

YENİ BİR GRUP ANTİMİKROBİYAL AJAN: SERAGENİNLER (KATYONİK STEROİD ANTİBİYOTİKLER)

Çağla BOZKURT-GÜZEL, Gözde İNCİ

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Günümüzde özellikle Gram negatif ve Gram pozitif patojenler başta olmak üzere mikroorganizmalardaki çoklu ilaç direncinin artması, araştırmacıları alternatif tedavi seçeneklerinin ve antimikrobik etkili ajanların arayışına yöneltmiştir. Bu konuda sıklıkla çalışılan hedeflerden bir tanesi bakteri membranıdır. Bakteri membranını etkileyen birçok ajan, katyonik ve yüzeysel olarak amfifilik özellikte olup, LL-37 ve magainin gibi endojen antimikrobiyal peptidleri (AMP) de içeren moleküllerdir. Ancak, karmaşık yapı ve boyutlarından dolayı birçok AMP'nin sentezlenmesi ve saflaştırılması zordur. Bunlara ek olarak, AMP'ler proteazların substratları olabilmektedir ve bu da vücuttaki yarı ömürlerini etkilemektedir. AMP'lerin peptid olmayan formlarının geliştirilmesi, uzun zamandır kullanılan antimikrobiyal stratejilerinin ve peptid tedavilerin dezavantajları olmadan kullanılmasını sağlayacaktır. Son zamanlarda, bir dizi katyonik kolik asit türeviden sentezlenmiş ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmalarını sağlayacak özellikleri saptanmıştır. AMP'leri taklit etmek üzere tasarlanan serageninler (Cationic Steroid Antibiotics-CSA-katyonik steroid antibiyotikler) toksisitesi düşük olan yeni bir sınıf antimikrobiyal moleküllerdir. Peptid yapıda olmayan serageninler tuza duyarlı değildir, büyük ölçeklerde hazırlanabilirler ve saflaştırılmaları nispeten daha kolaydır. Bunlardan biri olan CSA-13 (Cationic Steroid Antibiotic-13), prototip ceregenin molekülüdür ve dirençli suşlar dahil olmak üzere Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı oldukça etkilidir. CSA-13, vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Helicobacter pylori* gibi bakterilere ek olarak; *Streptococcus mutans* ve *Porphyromonas* türleri gibi periodontopatik bakterilere karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Serageninlerin sahip olduğu antibakteriyal etkilerinin yanı sıra, bu moleküller aynı zamanda, antifungal, antiviral, antiparazitik, antibiyofilm ve antikanser etki de gösterebilmektedirler. CSA'ların tüm hücrel aktiviteleri bakterilerin plazma membranı ile ilişkili olup, membran içine girdikten sonra etkilerini membranın depolarizasyonu ile sonuçlanan birtakım membran organizasyonu değişiklikleri ile göstermektedir. Ancak, serageninlerin stabilite, immünogenetik, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerindeki eksiklikler, bu konuda daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir. Bu derlemede, bu ajanların çeşitli özelliklerinin tartışılıp, aktiviteleri hakkında şu anakadar bilinenlerin ve mikrobiyal özgüllüklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar sözcükler: CSA'ların mekanizması, CSA'ların yapı ve toksisitesi, katyonik steroid antibiyotik (CSA), seragenin, yeni antimikrobiyaller

SUMMARY

A Novel Class of Antimicrobial Agents: Ceragenins (Cationic Steroid Antibiotics)

The emergence of multidrug resistance in microorganisms, especially in Gram negative and Gram positive pathogens led the researchers to search for alternative therapeutic options and antimicrobial agents. One frequently studied target is the bacterial membrane. Many agents that target the bacterial membrane are cationic, facially amphiphilic molecules including endogenous antimicrobial peptides (AMP) like LL-37 and magainin. However, many AMPs are difficult to synthesize and purify due to their complexity and size. In addition, AMPs can be substrates for proteases, which limit their *in vivo* half-lives. Consequently, development of nonpeptide mimics of AMPs may provide a means of using the antimicrobial strategies evolved over eons without the disadvantages of peptide therapeutics. Recently, a series of cationic derivatives of cholic acid have been synthesized and have been found to have properties that may make them useful antimicrobial agents. Ceragenins, (Cationic Steroid Antibiotics-CSA) designed to mimic the activities of AMPs, are a new class of antimicrobial agent those have low toxicity. Ceragenins are not peptide based, they are not salt sensitive, and they are relatively simple to prepare and purify on a large scale. Among them, CSA-13, which stands for cationic steroid antibiotics, is a lead ceragenin and is highly active against Gram positive and Gram negative bacteria including resistant strains. CSA-13 displays antimicrobial activity against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*, and periodontopathic bacteria such as *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas* species. As well as their antibacterial activities, these molecules also can show antifungal, antiviral, antiparasitic, antibiofilm and anticancer effects. All cellular activities of CSA involve interactions with plasma membranes, and the mechanism of bacterial cell killing is associated with changes in membrane organization after CSA insertion into the plasma membrane, which results in membrane depolarization. However, major concerns surrounding ceragenins such as stability, immunogenicity, pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters are needed further investigation. In the present review we will discuss the properties of these agents and what is currently known about their mode of action and microbial specificity.

Keywords: cationic steroid antibiotics (CSA), ceragenin, mechanism of action of CSAs, new antimicrobials, structure and toxicity of CSAs

İletişim adresi: Çağla Bozkurt-Güzel, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel: (0212) 440 00 00/13525; GSM: (0532) 624 89 86

e-posta: caglabozkurt@gmail.com

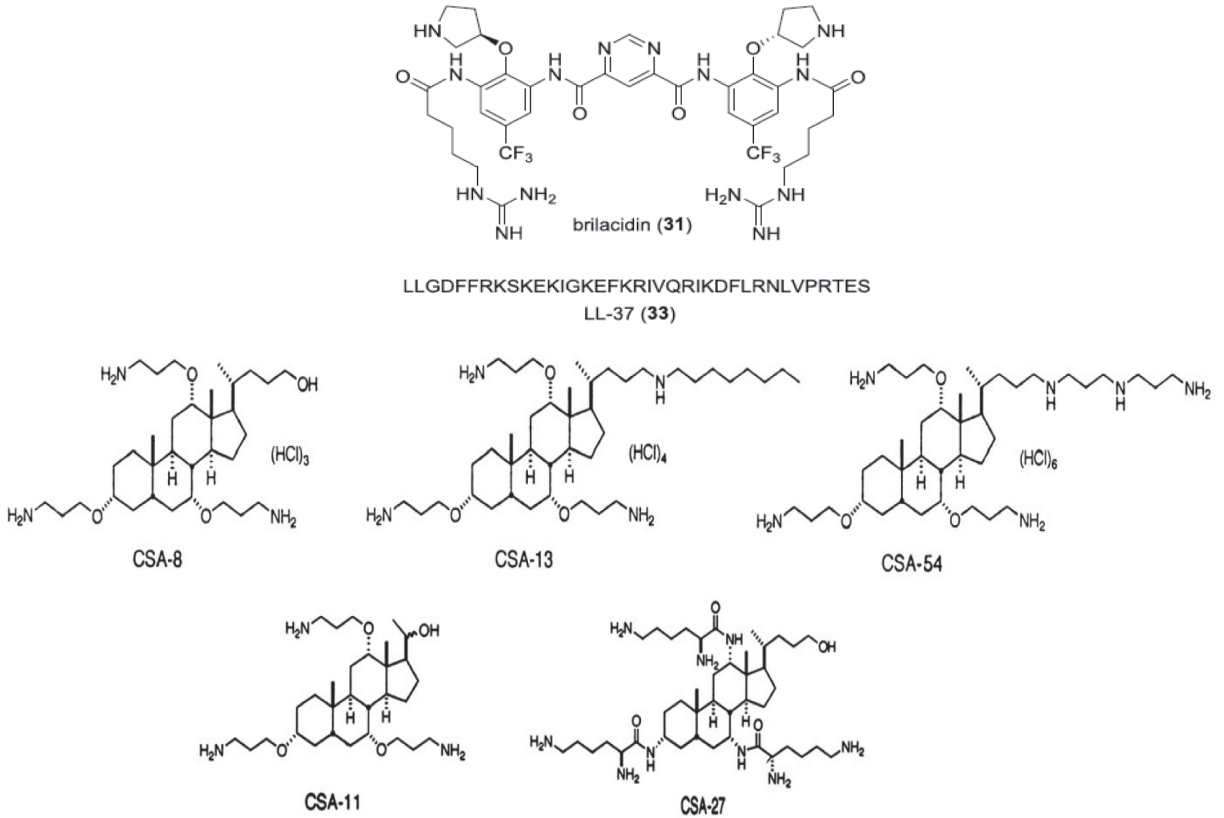
Alındığı tarih: 27.04.2016, Yayına kabul: 29.06.2016

