

## VANKOMİSİN DİRENÇLİ *ENTEROCOCCUS FAECALIS* İZOLATLARI ÜZERİNDE KATYONİK STEROİD ANTİBİYOTİK CSA-44'ÜN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Yamaç TEKİNTAŞ<sup>1</sup>, İsmail ÖZTÜRK<sup>1</sup>, Aybala TEMEL<sup>1</sup>, Süreyya Gül YURTSEVER<sup>2</sup>, Mine HOŞGÖR LİMONCU<sup>3</sup>

Y. Tekintaş: 0000-0001-9437-7527, İ. Öztürk: 0000-0002-2669-3090, A. Temel: 0000-0003-1549-7219,  
S. Gül Yurtsever:0000-0002-4421-230X, M. Hoşgör Limoncu: 0000-0002-4892-8639

<sup>1</sup>İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

<sup>2</sup>İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

### ÖZ

Günümüz kliniklerinde oldukça korkulan bir etken olmaya başlayan *Enterococcus faecalis*, bu özelliklerini gösterdikleri yüksek antibiyotik direncine borçludur. Ağır antibiyotik stresine maruz kalmalarına rağmen bu direnç özellikleri sayesinde yaşamlarına devam ederek sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. Sefalosporinler, penisilinler ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi oldukça sık ve yaygın kullanılan moleküllere karşı doğal ve kazanılmış direnç gösterebilmesine ek olarak glikopeptitlere karşı ortaya çıkan kazanılmış direnç tedaviyi giderek zorlaşmasına neden olmaktadır. Son seçenek olarak kullanılacak vankomisine karşı görülen direncin son yıllarda giderek arttığı rapor edilmiştir. Yaşanan bu krizin aşılmasında antibiyotiklere alternatif olabilecek tüm metotların denenmesi bir zorunluluk haline gelmiştir.

Bu çalışmada, yeni katyonik peptid türevi bir molekül olan CSA-44'ün *E. faecalis* izolatlarına karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları otomatize sistemle belirlenerek EUCAST kriterleri doğrultusunda değerlendirildi. Daha sonra seragenin CSA-44 minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptandı. Molekülün zamana bağlı öldürme kinetikleri tespit edildi. CSA-44'ün antibiyofilm aktivitesi kristal viyole yöntemiyle saptandı. Biyofilme olan etkinlik ayrıca taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) görüntüledi.

CSA-44'ün MİK değerleri 2-4 µg/mL aralığında saptandı. MİK dozları uygulandığında CSA-44'ün bakteri biyofilmlerini izolata bağlı olarak %50'ye varan oranlarda inhibe ettiği belirlendi. Moleküllerin 2MİK ve MİK konsantrasyonlarında uygulandığında 3-6 saat aralığında bakterisidal etkinlik gösterdiği gözlemlendi. Ancak, MİK konsantrasyonlarda inkübasyon uzadığında yeniden bakteri miktarında artış olduğu saptandı. Molekülün bakteriyel biyofilmi inhibe ettiği ve membranda hasara neden olduğu SEM ile görüntüledi.

Katyonik steroid antibiyotiklerin, dirençli *E. faecalis* izolatları üzerinde etkili olabileceği bu çalışma tarafından gösterdiğinden, toksikolojik ve farmakodinamik özellikleri inceleyen yeni çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** antibiyofilm, CSA-44, *Enterococcus faecalis*

### ABSTRACT

#### Investigation of the Antimicrobial and Antibiofilm Activity of the Cationic Steroid Antibiotic CSA-44 on Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates

*Enterococcus faecalis*, which has emerged as a highly feared agent in present day's clinics, possesses these attributes as a result of its high-level antibiotic resistance. Despite being exposed to significant antibiotic stress, they persist in their existence as a result of these resistance characteristics, leading to infections that are challenging to treat. In addition to the ability to display natural and acquired resistance to common and widely used molecules such as cephalosporins, penicillins, and trimethoprim/sulfamethoxazole, the acquired resistance to glycopeptides makes treatment increasingly challenging. In recent years, there has been a gradual increase in the resistance to vancomycin molecules, which can be employed as a last resort. It has become essential to explore all potential alternatives to antibiotics in order to resolve this crisis.

**İletişim adresi:** Yamaç Tekintaş, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR  
e-posta: yamactekintas@yahoo.com

Received/Geliş: 20.08.2024 Accepted/Kabul: 23.12.2024 Published Online/Online Yayın: 31.12.2024

**Atıf/Cite as:** Tekintaş Y, Öztürk İ, Temel A, Yurtsever SG, Hoşgör Limoncu M. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* izolatları üzerinde katyonik steroid antibiyotik CSA-44'ün antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesinin incelenmesi. ANKEM Derg. 2024;38(3):112-121.

*In this study, it was aimed to investigate the antibacterial and antibiofilm effects of CSA-44, a new cationic peptide derivative molecule, against E. faecalis isolates. Antimicrobial susceptibilities of these bacteria were determined with an automated system and evaluated in accordance with EUCAST criteria. Subsequently, minimum inhibitory concentration (MIC) values of ceragenin CSA-44 were determined by broth microdilution method. The time-kill kinetics of the molecule were determined. Antibiofilm activity of CSA-44 was determined by crystal violet method. The antibiofilm activity, was also imaged with scanning electron microscopy (SEM).*

*CSA-44 MIC values were found in the range 2-4 µg/mL. When MIC doses were administered, it was determined that CSA-44 inhibited bacterial biofilms by up to 50% depending on the isolate. The molecules exhibited bactericidal activity during the 3-6-hour period when applied at 2MIC and MIC concentrations. However, at MIC concentrations, the quantity of bacteria increased again as the incubation time prolonged. It was imaged with SEM that the molecule inhibits the bacterial biofilm and causes damage to the membrane.*

