

**ATOMOKSETİN FLUKANAZOL KOMBİNASYONUNUN *Candida albicans*
ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİSİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ**

Yüksek Lisans Tezi

Benjamin KREKA

Eskişehir 2019

**ATOMOKSETİN FLUKANAZOL KOMBİNASYONUNUN *Candida albicans*
ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİSİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ**

Benjamin KREKA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mayıs 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Benjamin Kreka'nın "Atomoksetin Flukanazol kombinasyonunun *C.albicans* üzerine antifungal etkisinin transkriptom analizi" başlıklı tezi 29.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca Farmasotik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Dr.Öğr.Üyesi Hülya KARACA GENÇER

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye : Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Prof. Dr.
Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Enstitü Müdürü



ÖZET

ATOMOKSETİN FLUKANAZOL KOMBİNASYONUNUN *Candida albicans* ÜZERİNE ANTİFUNGAL ETKİSİNİN TRANSKRİPTOM ANALİZİ

Benjamin KREKA

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

Günümüzde artan ilaç dirençleri ve bu direnç mekanizmalarının meydana getirdiği yan etkiler sorunları beraberinde getirmektedir. Antifungal direncin özellikle güçlü bir antifungal olan flukanazole karşı gelişmesi nedeni ile farklı ilaçlara ve ilaç kombinasyonlarına daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalar baz alınarak bu tezde farklı ilaçların antifungal aktivitesi araştırılmış ve bu ilaçlardan daha önce antimikrobiyal aktivitesi çalışılmamış olan antidepresan Atomoksetinin kontrollerden daha az etkili diğer ilaçlardan daha fazla etkili antimikrobiyal aktivitesine rastlanmıştır. Atomoksetinin antifungal etkisinin günümüzde antifungal olarak kullanılan flukanazol ile kombine kullanıldığında arttığı yapılan ön çalışmalar ile belirlenmiştir. Yapılan dama tahtası analizi ile Atomoksetin ve Flukanazol kombinasyonunun *C. albicans* üzerine sinerjik etkisi belirlenmiştir. Bir başka antimikrobiyal aktivite analizi olan ölüm kinetiğiyle bu iki maddenin fungisidal aktivitesine rastlanmıştır. Bu antifungal etki transkriptom analizi ile detaylandırılmıştır. İlaçlı ve ilaçsız yapılan transkriptom analizinde kombinasyonun genler üzerindeki etkisi tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Atomoksetin, Flukanazol, Antifungal aktivite, Transkriptom analizi

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF ATOMOXETINE AND FLUCANAZOLE IN *Candida albicans*

Benjamin KREKA

Department of Pharmaceutical Microbiology

Programme in Institute of Health Sciences

Anadolu University, Graduate School of May 2019

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Hülya KARACA GENÇER

Today, there are problems with increasing drug resistance and side effects caused by these resistance mechanisms. Due to the development of antifungal resistance, especially against flucanazole, new research is needed for different drugs and drug combinations. The antifungal activity of different antidepressants was investigated in this thesis based on the previous studies and the antimicrobial activity of these antidepressants was found to be more effective than the other drugs. Antifungal effect of atomoxetine is determined by the preliminary studies. Atomoxetine-flucanazole combination increased the antifungal activity. The synergistic effect of Atomoxetine and Flucanazole on *C. albicans* determined by checkerboard analysis. Another kinetics of antimicrobial activity is the time kill and the fungicidal activity of these two substances is showed. This antifungal effect was elaborated by transcriptome analysis. Efficacy on genes was determined in the transcriptome analysis with and without drugs.

