S. J.** (2022). Current challenges and advancements towards discovery and resistance of antibiotics. *Journal of Molecular Structure*, *1248*, 131380.
- Vestby, L. K., & Nesse, L. L.** (2015). Wound care antiseptics-performance differences against *Staphylococcus aureus* in biofilm. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *57*(1), 1-5.

- Vodnar, D. C., & SOCACIU, C.** (2012). Monitoring lactic acid fermentation in media containing dandelion (*Taraxacum officinale*) by FTIR spectroscopy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 65-68.
- Vongsvivut, J., Miller, M. R., McNaughton, D., Heraud, P., & Barrow, C. J.** (2014). Rapid discrimination and determination of polyunsaturated fatty acid composition in marine oils by FTIR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food and bioprocess technology*, 7(8), 2410-2422.
- Wales, A. D., & Davies, R. H.** (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4(4), 567-604.
- Wang, Y., Zhou, Q., Li, B., Liu, B., Wu, G., Ibrahim, M., ... & Sun, G.** (2012). Differentiation in MALDI-TOF MS and FTIR spectra between two closely related species *Acidovorax oryzae* and *Acidovorax citrulli*. *BMC microbiology*, 12(1), 1-7.
- Wang, Q., Frye, J. G., McClelland, M., & Harshey, R. M.** (2004). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular microbiology*, 52(1), 169-187.
- Wang, X.; Zhao, X.** Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 1395–1402.
- Whelan, D. R., Hiscox, T. J., Rood, J. I., Bambery, K. R., McNaughton, D., & Wood, B. R.** (2014). Detection of an en masse and reversible B-to A-DNA conformational transition in prokaryotes in response to desiccation. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(97), 20140454.
- Wojnicz, D., & Jankowski, S.** (2007). Effects of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *International journal of antimicrobial agents*, 29(6), 700-704.
- Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Rudnicka, Z., & Markowska, K.** (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of applied genetics*, 57(2), 225-238.
- Worthington, R. J., & Melander, C.** (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in biotechnology*, 31(3), 177-184.

- Wu, P., & Grainger, D. W.** (2006). Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials*, 27(11), 2450-2467.
- Xu, D., Liao, C., Zhang, B., Tolbert, W. D., He, W., Dai, Z., ... & Lu, W.** (2018). Human enteric α -defensin 5 promotes *Shigella* infection by enhancing bacterial adhesion and invasion. *Immunity*, 48(6), 1233-1244.
- Xu, Z. G., Gao, Y., He, J. G., Xu, W. F., Jiang, M., & Jin, H. S.** (2015). Effects of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheter-associated urinary tract infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(2), 569-572.
- Yamaguchi, T., Makino, F., Miyata, T., Minamino, T., Kato, T., & Namba, K.** (2021). Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor. *Nature Communications*, 12(1), 1-12.
- Ye, J., Guo, L., Zheng, S., Feng, Y., Zhang, T., Yang, Z., ... & Zhang, Z.** (2019). Synthesis of bacterial cellulose based SnO₂-PPy nanocomposites as potential flexible, highly conductive material. *Materials Letters*, 253, 372-376.
- Yeh, P., Tschumi, A. I., & Kishony, R.** (2006). Functional classification of drugs by properties of their pairwise interactions. *Nature genetics*, 38(4), 489-494.
- Yeom, J.; Imlay, J.A.; Park, W.** (2010). Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem*, 285, 22689–22695.
- Yonar, D., Severcan, M., Gurbanov, R., Sandal, A., Yilmaz, U., Emri, S., & Severcan, F.** (2022). Rapid diagnosis of malignant pleural mesothelioma and its discrimination from lung cancer and benign exudative effusions using blood serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1868(10), 166473.
- Young, G. M., Smith, M. J., Minnich, S. A., & Miller, V. L.** (1999). The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, flhDC, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *Journal of bacteriology*, 181(9), 2823-2833.
- Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R., & Rolff, J.** (2016). Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), 1717-1724.
- Zanyar, M., Rehman, S., & Rehman, I.** (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 43, 134-179.