Derlemenin içeriği:

1. Katyonik steroid antibiyotiklerin (CSA) genel özellikleri
2. CSA'ların yapısal sınıflandırılması
3. CSA'ların etki mekanizması
4. CSA'ların in vitro etki spektrumu
5. CSA'ların dış membran geçirgenlik özellikleri
6. CSA'ların bakterisidal ve bakteriyostatik özellikleri
7. CSA'ların hemolitik özellikleri
8. CSA'ların toksik özellikleri
9. Sonuç

Günümüzde bakteriyel infeksiyonların tedavisi sırasında kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan direnç gelişimi, araştırmacıları yeni antimikrobiyal ajan ve tedavi yöntemlerinin arayışına yöneltmiştir. Bu ajanların arasında en fazla dikkat çeken ve gelecek vaat eden gruplardan biri antimikrobik etkili katyonik peptidler

dir (AMP). AMP'ler mikroorganizmalar, böcekler, amfibiyenler, sürüngenler, kuşlar, bitkiler, çeşitli memeli hayvanlar, insanlar gibi çok çeşitli canlılardan elde edilebilmektedir⁽¹⁰⁾. AMP'ler, klasik antibiyotiklerden farklı olarak birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri, mantarları, HIV, herpes simplex ve influenza gibi bazı zarflı virüsleri ve parazitler gibi ökaryot hücreli canlıları da içine alan çok geniş etki spektrumuna sahiptirler. Bu maddeler bahsedilen mikroorganizmaların bir ya da birkaçına etkili olabildikleri gibi bazıları tek başlarına da belirtilen tüm bu etkilere sahip olabilmektedirler⁽¹⁴⁾. AMP'lerin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılmaları sonucunda meydana gelen sinerjist etki ile bu antibiyotiklere dirençli olan suşlara karşı da etkili olabildikleri gösterilmiştir⁽¹⁵⁾. AMP'lerin bu özelliklerinin yanısıra lineer peptid yapıda olmaları antibakteriyel etki göstermeden bakteri tarafından proteolize uğramaları, fazla miktarda üretiminin pahalı ve zor olması, dolaşımda yarılanma



Şekil 1. LL-37 peptidinin ve CSA-8, CSA-13, CSA-54, CSA-11, CSA-27'nin moleküler yapısı^(21,26).

ömürlerinin kısa olması ve mikromolar seviyelerde kullanımlarında mikroorganizmalara karşı toksik etkisinin daha az olması gibi birtakım istenmeyen özelliklerinden dolayı klinisyenler tarafından tercih edilmeyebilir^(13,16). Bu gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar peptid ve peptid analoglarını kullanarak yeni antimikrobiyal ajan arayışlarına yönelmiştir.

1- Katyonik steroid antibiyotiklerin (CSA) genel özellikleri

Protein epitop benzeri moleküller, multi-merik peptidler, sentetik lipid bağlı peptidler, peptoidler ve serageninler AMP'ye benzer yapıda olan, katyonik, amfifilik özelliklere sahip moleküller arasında sayılabilir⁽¹⁶⁾. Basit aminoasit dizilimlerinden elde edilen peptid yapılarının farklı dizilimleri ile yeni analoglar türetilmiş ve bu yapılara katyon gibi doğal olmayan aminoasit sekansları eklenerek katyonik küçük moleküller ve polimerler elde edilmiştir. Önemli safra asitlerinden biri olan kolik asidin bir seri katyonik türevinden sentezlenen ve antimikrobiyal ajan özelliği gösteren katyonik peptid analoglarına "seragenin" denir. Seragenin, membrana etki edebilen katyonik steroid antibiyotiklerin (cationic steroid antibiotics-CSA) genel ismidir ve endojen AMP'lerin peptid olmayan formları olarak geliştirilmiştir. CSA'lar, katyonik ve amfifilik özellikte olan magainin ve LL-37 gibi AMP'lere yapısal olarak benzerlik göstermektedir⁽¹³⁾ (Şekil 1). CSA'ların hidrofobik kısımlarının lipid yapıda olması, bu molekülün hücre membranı içerisine daha dengeli bir şekilde yerleşmesini sağlarken, proteolitik enzimler tarafından parçalanmaya karşı daha dirençli olmasına neden olur. Bu yapısal özellik, AMP'ler ile arasındaki önemli farklılıklardan biri olup CSA grubunu tercih edilebilir kılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda CSA'ların geniş bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

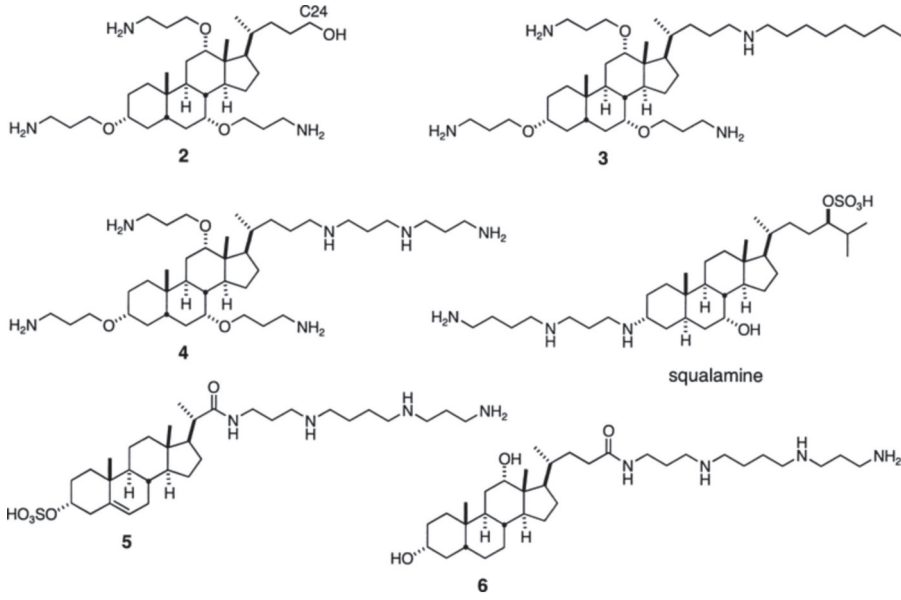
Katyonik steroid moleküller sahip oldukları birtakım farklı kimyasal yapılara göre çeşitli numaralarla birlikte isimlendirilmektedir. Bu moleküller günümüzde 100'den fazla sayıdadır ve CSA-8, CSA-11, CSA-13, CSA-27 ve CSA-54 vs. şeklinde adlandırılmaktadır (Şekil 1). CSA'lar başta Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler

olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili moleküllerdir. Serageninlerin iki önemli özelliği araştırmacıları bu moleküller üzerinde çalışmaya yöneltmiştir: Bunlardan birincisi, CSA'ların sahip olduğu minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine göre düşük hemolitik aktivitesinin olması; ikincisi ise en sık kullanılan ve en etkili moleküllerden biri olan CSA-13'ün dirençli bakterilere karşı fark edilir bir şekilde antimikrobiyal etki göstermesidir. Ayrıca, CSA-13 dolaşımdan uzaklaştırılsa bile, bakteriyel büyümeyi uzun süre bastırabilme özelliğine sahiptir. Bu durum amfifilik özellikte olan moleküllerin membran üzerindeki güçlü dağılımları sonucunda ilacın dokudan yavaş atılımına sebep olmaktadır⁽¹²⁾. Pollard ve ark.'nın⁽³⁸⁾ yapmış oldukları çalışmada, CSA-13'ün 30'dan fazla pasajdan sonra bile güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve bakterilerin bu bileşiğe karşı direnç geliştirmesinin uzak bir ihtimal olduğu gösterilmiştir.

2- CSA'ların yapısal sınıflandırılması

CSA'lar iki ayrı kategoride incelenmektedir: 1- Polimiksin türevleri, 2- Skualamin ve türevleri. Her iki kategori içinde birçok CSA molekülü bulunmaktadır. Tüm bu moleküllerin oldukça kapsamlı listelerinin hazırlanmasından ziyade, sadece temsili antibiyotikler ve onların aktiviteleri belirlenmiştir.