Keywords: Atomoxetine, Flucanazol, Antifungal activity, Transcriptome analysis

28/06/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” ile tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Benjamin Kreka

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Benjamin Kreka

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	4
2.1. Antifungaller.....	4
2.1.1. Günümüzde yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlar	4
2.1.1.2. Amfoterisin B	4
2.1.1.3. Ketokonazol.....	5
2.1.1.4. İtrakonazol	5
2.1.1.5. Flukanazol	5
2.2. Antideprasanlar.....	7
2.2.1. Glibenklamid.....	7
2.2.2. Buspiron hidroklorid	7
2.2.3. Gabapentin	8
2.2.4. Karbamazepin.....	8
2.2.5. Diprion (metamizol).....	8
2.2.6. Ketiapin fumarat.....	9
2.2.7. Risperidon	9
2.2.8. Olanzapin	9
2.2.9. Sertralin.....	10
2.2.10. Fluoksetin	10
2.2.11. Atomoksetin.....	10
2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analiz Testleri.....	12
2.3.1. Minium inhibisyon konsantrasyon (MIK)	12

2.3.2. Checkerboard (Dama Tahtası Deneyi).....	12
2.3.3. Time kill (Ölüm Kinetiği Deneyi)	12
2.3.4. Gen ekspirasyon çalışmaları.....	13
2.3.5. Transkriptom Analizi	13
3. MATERYAL ve METOD	14
3.2. METOD.....	16
3.2.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi.....	16
3.2.2. Checkerboard analizi (dama tahtası) sinerji deneyi.....	16
3.2.3. Time kill (ölüm kinetiği)	17
3.2.4. RNA İzolasyonu için Hücre Hazırlanması	18
4. BULGULAR.....	20
4.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon test bulguları	20
4.1.1. Checkerboard deneyi sonuçları.....	22
4.1.2. Ölüm kinetiği sonucu	24
4.1.3. Transkriptom Analiz.....	25
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	30
KAYNAKÇA.....	31
ÖZGEÇMİŞ	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve maya suşları.....	15
Çizelge 4.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testinin bakterilerdeki sonuçları.....	20
Çizelge 4.2. Antidepresanların <i>Candida</i> türleri üzerine etkili MİK konsantrasyonları..	21
Çizelge 4.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon testinin <i>Candida</i> 'lardaki sonuçları...	21
Çizelge 4.4. <i>Candida</i> türlerinde atomoksetin ve flukanazol kombinasyonunun FİK hesaplaması sonucu.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.5. <i>C. albicans</i> üzerine atomoksetin ve flukanazol kombinasyonun ölüm kinetiği sonucu. 6., 9., 12. ve 24. saatlerdeki örneklemelerden elde edilen veriler...	24
Şekil 4.6. İlaçlı ve ilaçsız örneklerde farklı ifade edilen genler.....	25
Şekil 4.7. GO analizi sonucu ilaçlı ve ilaçsız örneklerdeki biyolojik süreçlerdeki, hücre-sel bileşenlerdeki ve moleküler fonksiyonlardaki değişimler.....	26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	: Edinilmiş Bağışlık Eksikliği Sendromu (Aquired Immune Deficiency Syndrome)
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standarts Institute)
EUCAST	: Antibiyotik Duyarlılık Testleri Üzerinde Avrupa Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
SSRI	: Seçici Seratonin Gerilim İnhibitörü
DEHB	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
MHB	: Müller Hinton Broth
SDB	: Sabourd Dextrose Broth
SDA	: Sabourd Dextrose Agar
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
YPD	: Yeast extract Peptone Dextrose
OD	: Optical Density

1. GİRİŞ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 19-uncu yüzyılın ikinci yarısında önemli gelişmeler kaydetmiştir. Mikroorganizmaların tedavilerde kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceklerini ilk düşünen bilim adamları Pasteur ve Joubert olmuştur. Bu bilim insanları steril idrarda şarbon basillerinin ürediğini kontamine idrarda ise üremediklerini ve basillerin öldüğünü saptayarak, bu gözlemlerinin nedenlerini deneysel olarak ispatlamak istemişlerdir. Pasteur ve Joubert kontamine idrara şarbon basillerini karıştırarak deney hayvanlarına aktarmışlardır. Böylelikle hastalık oluşmadığını ortaya koymuşlardır. Bunu deneysel olarak ispatlamaları enfeksiyon hastalıklarının bu şekilde tedavi edilebileceğinin ilk adımı olup antibiyotik kavramının öncüleri olmuşlardır [1].