*Since this study shows that cationic steroid antibiotics can be effective on resistant E. faecalis isolates, it would be appropriate to conduct new studies examining the toxicological and pharmacodynamic properties.*

**Keywords:** antibiofilm, CSA-44, *Enterococcus faecalis*

## GİRİŞ

İnsan vücudunun farklı bölgelerde mikrobiyotanın bir parçası olarak bulunan *Enterococcus faecalis*, sıklıkla sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon etkeni olarak da karşımıza çıkmaktadır<sup>(4)</sup>. Ağır antibiyotik stresine maruz kalmalarına rağmen dirençli karakterleri sayesinde yaşamlarına devam ederek tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. Sefalosporinler, penisilinler ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi oldukça sık ve yaygın kullanılan moleküllere karşı doğal ve kazanılmış direnç gösterebilmelerine ek olarak; glikopeptidlere karşı kazanılmış direnç göstermeleri, artan mortalite ve morbidite oranlarına neden olmaktadır<sup>(17)</sup>.

*E. faecalis* izolatları pek çok farklı virülans faktörü bulundursa da, en öne çıkan virülans mekanizması biyofilim oluşturma kapasiteleridir. Yapılan çalışmalar ile biyofilim yapısının özellikle persistan enfeksiyonlara sebep olan ve tedavi başarısızlığını beraberinde getiren birincil patojenik faktör olduğu tespit edilmiştir<sup>(30)</sup>. Biyofilim kendilerini polimerik maddeler içerisine gömmüş bakteri topluluklarıdır. Total biyofilim yapısının büyük bir kısmı monosakkaritlerce zengin ekzopolisakkarit (EPS) yapısındadır. Oluşan bu yapı sayesinde bakteriler grup halinde bir yüzeye kuvvetlice tutunma yetisi kazanırlar<sup>(24)</sup>. Polimerik maddeler içerisinde gömülü halde bulunmanın patojenleri, gerek antimikrobiallerin etkilerinden gerekse immün sistem hücrelerinin etkinliğinden koruduğu bilinmektedir<sup>(11)</sup>. Biyofilim oluşumu genel olarak karmaşık ve farklı genlerin kontrolünde ilerleyen bir olgudur. Bununla birlikte biyofilim oluşumundaki ilk ve en kritik basamaklardan birisi, mikroorganizmaların grup halinde harekete geçebilmesidir. Bu durumun yönetilebilmesi için mikroorganizmaların çoğunluğu algılama (ÇA, "Quorum sensing-QS") adı verilen bir sistemi kullandıkları bilinmektedir. Bu sistem aslında küçük ve difüze olabileme yeteneğine sahip moleküllerin, diğer hücreler tarafından algılanması şeklinde özetlenebilir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler farklı ÇA sistemleri ve değişik aracı molekülleri kullandıkları bilinmektedir<sup>(8,28)</sup>.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, doğal antimikrobiyal peptitlerden yeni analogların türetilmesi ve antimikrobiyal etkilerinin araştırılması üzerinde çalışmalar artmaktadır<sup>(25)</sup>. Bu analoglar genellikle aminoasit sekanslarının kullanılması ile tasarlanmaktadır. Katyonik steroid antibiyotik (CSA, seragenin) adı verilen kolik asidin katyonik türevleri olan moleküllerin denenmesi ile antimikrobiyal etkinlikleri oldukları saptanmıştır<sup>(15)</sup>. Bununla birlikte belirli bazı özellikleri diğer moleküllerden daha fazla umut vadetmelerini sağlamaktadır. Katyonik steroid antibiyotiklerin hidrofobik kısımlarının lipid yapıda olması, bu molekülün daha dengeli olarak membranın içine yerleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu durum, moleküle proteolitik enzimlere daha dirençli olma özelliği kazandırmaktadır<sup>(16)</sup>. Bu moleküller, bakterilere karşı etkilerini antimikrobiyal peptidler (AMP) gibi sitoplazmik membran depolarizasyonunu etkileyerek göstermektedir<sup>(6)</sup>.

Katyonik steroid antibiyotik türevlerinin farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde etkinliğini gösteren çalışmalar bulunduğu gibi farklı bazı türler tarafından oluşturulan spor yapılarının da redüklendiği ve spor germinasyonunun da baskılandığı çalışmalar ile ortaya konulmuştur<sup>(3,23)</sup>. Bu veriler doğrultusunda hastane enfeksiyonlarının önemli nedenlerinden birisi olan ve tedavisi gün geçtikçe zorlaşan *E. faecalis*'e karşı katyonik steroid antibiyotiklerin tedavide kullanılabilme potansiyelleri önem kazanmıştır. Bu çalışmada bir katyonik steroid antibiyotik olan CSA-44'ün *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### İzolatlar, Kimyasallar ve Besiyerleri

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri ticari olarak tedarikçilerden temin edildi ve saflaştırma yapılmadan üretici önerileri doğrultusunda kullanıldı (Sigma Aldrich, ABD; Merck, Almanya; Condalab, İspanya; Biolabs, ABD ve Tekkim, Türkiye). Çalışmada etkinliği çalışılacak CSA-44 (Toronto Research Chemicals, Kanada) ticari olarak temin edildi.

Vankomisin dirençli *E. faecalis* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması "Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry" (MALDI-TOF MS) yöntemiyle (VITEK MS, BioMérieux, Fransa)", antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 Compact® (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapıldı. Vankomisin duyarlılık sonuçları "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirildi ve 42 adet vankomisin dirençli izolat çalışmaya alındı<sup>(7)</sup>.