İlk grubu oluşturan polimiksin türevleri üç amin grubunun eter ile steroid çekirdeğe bağlanması ile diğer gruptan ayrılır (Şekil 2'deki CSA-2 örneğinde olduğu gibi). Çeşitli gruplar hidrofobik zincirde ve poliaminlerde 24 numaralı karbona bağlanarak antibakteriyel aktiviteyi etkilemektedir (Şekil 2). İkinci grupta yer alan skualamin ve türevleri Regen ve ark. tarafından hazırlanmıştır^(7,22). Skualaminler, köpek balığından izole edilen ilk CSA'lardandır⁽¹⁰⁾. Bu grupta bulunan ajanların poliamin ve sülfat gruplarının ters pozisyonda durması ve ayrıca sülfat grubunun kaldırılmasıyla CSA-5 ve CSA-6 molekülleri oluşturulabilir (Şekil 2). Polimiksin ve skualamin türevleri arasında temel yapısal farklılıklar bulunmasına rağmen, bu moleküllerde bulunan ortak steroidlerin bir yüzünde poliamin zincir ve amfifilik yapılar yer almaktadır⁽⁷⁾.



Şekil 2. Skualamin ve CSA-2, CSA-3, CSA-4, CSA-5 ve CSA-6'nın moleküler yapıları⁽³⁹⁾.

3- CSA'ların etki mekanizması

AMP'lerin etki mekanizmaları incelendiğinde iki model tanımlanmıştır: Kilim modeli ve fıçı tahtası modeli. Kilim modeline göre bakteri hücresinin negatif yüklü yüzeyinde bulunan fosfolipit gruplar ile pozitif yüklü peptid monomerleri arasındaki ilk etkileşim elektrostatik olarak gerçekleşir. Fıçı tahtası modelinde ise farklı sayıdaki peptidler membranın iç kısmında bir halka görünümünü verecek şekilde yerleşirler. Membranda kanalların oluşmasını sağlayan bu peptid moleküllerinin herbiri fıçıyı oluşturan tahtalara benzetilmektedir. Sekropin, magainin gibi α -heliks yapısında bulunan birçok AMP'lerin kilim modeli etki mekanizmasına sahip olduğu düşünülmektedir⁽¹⁰⁾. CSA'lar bu iki AMP gibi kilim yöntemi ile antimikrobiyal etki gösterdiği için AMP ve CSA'lar arasındaki aktivite benzerliği olduğu düşünülmektedir.

Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalardan birinde CSA-2 ve CSA-3'ün, AMP'lerden ise magaininin membran depolarizasyon hızı lipofilik boya olan 3,3'-dietilditiyokarbosiyanin floresan boya ile boyanarak ölçülmüş ve bakterilerin membrandan geçen moleküllere verdiği cevap araştırılmıştır. Membran depolarizasyonu yönteminde boya membran yapısına geçerek polarizasyonunu sağlamakta ve depolarizasyon görüntüsünün aksi olarak zayıf bir floresan

görüntü oluşturmaktadır. Bu çalışma sonucunda, iki antimikrobiyal ajanın da membran-aktif olduğu ve aynı hızda etki gösterdiği anlaşılmış, CSA'ların AMP'lere göre daha düşük konsantrasyonda membrana etki ettiği saptanmıştır⁽¹²⁾. Birçok antimikrobiyal ajanın ortak özelliği etki mekanizmalarının oldukça karışık olması ve sadece hedef bölgeyi etkileme gibi bir mekanizmalarının olmamasıdır. Ancak, CSA'ların etki mekanizmaları incelendiği zaman, hücre membranından geçerken elektriksel değişime neden olarak membran depolarizasyonunu sağladığı fark edilmiştir. Bu durum, hücre toksisite mekanizmasının yanı sıra bakteri membranında bulunan bariyerlerin parçalanmaya başlamasıyla da ilgilidir. Ayrıca, *Escherichia coli*'nin elektron mikroskobu ile incelendiği bir çalışmada hücre membranında ve yüzeyinde oldukça geniş morfolojik değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Bu inceleme diğer antimikrobiyal ajanlarla da denenmiştir ancak ilaç toksisitesi ve morfolojik değişim arasında bir bağlantı olduğu saptanmamıştır. Ayrıca yapısında dipolar lipit ve fosfatidilkolin bulunan lipozomlarda sızıntının daha az olduğu ve ajanların düşük hemolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak farklı lipitlerden türetilen farklı lipozomları olan çeşitli bakteriler incelendiği zaman, membran yapısı benzer olan bakterilerdeki lipozom sızıntısı ile toksisite

arasında bağlantı olmadığı düşünülmüştür⁽¹²⁾. Tüm bu araştırmalar sonucunda, serageninlerin hücre membranına etki ederek antimikrobiyal aktivite gösterdiği anlaşılmıştır ancak basit membran yapısının bozulmasının CSA'ların tek etki mekanizması olmadığı gösterilmiştir.

Bakteri membranının tek katmanında bulunan lipit yapısının bozulması membran bariyerinin parçalanmasını kolaylaştırmaktadır. Membranın tek katmanının üzerinde meydana gelen pozitif yada negatif bükülmeler bariyer oluşumunu etkileyen faktörler arasındadır. Membran üzerindeki pozitif bükülmeler por ve misel oluşumunu sağlarken, negatif bükülmeler kübik ve hekzagonal faz olan non-lamellar fazına neden olur ve bariyer oluşumunu engeller. Ancak en etkili ajanlardan biri olan CSA-13, hekzagonal fazdan etkilenmez ve lipit tabakasından geçebilir. Sonuç olarak, membran yapısının değişimi serageninlerin etki mekanizmasını açıklamak için yeterli değildir^(12,13).

CSA'ların etki mekanizmasının bakteri membranının lipit bileşeniyle yakından ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır. Farklı CSA'ların bakteri fosfolipit çift tabakalarıyla etkileşimleri farklı sistemlerde denenmiştir. Serageninler, farklı fosfolipit çift tabakalarla antimikrobiyal aktiviteleri ile ilişkili olabilen özel birleşmeler oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri yüksek oranda fosfatidiletanolamin (PE) içeren bakterilerde düşük olmaktadır. PE içeriği yüksek olan Gram negatif bakteriler farklı serageninlere duyarlılık göstermektedirler. Bu durum, farklı serageninlerin, PE'den zengin lipozomlardan su içeriğinin sızmasını indüklemeye yetenekleri de dâhil olmak üzere bileşiklerin fosfolipitlerle etkileşim oranıyla ilişkilidir. Hücre membranları büyük oranda anyonik lipitlerden oluşan ve düşük oranda PE içeren bakteriler, serageninlerin etkinliğine çok duyarlıdır. Fakat bakterinin farklı suşları için ve serageninlerin çoğu ile benzer antimikrobiyal aktivite görülür. Gram negatif bakteriler genellikle yüksek oranda PE içermesine rağmen, birkaç istisna vardır. Bununla beraber, bu konuda yapılan bir çalışmada *E.coli*'nin doğal suşunun lipit içeriğinin %80'inin PE olmasına rağmen, PE içermeyen bir mutant suşu yapılmıştır. PE açısından yüksek içeriğe sahip olabilen bazı

istisna Gram pozitif bakteriler de vardır. Serageninlerin antimikrobiyal aktivitesinin, bakteri dış membranı olsun veya olmasın bakteri membranının PE içeriği ile iyi korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla, bakteriyel lipit bileşimi, bakterilerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının saptanmasında önemli bir faktördür⁽¹²⁾.

Özet olarak, CSA'ların bütün hücrel aktiviteleri plazma membranları ile etkileşimleri içermektedir ve bakteriyel hücreleri öldürme mekanizmaları, CSA'nın plazma membranına enjekte edilmesinden sonra membran depolarizasyonuna yol açan membran organizasyonlarındaki değişikliklerle ilgilidir^(11,12).

4- CSA'ların in vitro etki spektrumu

CSA'lar başta Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler olmak üzere mantarlara, parazitlere ve virüslere etki gösteren geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlardır. Literatürde başta CSA-13 olmak üzere farklı CSA molekülleri ile yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır, bunlardan en önemlileri Tablo 1'de kısaca özetlenmiştir.