1909 yılında enfeksiyon tedavisi alanında çalışmalar yapan alman bakteriyolog Paul Ehrlich arsenik bazlı bir madde tespit etmiş ve bu maddenin sifilizin erken döneminde etkili olduğunu saptamıştır. Bu maddeye ‘salvarsan’ adını vermişlerdir. Aynı zamanda Louis Pasteur’de bu maddenin farklı mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu gözlemlemiştir [1].

1928 yılında Alexander Fleming stafilokoklar ile deneyler yürütmeye başlamıştır. Açık camın yanında duran kapağı kapalı olmayan bir petri kabında küf sporlarının geliştiğini fark etmiştir. Bu küf sporlarının etrafında bakterilerin öldüğünü gözlemlemiştir. Bu küf sporlarını katı besiyerinde geliştirerek penisilin ismini verdiği küf türünü tayin ederek tanımlamıştır. Penisilin gram pozitif patojenlere karşı etkili olduğunu gözlemlemiştir. Ancak bu etkinin bire bir küf kaynaklı olmayıp küfün ürettiği bir maddenin bakterileri öldürdüğünü fark etmiştir [2].

Alexander Fleming penisilinle ilgili keşfini British Journal of Experimental dergisinde yayınlamıştır. Yayını ilk başta rağbet görmemesine rağmen ikinci dünya savaşında çıkan salgın hastalıklara karşı penisilin kullanımı, Fleming’in 1945 yılında tıbbi fizyoloji alanında nobel ödülünü almasına sebep olmuştur [2].

1930’lu yıllarda mikroorganizmalara karşı modern kemoterapi sülfanomidlerin keşfi ile başlamıştır. 1943’te Waksman arkadaşlarıyla birlikte *Streptomyces griseus* kültüründen streptomisini izole etmişlerdir. 1944 yılında tedavide kullanılan bu antibiyotik birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaların yanında

Mycobacterium'larada etki etmiştir. 1952'de makrolitler penisilin alternatifi olmasıyla önem kazanmıştır [1].

Ancak eritromisine direncin yüksek olması kullanımlarını sınırlandırmıştır. Sonrasında yeni antibiyotikler geliştirilerek 1990'lı yıllarda antibiyotiklere direncin varlığı kesin olarak anlaşılmıştır. Günümüzde ilaç endüstrisinde antibiyotiklerle ilgili çok çalışma bulunmakla beraber bazı araştırmacılar 1990'dan sonraki yılları antibiyotik sonrası dönem olarak nitelendirmektedirler [1].

Antifungal ilaçların tarihçesi 1953 yılında amfoterisin B'nin keşfi ile başlamıştır. Bunu 1957'de flusitozin, 1960'lardan sonrada azoller ve türevleri ile triazoller izlemiştir. Mevcut antifungallerin toksik etkilerinin ve direnç gelişimi gibi yan etkilerinin bulunması antifungal ilaçlara ihtiyacı artırmaktadır. Buna karşılık bu mantar hastalıklarına karşı kullanılacak antimikotiklerin sayısında artmamaktadır. AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome - edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu) vakalarındaki artış, kemik iliği ve organ nakilleri, kortikosteroid kullanımı, yanlış antibiotik kullanımı gibi immun sistemin baskılanması sonucu gelişen fırsatçı enfeksiyonların sıklığı yeni antifungallerin sentezlenmesini gerektirmiştir [3].

Antibakteriyel ajanlarla antifungal ajanlar karşılaştırıldığında antibakteriyel ilaçların prokaryotik hücre yapısına etki etmesi nedeni ile tedaviye olanak sağladığı görülmektedir. Antifungal ilaçlar ise ökaryotik hücre yapısına etki ettiği için tedavide karmaşıklığa ve sorunların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Yeni sistemik antifungal ilaçların geliştirilmesinde aranacak özellikleri kısaca;

- Fungal hücre duvarı biyosentezini inhibe edebilmeli
- Amfoterisin B' den daha etkili olmalı
- Güvenilebilirliği flukanazol ile karşılaştırılabilir
- *In vitro* ve *in vivo* fungisidal aktiviteye sahip olmalıdır şeklinde sıralanabilir.