İzole edilen bakteriler içerisinde, antibiyofilm etkinliğinin incelenerek olması nedeniyle, biyofilm oluşturan suşlar temsilci olarak seçildi. Bunun için, çalışmaya dâhil edilen 42 vankomisin dirençli *E. faecalis* izolatında biyofilm oluşumunun belirlenmesi için kristal viyole metodu kullanıldı<sup>(26)</sup>. Yedi izolatta zayıf, 35 izolatta orta düzey biyofilm oluşumu gözlemlendi. Güçlü biyofilm oluşturan izolat saptanmadı. Bu veriler ışığında, orta düzey biyofilm oluşturan ve ölçümlerde en yüksek OD değerlerini gösteren 10 izolat (26, 27, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40 ve 42 numaralı izolatlar) çalışmanın ileri aşamaları için temsilci olarak belirlendi.

Bakteriler çalışılincaya kadar gliserinli buyyonda -80°C'de stoklandı. Kontrol kökeni olarak *E. faecalis* ATCC 29212 çalışmaya dâhil edildi.

### Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bir önceki basamakta saptanan ve çalışmanın ileri aşamaları için seçilen kökenlerin taze kültürleri steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığına ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) ayarlandı. Mikrodilüsyon plağındaki son inokulum konsantrasyonunun standart olabilmesi adına kullanmadan önce bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Besiyeri (MHB) besiyeri ile 1/100 oranında dilüe edildi. Steril mikroplaklardaki kuyucuklara 50 µL MHB dağıtıldı. Yukarıdan başlayarak ilk sıradaki kuyucuklara 256 µg/mL konsantrasyon olacak şekilde madde eklendi ve yan kuyucuklara aynı hacimde aktararak, çift katlı seri dilüsyonları hazırlandı. Son olarak 50 µL bakteri süspansiyonu tüm kuyucuklara ilave edildikten sonra, 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üreme görülmeyen en düşük madde konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edildi. Her mikroplakta, besiyeri ve bakteri üreme kontrollerine yer verildi. Değerlendirme EUCAST kriterlerine uygun olarak yapıldı<sup>(7)</sup>. Deneyler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

### Zamana Bağlı Öldürme Etkinliği

Bir önceki basamakta tespit edilen MİK değerleri üzerinden deneyler gerçekleştirildi. Başlangıç inokulum miktarları  $1 \times 10^5$  CFU/ mL olacak şekilde bakteri süspansiyonları 10'ar mL MHB sıvı besiyeri içerisinde hazırlandı. Moleküllerin MİK konsantrasyonu göz önünde bulundurularak, final konsantrasyonları, 4MİK, 2MİK, MİK, MİK/2 ve MİK/4 olacak şekilde karışımlara eklendi. Bu işlemi takiben 0, 3, 6 ve 24'üncü saatte örnekler alındı ve her bir örnek, petri kabında yapılacak sayımları kolaylaştırabilmek adına dilüe edilerek triptik soya agar (TSA) besiyeri yüzeyine kantitatif ekim gerçekleştirildi. Ekim yapılan petriler 37°C'de bir gece inkübe edildi. Petrilerde sayılan koloniler dilüsyon katsayıları hesaba katılacak şekilde hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı<sup>(9)</sup>.

### Antibiyofilm Etkinliği

İzolatların taze kültürleri hazırlandı. İnkübasyon sonrası 3 mL'lik serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland değerine ayarlandı ve bakteri süspansiyonu elde edildi. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplaka üzerindeki kuyucuklara 155 µl %0.25 glukozlu TSB ve 20 µL 0.5 McFarland değerine ayarlanan bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Son basamakta her bir kuyucuğa 25µL hacimde ve kuyucuklardaki final CSA-44 konsantrasyonu MİK ve MİK/2 olacak şekilde ayarlanmış CSA-44 eklendi. Negatif kontrol için kullanılan kuyucuklara sadece 180 µl %0.25 glukozlu TSB ilave edildi ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan besiyeri mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. 200 µl PBS ile iki kez yıkandı. Mikroplakalar kurutma kâğıdı üzerine ters çevrildi ve kuruması için beklendi. Kuruyan kuyucuklara kalmış olan biyofilmleri sabitlemek için 150 µl metanol eklenerek 20 dakika bekletildi. Daha sonra metanol kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Mikroplakalar ters

çevrilerek kuruması beklendi. Kuyucukların iyice kurduğuna emin olduktan sonra 150 µL %0.1'lik kristal viyole çözeltisi eklendi ve 15 dakika bekletilerek boyanması sağlandı. Süre sonunda kristal viyole çözeltisi mikropipet yardımıyla kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Musluk suyu ile kristal viyole çözeltisinin fazlası giderildi. Durulama suyu renksiz kalana kadar yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkanan mikrolakalar kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek kuruması beklendi. Kuruyan kuyucuklardaki kristal viyoleyi çözebilmek için 150 µL %95'lik etanol eklenerek 30 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki absorbans değerleri 30 dakikanın sonunda mikrolaka okuyucu spektrofotometre (BMG Labtech Clariostar) yardımıyla 570 nm dalga boyunda ölçülüp değerlendirildi. Deney her köken için üç tekrarlı olarak yapıldı<sup>(20)</sup>.

### Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) ile Görüntüleme

CSA-44'ün *E. faecalis* suşlarının üzerindeki aktivitesi temsilci olarak seçilen izolatlarda Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntüledi. Bu amaçla ilk olarak ilgili izolatın TSA'da taze kültürü yapıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrasında buradan alınan taze kolonilerden steril fosfat tamponu (PBS) içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığa sahip bakteri süspansiyonu hazırlandı. SEM çalışmaları için 6 kuyucuklu polistiren, steril, düz tabanlı hücre kültürü plakaları kullanıldı. Her kuyuya 0.13–0.16 mm (Nest, Almanya) kalınlığında on altı milimetre çapında yuvarlak lamel dikkatlice yerleştirildi. Kuyulara 1800µL hacimde %0.25 glukoz ilavesiyle triptik soya buyyonu (TSB) ilave edildi. Daha sonra her kuyuya taze hazırlanmış 200 µL bakteri süspansiyonu ilave edildi. Bileşiğin aktivitesini görselleştirmek için, son CSA-44 konsantrasyonu kuyulara MİK/2 olarak eklendi. Plakalar daha sonra 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, biyofilm oluşturan yüzeyler, ortam kalıntılarını ve biyofilm oluşturmeyen hücreleri uzaklaştırmak için üç kez PBS ile durulandı. Yıkama adımlarından sonra numuneler %2.5 glutaraldehit çözeltisi içeren kuyulara aktarıldı ve biyofilm 2 saat sabitlendi. Glutaraldehiti gidermek için lameller 3 kez PBS ile durulandı. Son olarak, numuneler artan etanol yüzdeleriyle dehidrate edildi (%35, %50, %75, %90, %95 ve %99; her çözeltide 20 dakika boyunca). Tüm lameller 30°C sıcaklıkta 18 saat kurumaya bırakıldı. Kurutma aşamasından sonra, her numune altın püskürtme ile kaplandı (Quorum Q150 Res, İngiltere) ve SEM kullanılarak görüntüledi<sup>(13)</sup>.

### BULGULAR

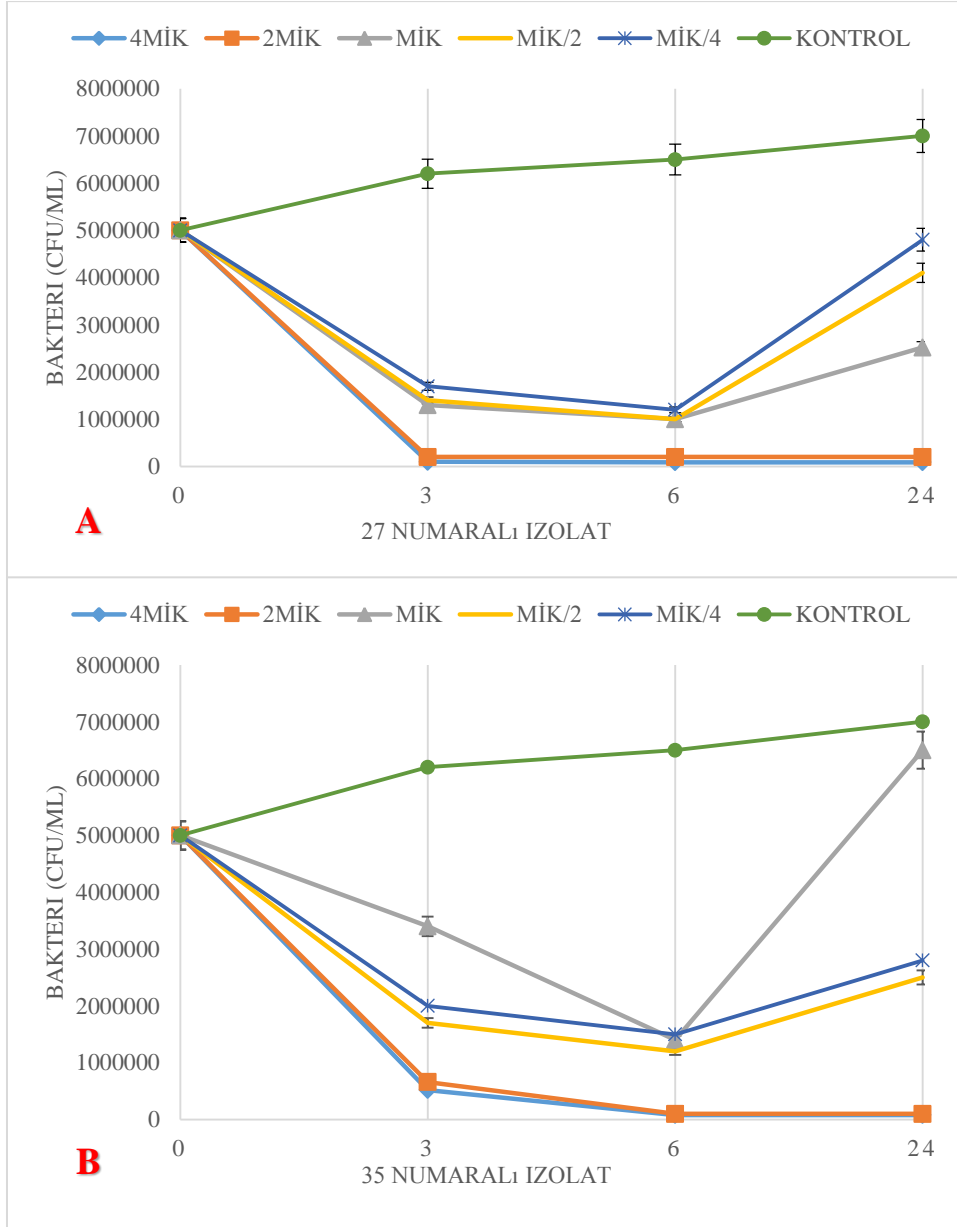
*E. faecalis* izolatlarında CSA-44'ün MİK değerleri 2-4 µg/mL arasında bulunmuştur (MİK<sub>50</sub>= 4 µg/mL). Vankomisin direnç sınır değerinin ≤4 µg/ mL olduğu bilindiğinden test edilen izolatlarda CSA-44'ün etkili doz değerlerinin vankomisine eşit veya daha düşük konsantrasyonda olduğu saptanmıştır. MİK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Test edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarında CSA-44 MİK değerleri