CSA-13, en sık kullanılan ve başta Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler olmak üzere^(1,2,5,26) virüsler⁽²⁰⁾, protozoonlar^(24,36,37), mantarlar^(3,42) gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili prototip bir moleküldür. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda CSA-13 molekülünün tek başına yada kombine halde kullanımının dirençli *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi çeşitli klinik suşlar üzerinde etkili olduğu saptanmıştır^(1-3,5,6). Daha önce grubumuzun yapmış olduğu çeşitli çalışmalarda, CSA-13'ün tek başına ve kliniklerde yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklerle oluşturduğu kombinasyon halindeki etkileri *A.baumannii* suşlarına ve klinikte kullanılan bazı antifungallerle birlikte oluşturduğu kombinasyon halindeki etkileri *Candida albicans* suşlarına karşı da araştırılmıştır^(1,3). Aynı zamanda CSA-13'ün anaerobik bir bakteri olan *Streptococcus mutans* ve zorunlu anaerob bakteriler olan *Porphyromonas spp.*'ye karşı etkili olduğu ve böylelikle oral mikrobiyal hastalıkların, diş çürümesi ve periyodontit tedavisinde kullanılabilirliği saptanmıştır⁽²¹⁾. Son çalışmalar CSA-

13'ün, klaritromisin yada metronidazol dirençli *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının tedavisinde de kullanılabilirdiğini göstermektedir⁽²⁵⁾. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda CSA-13'ün lineer peptid olan LL-37 ve WLBU2'den farklı olarak, düşük pH'da pepsin varlığında preinkübasyona konulması gibi yaratılan uygunsuz koşullarda bile güçlü bakterisidal etki gösterebildiği anlaşılmıştır. Bir diğer araştırmada, "vaccinia" virüsün etken olduğu ve bulaş sonrasında bireylerde atopik dermatitin geliştiği dissemine viral cilt infeksiyonuna neden olan egzama vaksinatam üzerine yapılmış ve CSA-13'ün antiviral aktivitesi olduğu da saptanmıştır. CSA-13'ün hedeflenen bölgeye ulaşabilmesi ve direkt "vaccinia" virüsü inaktive etmesi, bu ajanın etkili antiviral özellikte olduğunu göstermektedir⁽²⁰⁾.

Prototip molekül olan CSA-13, planktonik bakterilere karşı gösterdiği bakterisidal etkinliğin yanı sıra, aynı zamanda planktonik bakterilere karşı gereken bakterisidal dozdan biraz daha yüksek konsantrasyonlarda bakteriyel biyofilmleri parçalamaktadır⁽³¹⁻³³⁾. Bizim grubumuzun da yapmış olduğu bir çalışmada CSA'lardan özellikle CSA-131 ve CSA-138 moleküllerinin *P.aeruginosa*'nın etken olduğu biyofilm infeksiyonlarının tedavisinde kolistin kadar etkili olabilecek ve gerekli çalışmalar yapıldıktan sonra tedavide kullanılacak iyi birer aday molekül oldukları tespit edilmiştir⁽⁴³⁾.

Serageninlerin sahip olduğu antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparazitik, antibiyofilm etkilerinin yanı sıra, bu moleküller aynı zamanda antikanser etkide gösterebilmektedir. Yakın zamanda yapılan hücre kültürü modellerinde, CSA-13'ün, kolon kanseri hücresi çoğalmasını baskıladığı ve apoptozisi arttırdığı saptanmış ve hücre döngüsünün G1/S fazında p-53'den bağımsız yolağı etkilediğini göstermiştir. Bu membran geçirgenlik özelliği CSA-13'ün hem antikanser hem de antimikrobiyal etkisini açıklayan ortak mekanizmadır^(23,34). Bucki ve ark.'nın⁽⁴⁾ 2015 yılında yayımladığı bir çalışmada ise, CSA-13'ün solunum yolu epitelinin model olarak kullanıldığı hücre kültürü çalışmalarında ve fare peritonel infeksiyon modelinde güçlü bakterisidal ve aynı zamanda antiinflamatuar etki gösterdiği belirtilmiştir.

Tüm bu çalışmalara ek olarak, LL-37 ve

bunun sentetik analogu olan CSA-13 kullanılarak antimikrobiyal etki gösteren nanopartiküller sentezlenmiştir. Manyetik yüzeylere bağlanarak oluşturulan bu nanopartiküller hem teşhis hem de tedavi için kullanılacak multifonksiyonel formlardır^(19,35).

Serageninlerin antibakteriyel etkide doğal immün fonksiyona sahip hidrojel kontakt lensler⁽¹⁷⁾ yada perioperatif cihazla ilişkili infeksiyonlarda kullanılan polimerik kaplı formlar⁽⁴⁰⁾ gibi farklı uygulama alanları bulunmaktadır.

5- CSA'ların dış membran geçirgenlik özellikleri

Gram negatif bakterilerin dış membran yapısı hidrofobik moleküller için etkili bir bariyer görevi taşımaktadır. Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili birçok antibiyotik, Gram negatif mikroorganizmalara karşı daha az etkilidir. Geçirgen dış membran bariyeri, dış membran yapısında bulunan lipit A ve iki değerli katyonların (magnezyum ve/veya kalsiyum) çapraz bağlanması ile oluşur. CSA'lar, lipit A yada iki değerli katyon yapısına bağlanarak dış membran yapısını bozarlar, geçirgenliğin artmasına ve bakterileri hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirirler. Örneğin, katyon bağlayıcı olan EDTA milimolar seviyelerinde yüksek konsantrasyonda kullanıldığında Gram negatif bakterileri hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirir⁽⁴⁴⁾. Polimiksin B'nin moleküler yapısı değiştiği zaman non-peptid yapıya dönüşür⁽⁴⁵⁾ ve düşük konsantrasyonda kullanıldıklarında (mikromolar) Gram negatif bakterilerde bulunan lipit A yapısına bağlanamazlar ve duyarlı hale gelmezler ve aynı zamanda tek başlarına bakterisidal özelliklerini kaybederler.

CSA molekülleri, dış membran geçirgenliğini sağlayan birçok özelliğe sahiptir. Bazı durumlarda antibiyotiğin bakterisidal yani öldürücü etkisi o kadar öne çıkmıştır ki, bu antibiyotiğin geçirgenlik yani non-letal aktivitesi gözlenememektedir. Örnek olarak CSA-3'ün, Gram negatif bakterilere karşı MİK değeri 2-3 µg/ml iken ve hidrofobik antibiyotiklerle kombinasyonu sonucu elde edilen Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) indeksi oldukça yüksektir (0.5 µg/ml). Ancak CSA-2, Gram negatif bakterilere karşı daha az

Tablo 1. Literatürde çeşitli cerageninler ile ilgili olan çalışmalar.