Bunun yanı sıra etkili bileşiklere ulaşılabilmesi için aranan kriterlerin başında yeni etki mekanizmalarının geliştirilmesi gelmektedir. Bunun fungus hücre yapısı ve metabolik yolların detaylı bir biçimde araştırılması ile sağlanabileceği düşünülmektedir [4].

Günümüzde antifungallerin yetersiz olması, şu anki ulaşılabilir antifungal ilaçların toksisite ve artan antibiyotik kullanımı ile birlikte doğan antimikrobiyal direnç dikkate alındığında yeni antifungal ilaçların araştırılması kaçınılmazdır. Sağlık alanındaki maddi ve manevi yüklerinden dolayı mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinin etkili olması gerekmektedir. Yeni sentez ilaç önerileri dışında alternatif olarak doğal ürünlerin, antifungal etkilerinin değerlendirilmesi ve kombine ilaçların kullanılması ilaç önerileri arasındadır. Yapılan bu tez çalışması ile antimikrobiyal ilaçlara yeni bir alternatif sunmak amacı ile daha önce antimikrobiyal etkisi bazı organizmalar üzerine belirlenmiş olan sertralin, fluoksetin gibi ilaçların ve daha önce antimikrobiyal etkinlikleri açısından analiz edilmemiş olan farklı ilaçların antifungal etkileri araştırılmış olup etkili bulunan ilacın (Atomoksetin) etki mekanizması aydınlatılmıştır. Bir ön çalışma olarak farklı ilaç şirketlerinden temin edilen atomoksetin, agomelatin, sertralin, fluoksetin, essitalopram, mianserin hidroklorid, karbamazepin, dipriyon, gabapentin, glibenklamid, vainoktamid, ketfapin fumarat, risperidon, olanzapin, gibi antidepresan ilaçlar antifungal aktiviteleri açısından analiz edilmiş standart minimum inhibisyon konsantrasyon testi ile antifungal etkinlikleri farklı testlerle belirlenmiştir. Atomoksetin ve güçlü bir antifungal olan flukanazolün kombine kullanımı araştırılmış ve iki ilaç arasında sinerjik bir etki olduğu bulunmuştur. Bu nedenle atomoksetin ve flukanazol kombinasyonunun etki mekanizmasını belirlemek üzere bu tez kapsamında ilacın MIC₅₀ değeri belirlenip *C. albicans* üzerine antifungal etkisi araştırılmış ve mikroorganizmanın ilaçla muamele edilmemiş ve edilmiş örneklerinden RNA izolasyonu yapılarak RNA seq analizi ile ilaç kombinasyonun *C. albicans* üzerine etki mekanizması aydınlatılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Antifungaller

Günümüzde kullanılan antifungal ajanlar polyen ve azol grubu olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Polyen gurubunda amfoterisinB, nistatin gibi ilk antifungaller yer almaktadır. Azol grubu ise imidazol ve triazaoller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Azol gurubu antifungal ajanlar azol halkasındaki nitrojen sayısına göre imidazoller ve triazoller olarak sınıflandırılmaktadır. Tüm azoller mantar hücre zarında bulunan ergostreol sentezini sitokrom p450 aracılığı ile 14 alfa-streol-demetilasyon aşamasında inhibitör etki göstererek zarın geçirgenliğini etkileyerek bozmaktadırlar. Azollerin polyenlere göre daha az toksik olduğu bildirilmiştir [9].