İzolat	CSA-44 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değeri (µg/mL)
#26	4
#27	4
#30	4
#32	4
#34	4
#35	4
#36	4
#38	4
#40	2
#42	2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4

### Zaman bağılı öldürme etkinlikleri

CSA-44'ün çalışmaya dâhil edilen her bir izolat için 4MİK, 2MİK, MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlardaki zamana bağlı öldürme kapasiteleri incelendiğinde, 2MİK ve MİK konsantrasyonlarda 3-6 saatlik zaman aralığında, bakteri sayısında belirgin düşüş ve bakterisidal etkinlik gözlenmiştir (3 log'luk azalma). Bununla birlikte, ilginç bir şekilde, bu etkinliğin sadece 2MİK ve üzeri konsantrasyonlar için devam edebildiği saptanmıştır. Yani izolatlara MİK ve altında kalan konsantrasyonunda CSA-44 uygulandığında, 6 saatten sonra bakteri sayısında artış görülmüştür. Şekil 1'de rastgele seçilmiş iki izolata ait grafikler gösterilmiştir.

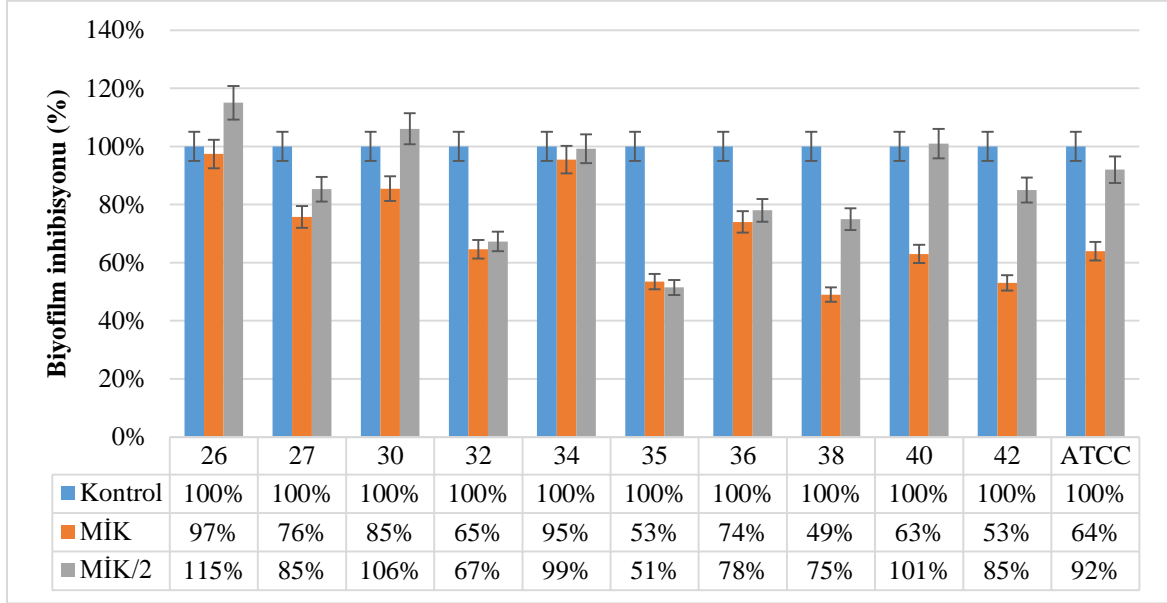


**Şekil 1.** Rastgele seçilen iki *Enterococcus faecalis* izolatında CSA-44'ün zamana bağlı öldürme etkinliği.

A) İzolat 27, B) İzolat 35

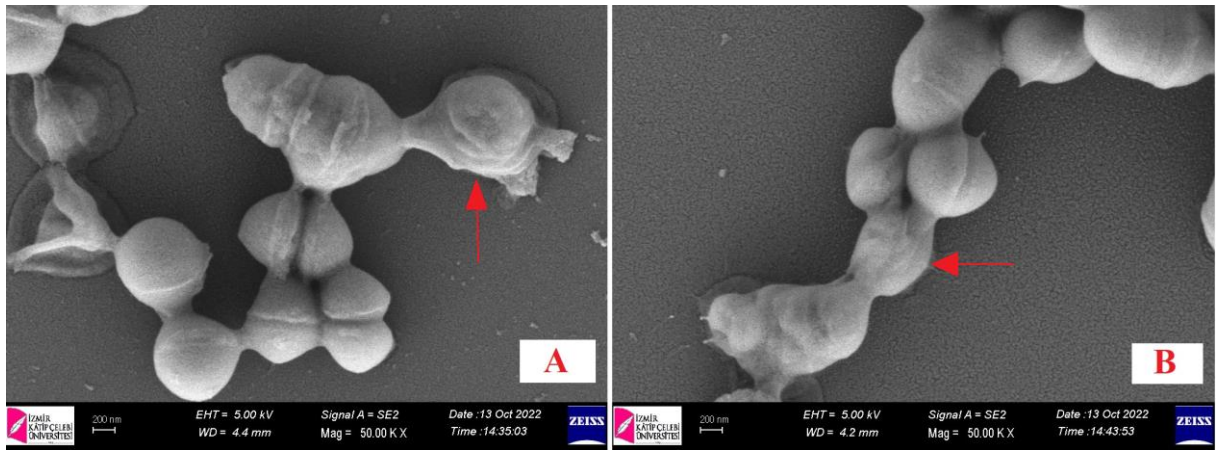
### Antibiyofilim aktiviteleri

CSA-44'ün *E. faecalis*'te izolata bağlı olarak değişen oranlarda biyofilim oluşumunu inhibe ettiği saptanmıştır. İzolatların biyofilim oluşturma yeteneğinde MİK ve genellikle MİK/2 konsantrasyonlarında inhibisyon görülmüş, MİK konsantrasyonunda daha yüksek inhibisyon gözlenmiştir. Bazı izolatlarda (26, 30 ve 40 numaralı izolatlar), MİK/2 dozlarında uygulanan CSA-44'ün biyofilim indüksiyonuna neden olduğu görülmüştür. Molekülün antibiyofilim aktivitesi Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. CSA-44'ün *Enterococcus faecalis* izolatlarında biyofilim oluşumuna etkisi.

SEM ile görüntüleme çalışmalarında CSA-44 antibiyofilim etkinliğine en duyarlı izolatlar olan 35 ve 42 numaralı izolatlar kullanılmış, CSA-44 maruziyeti sonrasında bakterinin dış membranında belirgin deformasyon görüntülenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. CSA-44'ün *E. faecalis* suşlarındaki etkisinin SEM ile görüntülenmesi.

A) İzolat 35, B) İzolat 42

## TARTIŞMA

Enfeksiyonlar yüzyıllardır insanlığın en büyük sağlık problemleri arasında yer almıştır. Antibiyotik çağının başlamasıyla hem yüzbinlerce insanın ölümü engellenmiş, hem de başta cerrahi müdahaleler olmak üzere pek çok farklı tıbbi tekniğin daha güvenli şekilde yapılımlarına olanak sağlanmıştır<sup>(28)</sup>. Ne yazık ki her keşfedilen veya sentezlenen yeni antibiyotik molekülüne karşı direncin da kısa süre içerisinde gözükmesi akılcı antibiyotik kullanım ilkelerinin uygulanması kadar, bakteri eradikasyonu amacıyla bakteriyofajlar, gen susturumu, farklı doğal ve bitkisel ekstreler gibi alternatif metotların önemini artırmaktadır<sup>(1)</sup>.