Kaynak	Çalışmanın kapsamı	Metod	Sonuç
Polat ZA. ve ark. Türkiye, 2016 ⁽⁵⁶⁾	Cerageninlerin <i>Trichomonas vaginalis</i> 'e karşı in vitro etkileri	İn vitro yöntemler kullanılmıştır	CSA-13, CSA-131 ve CSA-138 T. vaginalis enfeksiyonlarında etkili ajanlar arasındadır.
Bucki R. ve ark. ABD, 2015 ⁽⁴⁾	CSA-13'ün fare peritoneal infeksiyon modellerinde ve hücre kültüründe bakterisidal aktivitesi	İn vitro, in vivo yöntemler kullanılmıştır	Mukoza yüzeyde CSA-13'ün sinerjist etki gösterdiği ve infekte olmuş abdominal boşlukta etkisini devam ettirebildiği için yeni antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.
Niemirówicz K. ve ark. Polonya 2015 ⁽⁵⁵⁾	Kolon kanser hücreleri üzerinde CSA-13'ün apoptozis, canlılık ve antikanser özelliklerinin incelenmesi	Nanosistem yöntemi ile gümüşle kaplanan CSA-13, LL-37 antimikrobiyal ajanların in vivo yöntemlerle karşılaştırılması	CSA-13 molekülünün apoptozisi fark edilebilir şekilde azaltması ve LL-37 peptidinin etkisiyle karşılaştırıldığında umut verici olacağı açıklanmıştır.
Niemirówicz K. ve ark. Polonya 2015 ⁽⁵⁴⁾	Nanosistem yöntemi ile kaplanan manyetik CSA-13 molekülünün antimikrobiyal etkisi, biyoyumluluğu, hemolitik aktivitesi ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi	Transmisyon elektron mikroskobu, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), differansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA)	Güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu, farklı vücut sıvılarında biyofilm oluşumunu engellediği, vücut içerisinde etkisini koruduğu ve düşük hemolitik aktivitesinin olduğu açıklanmıştır.
Hoppens MA. ve ark. 2014, ABD ⁽¹⁹⁾	Nanosistem yöntemiyle gümüş kaplanan CSA-13 ve katyonik steroid moleküllerinin Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı in vitro ve hemolitik etkilerinin araştırılması	Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılımı (DSL), zeta potansiyel, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, "electrospray" uçuş zamanı kütle spektrometresi (HPLC-ESI-TOF-MS) yöntemlerini kullanarak MİK, MBK, zamana bağlı öldürme ve hemolitik aktivitesinin araştırılması	CSA-13 ve CSA-124 molekülünün etkili bir ajan olduğu açıklanmıştır
Bozkurt-Güzel Ç. ve ark. Türkiye 2014 ⁽³⁾	<i>C.albicans</i> suşuna karşı CSA moleküllerinin in vitro etkisinin araştırılması	İn vitro yöntemler kullanılmıştır	CSA moleküllerinin etkili bir antifungal ajan olabileceği açıklanmıştır
Hoppens MA. ve ark. ABD 2014 ⁽¹⁸⁾	Nanosistem yöntemi ile magnetik gümüş kaplanan CSA-124 molekülünün antimikrobiyal etkisinin araştırılması	<i>S.aureus</i> ve <i>E.coli</i> suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır	CSA moleküllerinin yeni antimikrobiyal ajan olarak kullanıma girebileceği aktarılmıştır
Bozkurt-Guzel C. ve ark. Türkiye 2014 ⁽¹⁾	Karbapenem dirençli <i>A.baumannii</i> suşlarına karşı CSA-13 molekülünün in vitro etkisi	MİK, MBK ve çeşitli antibiyotikler kombinasyon sonuçları incelenmiştir	CSA-13, klinikte kullanılan antibiyotiklerle sinerjist etki gösterdiği ve etkili bir ajan olabileceği açıklanmıştır.
Gu X. ve ark. ABD 2013 ⁽¹⁷⁾	Hidrojel kontakt lenslerde infekte olabilen <i>S.aureus</i> ve <i>Paeruginosa</i> suşlarına karşı çeşitli CSA moleküllerinin etkisinin incelenmesi	CSA-138, CSA-136, CSA-134 ve CSA-120 moleküllerinin MİK, MBK sonuçları ve biyofilm oluşumuna etkisinin incelenmesi	Farklı konsantrasyonlarda <i>S.aureus</i> suşunun biyofilm oluşumunu inhibe etmiş yada azaltmış, <i>Paeruginosa</i> kolonizasyonunu engellediği ve CSA-138 molekülünün abiyotik ortamlarda doğal bağışıklık etkisi gösterdiği açıklanmıştır
Williams DL. ve ark. ABD 2013 ⁽⁴⁶⁾	İmplant ilişkili infeksiyonlarda biyofilm oluşumunun in vitro incelenmesi	İn vitro yöntemlerle CSA-13 molekülünün biyofilm oluşumuna etkisi	CSA-13 molekülü PDMS molekülü ile aynı ortamda kullanıldığı zaman etkisinin stabil olduğu ve biyofilm oluşumu tedavisinde kullanılabilirliği belirtilmiştir
Sinclair KD. ve ark. ABD 2013 ⁽⁴⁰⁾	Ameliyat cihazlarıyla ilişkili infeksiyonların engellenmesinde CSA-13 molekülünün in vivo etkisi	12 tane iskelet yapısı uygun kuzu, dört gruba ayrılmış ve metisilin dirençli <i>S. aureus</i> enjekte edilmiştir	İskelet yapısında daha önceden CSA-13 molekülüyle kaplı olan grupta 12 hafta sonunda infeksiyon gözlenmemiş, cihazlarla bağlantılı infeksiyon tedavilerinde CSA moleküllerinin kullanılabilirliği açıklanmıştır
Nagant C. ve ark. ABD 2012 ⁽³³⁾	<i>Paeruginosa</i> suşuna karşı bakterisidal etkisini engellemeyen CSA-13 molekülünün insan umbilikal endotel hücrelerinde toksisite etkisinin araştırılması	MTT test yöntemi kullanılmıştır	Pluronic asit F-127, CSA-13 molekülün bakterisidal etkisini engellemeyen mitokondri hasarını önlediği ve toksisiteyi azalttığı aktarılmıştır
Leszczynska K. ve ark. Polonya 2012 ⁽²⁶⁾	LL-37, CSA-13, CSA-90 ve CSA-92 moleküllerinin oral ve üst solunum yolu infeksiyonları tedavisinde antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi	İn vitro yöntemler kullanılmıştır	CSA moleküllerinin potansiyel yeni antimikrobiyal ajan olabileceği sonucu aktarılmıştır
Bozkurt-Guzel C. ve ark. Türkiye 2011 ⁽²⁾	Kistik fibroz hastalarından izole edilen <i>P.aeruginosa</i> suşuna karşı CSA-13 molekülünün in vitro aktivitesinin araştırılması	İn vitro yöntemler kullanılarak MİK, MBK ve zamana bağlı öldürme eğrileri çalışılmıştır	CSA-13 molekülünün etkili bir ajan olduğu ve ikili, üçlü kombinasyonlarda sinerjist etki gösterdiği belirtilmiştir
Leszczynska K. ve ark. Polonya 2011 ⁽²⁷⁾	Pluronic asit varlığında CSA-13 molekülünün topikal infeksiyonlara karşı in vitro etkisi ve hemolitik aktivitesinin araştırılması	MİK, MBK ve zamana bağlı öldürme in vitro yöntemlerle çalışılmış, eritrosit hücrelerinin hemolitik aktivitesi incelenmiştir	Pluronic F-127 asit varlığında CSA-13 molekülü bakterisidal ve güçlü hemolitik etki göstermiş olduğu açıklanmış olup topikal infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirliği belirtilmiştir
Lara D. ve ark. ABD 2010 ⁽²⁴⁾	CSA moleküllerinin antitripanozomid etkisinin araştırılması	İn vitro yöntemler kullanılmıştır	CSA-8, CSA-13 ve CSA-54 moleküllerinin parazitlere etkili olduğu açıklanmıştır
Howell MD. ve ark. ABD 2009 ⁽²⁰⁾	CSA moleküllerinin antiviral etkisinin araştırılması	Elektron mikroskobu, PCR ve in vitro yöntemler kullanılmıştır	CSA-13 molekülünün iyi bir antiviral ajan olarak kullanılabilirliği saptanmıştır
Polat ZA. ve ark. Türkiye 2009 ⁽³⁷⁾	CSA moleküllerinin antiprotozoan etkisinin araştırılması	<i>Acanthamoeba castellanii</i> protozoonuna karşı CSA-13 molekülünün in vitro yöntemlerle antimikrobiyal aktivitesi ve fare bağ doku fibroblast hücre dizisinde sitotoksikite etkisinin araştırılması	CSA-13 molekülünün amebosidal etki gösterdiği ve konsantrasyon farkına göre toksik etki göstermediği saptanmıştır
Isogai E. ve ark. Japonya 2009 ⁽²¹⁾	CSA-13 molekülünün oral mikrobiyotada bulunan patojenlere karşı antimikrobiyal etkisinin araştırılması	<i>S.mutans</i> ve <i>Porphyromonas</i> türlerine karşı CSA moleküllerinin in vitro etkisinin araştırılması	CSA-13 molekülünün kariyojenik ve periodontopatik bakterilere karşı etkili olduğu ve yeni ajan olarak kullanılabilirliği açıklanmıştır
Chin JN. ve ark. ABD 2007 ⁽⁶⁾	Çoklu ilaç direnci gösteren <i>Paeruginosa</i> suşuna karşı antipseudomonal aktivitenin araştırılması	MİK, MBK ve zamana bağlı öldürme yöntemiyle antimikrobiyal etki çalışılmıştır	CSA-13 molekülünün çoklu ilaç direnci gösteren <i>P.aeruginosa</i> suşuna karşı etkili bir ajan olabileceği açıklanmıştır
Chin JN. ve ark. ABD 2007 ⁽⁶⁾	Glikopeptid dirençli <i>S.aureus</i> suşuna karşı çeşitli CSA moleküllerinin etkisinin araştırılması	MİK, MBK ve zamana bağlı öldürme yöntemleri ve post antibiyotik etki çalışılmıştır	CSA moleküllerinin dirençli <i>S.aureus</i> suşlarına karşı etkili bir ajan olduğu açıklanmıştır

etkili olan ve MİK değeri CSA-3'e göre daha yüksek olan fakat lipit A yapısına bağlanabilen ve düşük FİK değeri ile dış membran yapısının geçirgenliğini etkileyebilen moleküldür (Tablo 2). Bir seri CSA üzerinde yapılan çalışmalar, çeşitli uzunluklardaki hidrofobik zincirlerin C24'e bağlanması, hidrofobik zincirin bakterisidal etki için gerekli olduğunu ancak dış membran geçirgenliği için çok fazla önemli olmadığını açığa çıkartmıştır^(28,29). Hidrofobik zincirin CSA'nın dış membrandan sitoplazmik membrana daha kolay geçişini sağladığını ve hücre ölümüne neden olduğu öne sürülmüştür. Hidrofobik zincirin CSA'nın dış membrandan sitoplazmik membrana daha kolay geçişini sağladığı ve hücre ölümüne neden olduğu öne sürülmüştür. Skualamin türevleri ile ilgili olarak, sadece CSA-6 Gram negatif bakterilerin hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlılığı test edilmiş ve sonucunda CSA-6'nın aktif bir geçirgen olduğu fakat CSA-2 kadar etkili olmadığı anlaşılmıştır⁽²²⁾ (Tablo 2).