2.1.1. Günümüzde yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlar

2.1.1.1. Griseofulvin

Mitozu metafaz evresinde durdurarak etki göstermektedir. Dermatofitlere etkili olup maya ve bakterilere etkisizdir. Penisilin türlerinden izole edilen dar spektrumlu antifungal etki gösteren bir antibiyotiktir. Tinea kapitis, korporis ve kruris gibi klinik vakalarda kullanılmaktadır. Bulantı, kusma, ishal gibi gastrointestinal yan etkileri görülmektedir. Merkezi sinir sistemi ile ilgili yan etkiler baş ağrısı, baş dönmesi, uyku hali ve konfüzyon gelişebilmektedir. Bunun yanı sıra ilaç kullanımı ile alerjik reaksiyonlar da gelişebilmektedir. İmmun mekanizma ile ilgili yan etkileri ise lökopeni, nefroz ve hepatit olarak bildirilmiştir [6]. Belirtiler geçip, fungal kültür negatif olduktan sonrada 2 hafta daha kullanılması tavsiye edilmektedir [7].

2.1.1.2. Amfoterisin B

Amfoterisin B polyen gurubuna ait en eski ve aynı zamanda mantar enfeksiyonlarında standart kullanılan bir antifungal ajandır. Yeni çalışılan antifungal ilaçların etkinlikleri amfoterisin B ile karşılaştırılarak belirlenmektedir. Fungal membranda en önemli sterol olan ergosterole bağlanarak etkisini göstermektedir. *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* türleri, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* ve *Paracoccidioides brasiliensis* gibi geniş bir mikroorganizma gurubuna etkilidir. Fungal membranda ergosterol ile

birlikte kolesterollede etkileşime girdiği için akut ve kronik toksisite yaratmaktadır. En belirgin yan etkileri toksisite ve nefrotoksisitedir. Bu toksisitenin önüne geçilebilmesi için ilacın lipid bazlı 3 farklı formülasyonu geliştirilmiştir [8].

2.1.1.3. Ketokonazol

1981 yılında oral olarak kullanımı kabul edilen ve ilk imidazol grubu antifungal ilaçtır. Geniş antifungal spektruma sahiptir. Yan etkileri; bulantı, kusma, antiandrojen etki, hepatoksisite olarak bildirilmiştir. Endemik mikozlarda 400-800 mg/gün, yüzeysel mantar enfeksiyonlarında 200 mg/gün, vajinal kandidiyazis tedavisinde 200 mg/gün 5 gün süre ile önerilmektedir [10].

2.1.1.4. İtrakonazol

Geniş spektrumlu antifungal aktivitesi olan itrakonazol oral formu bulunan bir triazol türevidir. 1992 yılında ‘Food and Drug Administration (FDA)’ onaylı olarak klinikte kullanımına başlanmıştır. Ketakonazolle arasındaki fark başta *Aspergillus* vakalarına ve birçok mikoza etkili olması ve daha az toksik olmasıdır. İtrakonazol oral anti-*Aspergillus* olarak çok önemlidir. Oral formu emilimi iyi değildir. *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboisii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii*, *Cryptococcus neoformans* gibi fungal patojenlere etkilidir. Ciddi bir yan etkisi olmamakla birlikte baş, karın ağrısı, şişkinlik hissi, kaşıntı ve adet düzensizliği gibi yan etkiler bildirilmiştir [9].

2.1.1.5. Flukanazol

İlacın kimyasal formülü $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ şeklindedir [11]. Kimyasal adı ise “a-(2,4 Diflorofenil)-a-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol”dür [12].

Kimyasal yapısına bakıldığında en az bir adet 5 üyeli halka ile karbon-azot bağlarıyla bağlı ve aromatik özellik gösteren başka halkalarla bütünleşen bir bileşiktir. Bu beş üye-li halkaların herbirinde imidazollerde iki, triazollerde üç azot atomu bulunmaktadır [13].

Flukanazol etkisini hücre zarında bulunan fungal sterol ergosterolün sentezini inhibe ederek gerçekleştirmektedir. Böylece hücre zarı ergosterol eksikliğinden

bütünlüğünü kaybederek hücre içi ve hücre dışı anormalliklere neden olarak mantar hücrelerinin çoğalmasına engel olmaktadır [13].