AMP'ler bu anlamda faydalı bir model olarak öne çıkmaktadır. Bu moleküller, doğada yaygın olarak bulunan ve farklı organizmaların doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan küçük peptid sınıfını oluşturmaktadırlar<sup>(12)</sup>. Çoğu AMP mikrobiyal patojenleri doğrudan öldürme yeteneğine sahipken; diğerleri, konak savunma sistemlerini modüle ederek dolaylı olarak hareket ederler. AMP'lerin bakteri, mantar, parazit ve virüslere karşı inhibe edici etkileri farklı çalışmalarla gösterilmiş olsa da; proteazlara duyarlılıkları, yüksek maliyetleri ve stabilite sorunları gibi temel dezavantajlar, yakın zamanda klinik olarak kullanıma girmelerinin çok mümkün olmadığına dair kanıyı güçlendirmektedir<sup>(2)</sup>. Ancak, seragenin adı verilen ve antimikrobiyal peptitleri taklit edecek şekilde tasarlanan bir grup kimyasal molekülün farklı mikroorganizmalar üzerinde etkinlikleri olduğu görülmektedir. Seragenin moleküllerinin etkinliklerini araştıran çalışmalara bakıldığında genellikle Gram negatif bakteriler üzerinde yoğunlaştıkları görülmektedir. Dirençli Gram negatif hastane enfeksiyon etkenlerinde farklı serageninlerin etkinlik gösterdiği belirlenmiştir<sup>(18,29)</sup>. Bu çalışmalar dâhilinde CSA-44 haricinde farklı seragenin türevlerinin de etkinliği de araştırılmıştır. Genel olarak, CSA-13 molekülünün özellikle Gram negatif bakterilerde en yüksek aktiviteye sahip seragenin olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında CSA-44 MİK aralığının 0.5-8 µg/mL aralığında seyrettiği saptanmıştır<sup>(22)</sup>. Benzer şekilde CSA-44 MİK aralığının *Acinetobacter* spp. ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında sırasıyla 8-16 µg/mL ve 0.5-32 µg/mL değerlerinde seyrettiği görülmektedir<sup>(14)</sup>. Kan dolaşımı enfeksiyonlarıyla ilişkili çoklu ilaca dirençli Gram negatif patojenlere karşı serageninlerin tek başına ve antibiyotiklerle kombinasyon halinde etkinliğinin değerlendirildiği bir başka araştırmada; CSA-44 ve CSA-131'in kolistin ve meropenem dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca CSA-44'ün meropenem ve tigesiklinle kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği dikkat çekmiştir<sup>(31)</sup>.