CSA'ların Gram negatif bakterilerin dış membranından geçebilme yetenekleri bu mikroorganizmaları tıpkı Gram pozitif bakteriler gibi hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirmektedir. Sonuç olarak, CSA'lar, gün geçtikçe artan antibiyotik savaşında Gram negatif bakteri infeksiyonlarına karşı iyi bir ajan olduğunu kanıtlayabilmektedir.

6- CSA'ların bakterisidal ve bakteriyostatik özellikleri

CSA'lar çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı iki farklı mekanizmada etki göstermektedir. Bunlardan birincisi olan letal aktivite antimikrobiyal etki MİK sonuçlarına göre belirlenen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile değerlendirilmektedir. Diğer etki mekanizması olan non-letal aktivite ise Gram negatif bakterilerde dış membran geçirgenliğini sağlayarak etki göstermektedir. Bazı CSA'lar Gram negatif bakterilere karşı güçlü bakterisidal etki göstermezler ancak dış membranı geçemeyen hidrofobik antibiyotiklerle birlikte kullanıldıklarında bu antibiyotiklere karşı bakterileri duyarlı hale getirme özelliği taşırlar

Tablo 2. CSA'ların hidrofobik antibiyotiklerle kombinasyon halinde oluşturdukları FİK değerleri^(22,30).

Moleküller	Gram negatif bakteriler		
	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853	K.pneumoniae ATCC 13883
Rifampisin			
CSA-2	0.085	0.083	0.030
CSA-6	0.16	0.26	0.063
Eritromisin			
CSA-2	0.074	<0.13	0.035
Novobiyosin			
CSA-2	0.033	<0.26	0.029

*P.aeruginosa için eritromisin ve novobiyosinin MİK değerleri >100 µg ml⁻¹

(Tablo 2). Bu iki yapısal özellik aynı zamanda Polimiksin B ve türevlerinde de görülmektedir. Bu moleküllerin bakterileri antibiyotiklere karşı duyarlı yapabilme özellikleri bakterilerin, FİK indeksine göre değerlendirilmektedir. Hidrofobik yapıda olan antibiyotikler genellikle dış membran geçirgenliğini arttıran eritromisin, rifampisin, fusidik asit ve novobiyosin gibi antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır. CSA'lar membran-aktif yapılar oldukları için onların potansiyel klinik faydalarını değerlendirmedeki temel kriter CSA'ların membran seçiciliğidir (bakınız bölüm 7). Membran-aktif antibiyotiklerin kullanımındaki en büyük engel, bu antibiyotiklerin ökaryotik membran yapısını bozabilme eğilimine sahip olmalarıdır. Yüksek MHK değeri ve düşük MİK değeri membran geçirgenliğinin artması demektir⁽³⁹⁾.

Birçok CSA'nın geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu saptanmıştır. Örneğin hidrofobik bir yan zincire sahip olan CSA'lardan olan CSA-3, Gram negatif bakterilere karşı düşük konsantrasyonda en az polimiksin B kadar bakterisidal etki göstermekle birlikte, aynı zamanda Gram pozitif bakterilere karşı daha çok etkilidir (Tablo 3). Şaşırtıcı olarak, CSA-2 ve CSA-3'ün antimikrobiyal etkileri karşılaştırıldığında, CSA-2 Gram negatif bakterilere karşı daha az etkiliyken, Gram pozitif bakterilere karşı etkisi neredeyse CSA-3 ile aynıdır. Bu sonuç bize CSA'ların dış membrandan geçebilmesi için hidrofobik zincire ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Gram negatif bakterilerde, CSA-2 sitoplazmik membrana ulaşamazken, Gram pozitif bakterilerde bu şekilde bir bariyer olmamasından

Tablo 3. Bazı CSA'ların ve Polimiksin B'nin MİK, MBK ve MHK değerleri ^{(8,22,30)*}.

Molekül	MİK (MBK) ve MHK sonuçları (µg/ml)						MHK sonuçları
	Gram negatif bakteriler			Gram pozitif bakteriler			
	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853	K.pneumoniae ATCC 13883	E.faecalis ATCC29212	S.aureus ATCC 25923	S.pyogenes ATCC 19615	
Polimiksin B	1.8 (1.8)	0.20 (3.9)	5.3 (6.8)	40 (>100)	26 (>100)	19	-
CSA-2	36 (40)	21 (36)	47 (50)	3.3 (19)	2.0 (9.2)	4.2 (5.8)	100
CSA-3	3.0 (3.0)	2.0 (3.2)	2.6 (6.7)	3.1 (5.5)	0.40 (2.0)	2.3 (2.9)	29
CSA-4	7.3	-	-	-	2.0	1.6	>200
Skualamin	1-2	4-8	-	1-2	1-2	-	-
CSA-5	12.5	1.56	-	-	3.13	-	100
CSA-6	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56	0.78	12.5

*verilmeyen MBK değerleri çalışılmamış
(-) belirlenmemiş

dolayı CSA-3 ile aynı aktivite göstermektedir⁽¹²⁾.

MBK değerlerinden de anlaşıldığı gibi, CSA'lar sadece bakterilerin üremesini engellemekle kalmaz aynı zamanda bakterilere karşı öldürücü etkidedir. CSA-2 ve CSA-3'ün MİK ve MBK değerleri incelediği zaman şaşırtıcı bir şekilde benzer çıktığı görülmüştür. Bu da bize, CSA'ların antimikrobiyal aktivite için gerekli eşik değer konsantrasyonda kullanılmasının aynı zamanda hücre ölümüne de sebep olabileceğini göstermektedir. Bu özellik bize CSA'ların etki mekanizmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir⁽³⁹⁾.

Prokaryotik membranların lipit yapısının anyonik, ökaryotik membranların ise dipolar özellikte olmasından kaynaklanan yük farklılığı hücre geçirgenliğinde rol oynamaktadır. C24 uzantısı poliaminle birlikte hazırlanan CSA-4, ökaryotik membranla daha az etkileşime girerken, antimikrobiyal aktivitesini de koruduğu tahmin edilmektedir⁽⁹⁾. CSA-4 hidrofobik zinciri olmamasına rağmen Gram negatiflere karşı bir dereceye kadar antibakteriyel etki göstermekte olup Gram pozitiflere karşı oldukça etkilidirler. Aynı zamanda 200 µg/ml konsantrasyonun altında kullanıldığı zaman ökaryotik membran yapısını bozmamaktadır.

Skualaminlerin ilk olarak Gram pozitif ve Gram negatiflere karşı düşük MİK değerlerinde geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu açıklanmıştır⁽²²⁾. Fakat skualaminlerin hazırlanmasının zor olması Regen ve ark.'nın bunların türevlerini hazırlamaya teşvik etmiştir^(7,22). Bu moleküller yapısal olarak skualaminlere benzer

olup sadece aminoasit dizilimleri farklı olmasına rağmen aynı antibakteriyel etkiye sahiptirler (Tablo 2). Ayrıca, zamana bağlı öldürme çalışmalarını bu moleküllerin iyi bir bakterisidal etkiye sahip olduğunu ve ikinci saatin sonunda fark edilebilir derecede bakteri sayısının azaldığını göstermiştir.

7- CSA'ların hemolitik özellikleri

CSA'lar hücre geçirgenliğini arttıran membran-aktif moleküllerdir. Membran-aktif antibiyotiklerin kullanımındaki en büyük engel, bu antibiyotiklerin ökaryotik membran yapısını bozabilme eğilimine sahip olmalarıdır. Bu aktivite, minimum hemolitik konsantrasyon (MHK) değerindeki eritrosit miktarının hesaplanması ile değerlendirilmektedir. Membran geçirgenlik özelliği, MİK ve MHK değerlerinin karşılaştırılması ile saptanabilmektedir. Yüksek MHK değeri ve düşük MİK değeri membran geçirgenliğinin artması demektir⁽³⁹⁾.

Yapılan çalışmalar CSA'ların bakteri membranına zarar verdiğini gösterirken aynı zamanda "CSA'lar konak hücreye zarar vermeden mi prokaryotik hücrelere etki ediyor?" sorusunu akla getirmektedir. Bu soruya cevap olarak bazı CSA'ların iyi birer membran-aktif molekülken, bazılarının ise hem prokaryot hem de ökaryot membran yapılarını bozabildiği bilinmektedir. Tablo 3'te verilmiş olan MHK değerleri incelendiği zaman, CSA-3'ün yapısında bulunan hidrofobik zincirden dolayı CSA-2'den daha düşük MHK değerine sahip olduğu ve CSA-4'te C24'e eklenen katyonik zincirin hücre geçirgen-

liğini sağladığı fark edilmiştir. CSA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, CSA-4'ün birçok bakteride düşük MİK değerine sahipken hemolitik aktivitenin 200 µg/ml konsantrasyonunu geçmediği bilgisine ulaşılmıştır. Skualamin türevleri için MHK değeri karşılaştırıldığında ise antimikrobiyal aktivite ile paralel olduğu; güçlü bakterisidal moleküllerin aynı zamanda güçlü hemolitik etkide olduğu anlaşılmıştır⁽³⁹⁾.