Flukanazolde bulunan 5 üyeli halkanın azot atomuyla, mantarda bulunan p450 enzimi lanosterol C-14 metilazının hem kısmı arasındaki bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks lanosterolün ergosterole dönüşümündeki kritik demetilasyon (lanosterolün karbon 14 konumundaki a-metil grubunun koparılması) basamağının gerçekleşmesine engel olmaktadır [13].

İnsan ve memelilerde p450 enziminin bulunmaması flukanazol tedavisinde bir avantajdır. Flukanazol p450 enzimini inhibe ettiği için insan organizmasına daha az toksik ve daha az ilaç etkileşimine sebep olmaktadır. Bunun nedeni ise mantarda p450 enzimine daha büyük bir kuvvet ve özgüllükle bağlanmasıdır. Azol grubu ilaçlara günümüzde giderek direnç artmaktadır. “HIV” (Human Immunodeficiency Virus - İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) ve kemik iliği nakli geçirmiş hastalarda bu sorun baş göstermektedir. Direnç C-14 a-demetilaz geninde daha az azol bağlanmasına sebep olan mutasyonlardan ve azolü hücre dışına pompalayan eflüks pompasından kaynaklanmaktadır. Flukanazole direncin tespiti için tür tanımlanması yapılmaktadır. Duyarlılığın önceden bilinmesi tedaviyi zorlaştırmaktadır. Duyarlılığın saptanmasında CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) veya EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) gibi standart yöntemler ve güncel sınır değerler kullanılmaktadır [13].

Blastomikozis, kandidemi ve kandida enfeksiyonları, yüksek riskli hastalarda kandidiyaz profilaksisi, orofarenks kandidiyazisi, özofagus kandidiyazisi, vulvovajinal kandidiyazis, koksidiyoidomikozis, kriptokokozis, histoplazmozis, sporotrikozis, dermatofitozlar, onikomikozis, pitiriazis tinea versikolor gibi enfeksiyonlarda kullanılmaktadır [13].

Karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal bildirilen yan etkilerindendir. Dermatolojik yan etkilerden döküntü, kaşıntı ve ölümlü sonuçlanan Stevens-Johnson sendromu bildirilmiştir. Baş dönmesi ve nöbetlere yol açabilmektedir [13].

2.2. Antideprasanlar

Artan ilaç dirençlerine karşı yeni ilaç arayışları yeni tedavi uygulamaları beraberinde birçok araştırmayı hedef almaktadır. Çeşitli psikolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan antidepresanlar antimikrobiyal ilaç araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu araştırmalar farklı ilaç gruplarıyla birlikte oluşturulan kombinasyon çalışmalarını da kapsamaktadır. Bu amaçla bu projede kullanılan ilaçlar sırasıyla verilmiştir.

2.2.1. Glibenklamid

İkinci kuşak sülfonilüreler grubunda yer alan glibenklamit oral antidiabetik bir ilaçtır. İnsulin salınımını artırarak etkisini göstermektedir. Pankreasın B hücre zarında sülfonilüre reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörlerin uyarılması sonucunda ATP'ye duyarlı potasyum çıkışı azalmakta ve hücre zarı depolarize olmaktadır. Bu olay sonucunda voltaja duyarlı kalsiyum kanalları açılarak bir B hücresi içine kalsiyum girmektedir. Sitozolde kalsiyum miktarı artarak insulin granülleri yüzeye doğru hareket etmekte ve böylece insulin salgılanması meydana gelmektedir. İnsulin salgılatıcı ilaçların hepsi bu yollağı kullanmaktadır. Yani sitozolik kalsiyumu artırarak insulin salgılanmasına neden olmaktadır. Sülfonilüreler yalnızca birinci faz (erken) insulin salgısına etkilidirler. Karaciğerde metabolize olurlar. Böbrek ve dışkı ile atılmaktadırlar [14].