Bizim çalışmamızda *E. faecalis* için CSA-44 MİK değerleri 2-4µg/mL olarak saptanmış, bu etkin doz değerlerinin vankomisin direnç sınır değerinin altında olması dikkati çekmiştir. Farklı bakteriler ve farklı seragenin molekülleri arasındaki etkinlik farkının süstitüsyon yapılan yan zincirlerdeki karbon sayıları veya bu yapılar çift bağ ile eklenmiş olan oksijen ile ilişkili olması muhtemeldir. Bu nedenle, kimyasal yapı ile antimikrobiyal aktivite ilişkilerinin daha detaylı aydınlatılması, yeni türevlerin sentezlenmesi için yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada kullanılan CSA-44'ün Gram pozitif izolatlarda etkinliğini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Hacıoğlu ve ark.<sup>(10)</sup> çeşitli serageninlerin (CSA-13, CSA-44, CSA-90, CSA-131, CSA-138, CSA-142 ve CSA-192) klinik *Enterococcus* spp. izolatları üzerine antimikrobiyal etkinliklerini değerlendikleri çalışmalarında, CSA-44 ve CSA-192'nin en düşük MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerine sahip olduklarını saptamışlardır. Aynı çalışmada yapılan kombine etkinlik ve in vivo etkinlik değerlendirmeleri sonucunda, CSA-44 ve CSA-192'nin enterokok enfeksiyonlarının tedavisi için iyi birer aday olabileceği rapor edilmiştir. CSA-44 ve *E. faecalis* ile yapılan literatürdeki bir çalışmada 10 ve 20 µg/ml'lik uygulamaların standart tek bir *E. faecalis* suşunda biyofilm inhibisyonu yaptığı rapor edilmiştir. İlgili çalışmada kullanılan CSA-44 dozu bizim çalışmamızda kullanılan dozlardan çok daha yüksektir. Bu nedenle daha yüksek inhibisyon oranları elde etmeleri beklenen bir sonuçtur. Bu çalışmanın ilgi çekici bir diğer bulgusu, CSA-44'ün dış yüzeyleri gibi farklı yüzeylerde uygulanarak başarılı sonuçlar verebileceğinin gösterilmiş olmasıdır<sup>(27)</sup>. Czarnowski ve ark.<sup>(5)</sup> serageninlerin ağız boşluğunda yaygın olarak yer alan mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında CSA-13, CSA-44, CSA-131 ve CSA-255'in etkinliklerini farklı patojenlere (*Candida*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Bacteroides* türlerine karşı test etmişlerdir. En zayıf antimikrobiyal aktivitenin CSA-44 için kaydedildiği belirtilmiş, yüksek MİK değerleri dikkat çekmiştir. Aynı çalışmada, ilginç şekilde CSA-44'ün özellikle *Candida* izolatlarının oluşturduğu biyofilmlere karşı diğer serageninlerden daha yüksek etkinliğe sahip olduğu, 20 µg/mL CSA-44'e maruziyette ~%10'dan fazla biyofilm canlılığı olmadığı rapor edilmiştir.

*E. faecalis*, hastane enfeksiyonlarının üçüncü en yaygın nedenidir ve hastanede yatan hastalardaki enfeksiyonların çoğu venöz ve idrar sondaları vb. kalıcı tıbbi cihazların kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Bu tarz patogenezlerde en kritik basamak, bahsi geçen bu yüzeylerin kolonizasyonudur. Biyofilm oluşumu gösteren *E. faecalis* izolatlarını bu alanlardaki tutulumu daha yüksektir. Ayrıca biyofilm içerisine kendisini âdeta gömen bakteriler, antimikrobiyal maddelerden daha az etkilenerek tedavisi daha zor enfeksiyonlara neden olurlar. Dolayısıyla biyofilm tabakalarının oluşumunun önüne geçilebilmesi hem enfeksiyon oluşumunu, hem de tedavide yaşanan zorlukların azalmasını sağlayacaktır<sup>(21)</sup>. Bu çalışma kapsamında yapılan deneyler sonucunda, CSA-44'ün biyofilm inhibisyonu yaptığı belirlenmiştir. Bu etkinlik MİK ve sub-MİK dozlarında saptanmış olup, inhibisyonun düzeyi izolata göre değişmektedir. Bununla birlikte CSA-44'ün grafiklerde görülebileceği üzere normal koşullarda oluşturulan biyofilmi %50-60 aralığında inhibe edebilme potansiyeli bulunmaktadır.

Zaman bağlı öldürme kinetikler incelendiğinde, ilginç şekilde MİK konsantrasyonunda uygulanması durumunda 6. saatten sonra tekrar üreme gözükmemektedir. Bu durum beklenmeyen bir durum gibi gözükmeyle birlikte, literatürde farklı bakteriler üzerine yapılmış çalışmalarda benzer durumların ortaya çıkabildiği görülmüştür<sup>(19)</sup>. Bu durum ilk etapta olumsuz bir özellikle gibi gözükmeyle birlikte *in vitro* testin bir doğası olarak oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Enfeksiyon modeli uygulaması yapılması durumunda, canlılığın immün sisteminin de işin içerisine dahil olacağı düşünüldüğünde, seragenin ve immün sistem arasındaki olası sinerji durumu sayesinde yeniden üreme gözlemlenmeyebilir. Bununla birlikte MİK dozunun üzerinde konsantrasyonlar uygulandığında bu tarz bir etki saptanmamaktadır.

Sonuç olarak, CSA-44, *E. faecalis*'in vankomisin dirençli suşlarına karşı hem antimikrobiyal hem de antibiyofilm aktivite gösterebilecek potansiyel bir ajan olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, klinik uygulamalarda etkinliğinin ve güvenliğinin tam olarak belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle doğru dozaj ve tedavi süresinin belirlenmesi, CSA-44'ün klinikte kullanımını optimize etmek için kritik öneme sahiptir. Bu çalışma, CSA-44'ün *E. faecalis* ile mücadelede potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmekte ve bu alandaki araştırmaların devam etmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019-GAP-ECZF-0006 numaralı projeye desteklenmiştir.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial Support:** This study was supported by Izmir Kâtip Çelebi University Scientific Research Projects Coordination Unit with the project number 2019-GAP-ECZF-0006.