8- CSA'ların toksik özellikleri

Birçok katyonik amfililik antimikrobiyal-ler, memeli hücrelerinden ziyade bakterilere karşı daha çok toksik etki gösterirler. Bu düşüncüyü destekleyen en büyük faktörün anyonik bakteri yüzeyinin katyonik amfiliklere yüksek bağlanma afinitesi olduğu düşünülmektedir. Tablo 4 incelendiği zaman CSA'ların hem birçok bakteri türüne karşı etkili olduğu hem de üç farklı CSA molekülünün *Proteus mirabilis*'e karşı yüksek MİK değerlerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. *P.mirabilis*'in CSA'lara karşı dirençli olmasının nedenleri arasında Gram negatif bakterilerin dış membranındaki negatif yüklerin CSA'lara bağlanması olarak ifade edilmektedir. Bubize, CSA'ların dış membran yapısında bulunan ve lipit A yapısındaki disakkarite bağlanabildiğini göstermektedir⁽⁹⁾. Ayrıca, CSA-13 lipopolisakkarit nükleer faktörün nükleusa translokasyonuna engel olarak, lipopolisakkaritlerin neden olduğu proinflatuvar kaynaklı sepsislere karşı da etkili olabilmektedir. Yapılan çalışmalar CSA'ların Gram pozitif bakterilere karşı

daha çok etkili olduğunu göstermiştir. Fakat bunun nedeni arasında sadece Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasındaki hücre duvarı farklılığı yer almamaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalardan birinde, mutant form olan *E.coli* PE sentezleyemezken hücre duvarına sahip olup, vahşi tip *E.coli*'ye göre CSA-8'e karşı daha duyarlı olduğu saptanmıştır⁽¹²⁾. Diğer bir çalışmada ise, Gram pozitif bakterilere göre daha çok PE bulunduran ve dış membranı olmayan *Bacillus anthracis*'in CSA'lara karşı en az Gram negatifler kadar dirençli olduğu bildirilmektedir (Tablo 4).

Bakteri yapısında yüksek miktarda PE bulunması demek anyonik lipit miktarının azalacağı anlamına gelmektedir. Bu yüzden *B.anthraxis*'in CSA'lara karşı direnç göstermesinin direkt düşük anyonik lipit miktarından ziyade PE yapısının bulunmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Fakat daha fazla anyonik lipit ve daha az PE içeren mutant *E.coli*'nin CSA'lara karşı daha duyarlı olması bu açıklamanın daha düşük bir ihtimal olduğunu düşündürmektedir. *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pyogenes*'in anyonik lipit yapıları birbirinden farklı ve doğal anyonik lipitlerden farklı olarak fosfatidilgliserol ve kardiyolipin içermektedir, ancak bu iki bakteri türüne karşı CSA'ların MİK değerlerinin aynı olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

Serageninlerin, bazı moleküler ve çeşitli toksisite özelliklerini anlamak için membran ile olan ilişkisi incelenmiştir. CSA'ların nötr pH'da elektriksel yükü ve kolik aside eklenmiş olan

Tablo 4. CSA'ların çeşitli bakteri türlerindeki MİK değerleri (µg/ml)⁽⁶⁾ *.

Mikroorganizmalar	% membran fosfolipit miktarı			MİK değerleri		
	PE	PG	CL	CSA-13	CSA-54	CSA-8
Gram negatif bakteriler						
<i>Proteus mirabilis</i>	80	10	5	16	500	500
<i>Escherichia coli</i>	80	15	-	3	7	36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	21	11	2	-	20
Gram pozitif bakteriler						
<i>Bacillus anthracis</i>	43	40	17	2.5	-	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	58	42	0.4	2	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	-	Ana bileşen	0.5	0.5	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	12	70	4	0.5	1	0.5

(-) belirlenmemiş

PE: fosfatidiletanolamin; PG: fosfatidilgliserol; CL: kardiyolipin

katyonik grubun CSA'lara amfifilik özellik kazandırdığı ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak yüksek pozitif değere sahip olmanın iyi bir antimikrobiyal ajan özellikte olacağı anlamına gelmemektedir. Örnek olarak, CSA-54 ve CSA-8 *E.coli* hariç diğer bütün bakterilere karşı aynı MİK değerine sahipken, yük değerleri CSA-54'ün 6 iken CSA-8'in 3'tür (Tablo 3). En etkili prototip molekül olan CSA-13'ün yükü 4 iken daha az etkili olan CSA-8'in 3 olması elektron yükü ile antimikrobiyal aktivitenin bir-biri ile bağlantılı olmadığını göstergesidir. Aynı zamanda, Tablo 3'deki benzer etkiye sahip olan üç CSA molekülünün aktivitesi, belirli bakteri türlerine göre değişmektedir. Örneğin, *P.mirabilis*'e CSA-13 diğer CSA moleküllerine göre 30 kat daha fazla etkiliyken, *S.pyogenes*'e karşı üç molekül de aynı MİK değerine sahiptir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında çeşitli miktarda negatif yüklerin olması kitosanın antimikrobiyal aktivitesini etkilerken aynı zamanda da bazı bakteri suşlarında duyarlılığın artışı da neden olabilmektedir. Bazı seragenin türleri belirli bakteri türlerine karşı etkili olmasına rağmen bu durum bu moleküllerin antimikrobiyal etkisini tamamen açıklamaya yeterli değildir⁽¹²⁾.

9- Sonuç

Membran-aktif antibiyotikler incelendiği zaman CSA'ların diğer antibiyotiklere göre bazı avantajlarının olduğu anlaşılmıştır. CSA'ların sahip olduğu biyolojik özellikleri, üretimin kolay ve ucuz olması, bakterisidal aktivitesi gibi çeşitli özelliklerinin olması ve hemolitik aktivitesinin kontrol edilebilmesi bu molekülleri etkili ve umut vaat eden yeni antimikrobiyal ajan yapmaktadır. Ayrıca membran yapısında büyük değişikliklere yol açmadığı için direnç gelişimine karşı oldukça dayanıklıdır. MİK değerleri incelendiği zaman düşük mikromolar seviyelerde kullanılabileceği, CSA-13'ün geniş etki spektrumuna sahip olduğu ve in vivo kullanımlarda uzun süre etkisini devam ettirebileceği anlaşılmıştır. Ayrıca bu moleküller düşük hemolitik aktiviteye sahip olduğu için negatif yüklü hücrelerle etkileşime girmektedir. CSA'ların in vitro aktiviteleri bilinmekle birlikte in vivo aktiviteleri ve özellikle de toksisite çalışmaları devam etmektedir. AMP'lerle

yapılan klinik çalışmalar incelendiği zaman, CSA'ların topikal uygulamalarda kullanılabileceğini böylelikle toksisitenin daha iyi anlaşılacağı ve sistemik kullanımının önünün açılacağı düşünülmektedir. CSA'ların sahip olduğu yük değerlerinin sistemik kullanımında hücre seçiciliğini etkilediği düşünülmektedir⁽⁸⁾. Son yıllarda yapılan araştırmalarda üzerlerinde yoğun olarak çalışılan ve geleneksel antibiyotiklere dirençli birçok mikroorganizmaya karşı etkili bulunan CSA'lar, dirençli suşların da etken olduğu birçok enfeksiyonun tedavisi için ümit vaat edici etkili ajanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, bu moleküllerin stabilite, immünogenetik, farmakokinetik ve farmakodinamik ve özellikle de klinik etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bozkurt-Guzel C, Savage PB, Akcali A, Ozbek-Celik B. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from bacteremia patients, *Biomed Res Int* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/710273>
2. Bozkurt-Guzel C, Savage PB, Gerceker AA. In vitro activities of the novel ceragenin, CSA-13, alone or in combination with colistin, tobramycin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients, *Chemother* 2011;57(6):505-10. <http://dx.doi.org/10.1159/000335588>
3. Bozkurt-Güzel Ç, Tüysüz M, İnan N, Savage PM. Katyonik steroid antibiyotiklerden olan CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131 ve CSA-138'in, kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* suşlarına karşı antifungal etkilerinin araştırılması, *ANKEM Derg* 2014;28(1):8-13. <http://dx.doi.org/10.5222/ankem.2014.008>
4. Bucki R, Niemirowicz K, Wnorowska U, Byfield FJ. Bactericidal activity of ceragenin CSA-13 in cell culture and an animal model of peritoneal infection, *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(10):6274-82. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00653-15>
5. Chin JN, Jones RN, Sader HS, Savage PB, Rybak