## KAYNAKLAR

1. Alaoui Mdarhri AH, Benmessaoud R, Yacoubi H, et al. Alternatives therapeutic approaches to conventional antibiotics: Advantages, limitations and potential application in medicine. *Antibiotics* (Basel). 2022;11(12):1826. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826>
2. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* (Basel). 2013;6(12):1543-75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
3. 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;2014:710273. <https://doi.org/10.1155/2014/710273>
4. Brinkwirth S, Ayobami O, Eckmanns T, Markwart R. Hospital-acquired infections caused by enterococci: a systematic review and meta-analysis, WHO European Region, 1 January 2010 to 4 February 2020. *Euro Surveill*. 2021;26(45):2001628. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2001628>
5. Czarnowski M, Słowińska M, Sawieljew M, et al. Efficacy of Ceragenins in controlling the growth of oral microorganisms: Implications for oral hygiene management. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2):204. <https://doi.org/10.3390/ph17020204>



6. 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.00380-10>
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.
8. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* 1991;173(9):3000-09. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.3000-3009.1991>
9. Greco I, Emborg AP, Jana B, et al. Characterization, mechanism of action and optimization of activity of a novel peptide-peptoid hybrid against bacterial pathogens involved in canine skin infections. *Sci Rep.* 2019; 9:3679. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39042-3>
10. Hacıoğlu M, Yılmaz FN, Oyardı O, PB et al. Antimicrobial activity of ceragenins against vancomycin-susceptible and -resistant enterococcus spp. *Pharmaceuticals.* 2023;16(12):1643. <https://doi.org/10.3390/ph16121643>
11. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1663-74. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>
12. Huan Y, Kong Q, Mou H and Yi H. Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol.* 2020;11:582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
13. Kahraman Vatanserver S, Tekintas Y, Cilli FF, Hosgor Limoncu M. Effect of predator bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* on clinical pathogens and biofilms. *Indian J Microbiol.* 2023;63:139-45. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01071-y>
14. Karasiński M, Wnorowska U, Durnaś B, et al. Ceragenins and ceragenin-based core-shell nanosystems as new antibacterial agents against Gram-negative rods causing nosocomial infections. *Pathogens.* 2023;12(11):1346. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111346>.
15. Lai XZ, Feng Y, Pollard J, et al. Ceragenins: cholic acid-based mimics of antimicrobial peptides. *Acc Chem Res.* 2008;41(10):1233-40. <https://doi.org/10.1021/ar700270t>
16. 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1347>
17. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance-Overview. *Indian J Med Microbiol.* 2005;23(4),214-9. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02524-X](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02524-X)
18. Oyardı O, Savage PB, Akcalı A, Erturan Z, Bozkurt-Guzel C. Ceragenins exhibiting promising antimicrobial activity against various multidrug resistant Gram negative bacteria. *Istanbul J Pharm* 2018;48(3):68-72. <https://doi.org/10.26650/IstanbulJPharm.2018.400730>
19. Ozbek-Celik B, Damar-Celik D, Mataraci-Kara E, Bozkurt-Guzel C, Savage PB. Comparative in vitro activities of first and second-generation ceragenins alone and in combination with antibiotics against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antibiotics (Basel).* 2019;27:8(3):130. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030130>
20. Öztürk İ, Tekintaş Y, Temel A, Ermertcan Ş, Kurutepe S, Hoşgör Limoncu M. In vitro effects of antibiofilm agents and antibiotics on coagulase-negative staphylococci. *J Res Pharm.* 2020;24(6):821-32. <https://doi.org/10.35333/jrp.2020.241>
21. Paganelli FL, Willems RJ, Jansen P, et al. Enterococcus faecium biofilm formation: identification of major autolysin AtlAEfm, associated Acm surface localization, and AtlAEfm-independent extracellular DNA Release. *mBio.* 2013;4(2):e00154. <https://doi.org/10.1128/mBio.00154-13>
22. Paprocka P, Durnaś B, Mańkowska A, et al. New  $\beta$ -lactam antibiotics and ceragenins - a study to assess their potential in treatment of infections caused by multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist.* 2021;25(14):5681-98. <https://doi.org/10.2147/IDR.S338827>.

23. Piktel E, Pogoda K, Roman M, et al. Sporicidal activity of ceragenin CSA-13 against *Bacillus subtilis*. *Sci Rep*. 2007;7:44452. <https://doi.org/10.1038/srep44452>
24. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int*. 2015;2015:759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
25. Som A, Vemparala S, Ivanov I, Tew GN. Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2008;90(2):83-93. <https://doi.org/10.1002/bip.20970>
26. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
27. Tokajuk J, Deptuła P, Chmielewska SJ, et al. Ceragenin CSA-44 as a means to control the formation of the biofilm on the surface of tooth and composite fillings. *Pathogens*. 2022;11(5):491. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050491>
28. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT*. 2015;40(4):277-83.
29. Vila-Farrés X, Callarisa AE, Gu X, Savage PB, Giralt E, Vila J. CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(5):568-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.003>
30. Yang Y, Li W, Hou B, Zhang C. Quorum sensing LuxS/autoinducer-2 inhibits *Enterococcus faecalis* biofilm formation ability. *J Appl Oral Sci*. 2018;26:e20170566. <https://doi.org/10.1590%2F1678-7757-2017-0566>
31. Yılmaz FN, Öksüz L, Demir ES, Döşler S, Savage PB, Güzel ÇB. Efficacy of ceragenins alone and in combinations with antibiotics against multidrug-resistant gram negative pathogens from bloodstream infections. *Curr Microbiol*. 2023;80:327. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03443-5>