- MJ. Antimicrobial Activities of Ceragenins against Clinical isolates of resistant Staphylococcus aureus, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(4):1268-73.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01325-06>
6. Chin JN, Jones RN, Sader HS, Savage PB, Rybak MJ. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa, including multidrug-resistant P.aeruginosa, *J Antimicrob Chemother* 2008;61(2):365-70.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm457>
 7. Deng G, Dewa T, Regen SL. A synthetic ionophore that recognizes negatively charged phospholipid membranes, *J Am Chem Soc* 1996;118(37): 8975-6.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja961269e>
 8. Ding B, Guan Q, Walsh JP et al. Correlation of the antibacterial activities of cationic peptide antibiotics and cationic steroid antibiotics, *J Med Chem* 2002;45(3):663-9.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm0105070>
 9. Ding B, Yin N, Liu Y et al. Origins of cell selectivity of cationic steroid antibiotics, *J Am Chem Soc* 2004;126(42):13642-8.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja046909p>
 10. Döşler S, Gürler B, Gerçek AA. Geleceğin antibiyotikleri, antimikrobik etkili katyonik peptitler, *ANKEM Derg* 2006;20(1):44-54.
 11. Epanand RF, Pollard JE, Wright JO, Savage PB, Epanand RM. Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins, *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(9): 3708-13.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00380-10>
 12. Epanand RF, Savage PB, Epanand RM. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins), *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(10):2500-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.023>
 13. Epanand RM, Epanand RF, Savage PB. Ceragenins (Cationic Steroid Compounds), a novel class of antimicrobial agents, *Drug News Perspect* 2008; 21(6):307-11.
<http://dx.doi.org/10.1358/dnp.2008.21.6.1246829>
 14. Ganz T, Lehrer RI. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications, *Mol Med Today* 1999;5(7):292-7.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01490-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01490-2)
 15. Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Paggi AM, D'Errico MM, Scalise G. Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Peptides* 2001;21(8):1155-60.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00254-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00254-0)
 16. Giuliani A, Rinaldi AC. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches, *Cell Mol Life Sci* 2011;68(13):2255-66.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0717-3>
 17. Gu X, Jennings JD, Snarr J, Chaudhary V, Pollard JE, Savage PB. Optimization of ceragenins for prevention of bacterial colonization of hydrogel contact lenses, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(9): 6217-23.
<http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-12664>
 18. Hoppens MA, Sylvester CB, Qureshi AT. Ceragenin mediated selectivity of antimicrobial silver nanoparticles, *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;27(16): 13900-8.
<http://dx.doi.org/10.1021/am504640f>
 19. Hoppens MA, Wheeler ZEW, Qureshi AT. Maghemite, silver, ceragenin conjugate particles for selective binding and contrast of bacteria, *J Colloid Interface Sci* 2014;413:167-74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.016>
 20. Howell MD, Streib JE, Kim BE et al. Ceragenins: a class of antiviral compounds to treat orthopox infections, *J Invest Dermatol* 2009;129(11):2668-75.
<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.120>
 21. Isogai E, Isogai H, Takahashi K, Okumura K, Savage PB. Ceragenin CSA-13 exhibits antimicrobial activity against cariogenic and periodontopathic bacteria, *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(2):170-2.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00464.x>
 22. Kikuchi K, Bernard EM, Sadownik A, Regen SL, Armstrong D. Antimicrobial activities of squalamine mimics, *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(7):1433-8.
 23. Kuroda K, Fukuda T, Okumura K et al. Ceragenin CSA-13 induces cell cycle arrest and antiproliferative effects in wild-type and p53 null mutant HCT116 colon cancer cells, *Anticancer Drugs* 2013;24(8):826-34.

- <http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283634dd0>
24. Lara D, Feng Y, Bader J. Anti-trypanosomatid activity of ceragenins, *J Parasitol* 2010;96(3):638-42.
<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2329.1>
25. Leszczyńska K, Namiot A, Fein DE et al. Bactericidal activities of the cationic steroid CSA-13 and the cathelicidin peptide LL-37 against *Helicobacter pylori* in simulated gastric juice, *BMC Microbiol* 2009;(9):187.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-187>
26. Leszczynska K, Namiot D, Byfield FJ. Antibacterial activity of the human host defence peptide LL-37 and selected synthetic cationic lipids against bacteria associated with oral and upper respiratory tract infections, *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(3):610-18.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks434>
27. Leszczynska K, Namiot D, Cruz K. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections, *J Appl Microbiol* 2011;110(1):229-38.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04874.x>
28. Li C, Budge LP, Driscoll CD, Willardson BM, Allman GW, Savage PB. Incremental conversion of outer-membrane permeabilizers into potent antibiotics for Gram-negative bacteria, *J Am Chem Soc* 1999;121:931-40.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja982938m>
29. Li C, Lewis MR, Gilbert AB et al. Antimicrobial activities of amine-and guanidine-functionalized cholic acid derivatives, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(6):1347-9.
30. Moore KS, Wehrli S, Roder H et al. Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark, *Proc Natl Acad Sci* 1993;90(4):1354-8.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.4.1354>
31. Moscoso M, Esteban-Torres M, Menéndez M, García E. In vitro bactericidal and bacteriolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci, *PLoS One* 2014;9(7):e101037.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101037>
32. Nagant C, Pitts B, Stewart PS, Feng Y, Savage PB, Dehaye JP. Study of the effect of antimicrobial peptide mimic, CSA-13, on an established biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiologyopen* 2013;(2):318-25.
<http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.77>
33. Nagant C, Savage PB, Dehaye JP. Effect of pluronic acid F-127 on the toxicity towards eukaryotic cells of CSA-13, a cationic steroid analogue of antimicrobial peptides, *J Appl Microbiol* 2012; 112(6):1173-83.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05297.x>
34. Niemirowicz K, Prokop I, Wilczewska AZ. Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells, *Int J Nanomedicine* 2015;10:3843-53.
<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S76104>
35. Niemirowicz K, Surel U, Wilczewska AZ. Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles, *J Nanobiotechnology* 2015;13:32.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0093-5>
36. Polat ZA, Cetin A, Savage PB. Evaluation of the in vitro activity of ceragenins against *Trichomonas vaginalis*, *Acta Parasitol* 2016;61(2):376-81.
<http://dx.doi.org/10.1515/ap-2016-0049>
37. Polat ZA, Savage PB, Genberg C. In vitro amoebicidal activity of a ceragenin, cationic steroid antibiotic-13, against *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential, *J Ocur Pharmacol Ther* 2011;27(1):1-5.
<http://dx.doi.org/10.1089/jop.2010.0041>
38. Pollard JE, Snarr J, Chaudhary V et al. In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13, *J Antimicrob Chemother* 2012;67(11):2665-72.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks276>
39. Savage PB, Li C, Taotafa U, Ding B, Guan Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics, *FEMS Microbiology Letters* 2002;217(1):1-7.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11448.x>
40. Sinclair KD, Pham TX, Williams DL, Farnsworth RW, Loc-Carrillo CM, Bloebaum RD. Model development for determining the efficacy of a combination coating for the prevention of perioperative device related infections: Pilot study, *J Biomed Mat Res B appl Biomater* 2013;101(7):1143-53.
<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.32924>

41. Surel U, Niemirowicz K, Marzec M, Savage PB, Bucki R. Ceragenins- a new weapon to fight multidrug resistant bacterial infections, *Studia Medyczne* 2014;30(3):207-13.
<http://dx.doi.org/10.5114/ms.2014.45428>
42. Tüysüz M, Birteksöz Tan AS, İnan N, Ötük G. *Candida albicans* biyofilmlerine karşı antifungal-lerin tek başlarına ve tişesiklin ile kombinasyonlarının araştırılması, XII. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri Kitabı, s.133, Poster No:39, İstanbul (2016).
43. Tüysüz M, İnci G, Savage PB, Bozkurt-Güzel Ç. Çeşitli katyonik steroid antibiyotiklerin *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antimikrobiyal etkilerinin ve antibiyofilm aktivitelerinin araştırılması, XII. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri Kitabı, s.90, Poster No:13, İstanbul (2016).
44. Vaara M, Vaara T. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide, *Nature* 1983;303(5917):526-8.
<http://dx.doi.org/10.1038/303526a0>
45. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane, *Microbiol Rev* 1992;56(3):395-411.
46. Williams DL, Sinclair DK, Jeyapalina S, Bloebaum RD. Characterization of a novel active release coating to prevent biofilm implant-related infections, *J Biomed Mat Res B appl Biomater* 2013;101(6):1078-89.
<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.32918>