2.2.2. Buspiron hidroklorid

Buspiron anksiyolitik etkisi tespit edilen bir ilaçtır. Serotonin sistemi üzerine etkilidir. Terapötik etkisine karşın tolerans gelişmemektedir. Alkolle etkileşmez, bildirilen yan etkilerinden sersemlik, baş ağrısı, bulantı, sinirlilik ve parastezidir. Gebelikte kullanımı hakkında bilgi olmayıp kullanılmaması önerilmektedir. Buspironun yarılanma ömrü kısadır. Günde 2-3 kez bölünmüş dozlarla kullanılmalıdır. Terapötik etkisi görülene kadar 2-3 hafta 30-60 mg/gün ile 90 mg/gün dozunda kullanımı önerilmektedir. Buspiron benzodiazepin tedavisinden sonra hastalığı tekrarlayan kronik anksiyetesi olan hastalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Uyuşturucu öyküsü olan hastalarda tedavi için öncelikli ilaçtır [15].

2.2.3. Gabapentin

Gabapentin antiepileptik bir ilaçtır. Parsiyel epileptik nöbetler dışında nöropatik ağrı ve hareket bozukluklarının tedavisinde'de kullanılmaktadır. Psikiyatride bipolar bozukluk, anksiyete olgularında ve alkol bağımlılarının tedavisinde kullanılmaktadır. FDA (food and drug administration) tarafından 1993 yılında 12 yaşından büyük hastalarda kullanılmasına onay verilmiştir. İnce bağırsakta absorbe olmaktadır. 2-4 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Özellikle L aminoasitlerine bağlanarak beyindeki kan bariyerini kolaylıkla geçmektedir. Karaciğerde metabolize olmayıp diğer ilaçlarla etkileşmemektedir. İdrarla dış ortama atılmaktadır. Tedavide tek ve yüksek dozlarda etkilidir. Erişkinlerdeki gibi çocuklarda etkisi yoktur. Önerilen doz 900-800 mg/gün'dür. 3600 mg'a kadar artırılabilen doz 300 mg ile başlamakta ve aynı şekilde 300 mg ile artırılması önerilmektedir. En sık görülen yan etkileri somnolans, baş dönmesi, ataksi, nistagmus ve tremor olup gastrointestinal yan etkileri ise bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal olarak bildirilmiştir [16].

2.2.4. Karbamazepin

Karbamazepin antiepileptik bir ilaçtır. Sodyum kanallarını bloke ederek etkisini göstermektedir. L tipi kalsiyum kanallarının blokajı ise ikinci etki mekanizmasıdır. Basit ve karmaşık parsiyel epilepsi nöbetlerinde ve jeneralize konvülsyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Önerilen doz 400-1800 mg/gün'dür [17]. Yan etkileri bulantı, kusma, dispepsi, karın ağrısı, iştahsızlık, ishal, kabızlık olarak bildirilmiştir. İlaç kullanımı süresince ağızda kuruma, midriyazis, yakın görmede bozulma, idrar retansiyonu gibi antikolinerjik yan etkilerde görülmektedir. Doza bağlı olarak uyuşukluk, ataksi, baş dönmesi, çift görme, görme bulanıklığı ve nistagmus görülebilmektedir. Yaşlılarda mental ve motor yavaşlamasına neden olabilmekte hastaların %5'inde başlangıçta alerjik cild lezyonları görülmektedir [18].

2.2.5. Diprion (metamizol)

Ateş düşürücü (antipiretik) ve ağrı kesici (analjezik) bir ilaçtır. Antipiretik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak merkezi sinir sistemi üzerine doğrudan etki etmesi ile birlikte endojen pirojenlerin sentezini ve salınımını periferik olarak inhibe ettiği üzerinde görüşler bildirilmiştir. En belirgin yan etkisi agranülositoz

olduğu için dünyanın birçok ülkesinde yasaklanmıştır. Böbrekler ile dış ortama atılmaktadır. Parasetamol ile karşılaştırıldığında metamizolün etkisinin daha uzun olduğu bildirilmiştir [19].

2.2.6. Ketiapin fumarat

Ketiapin şizofreni, bipolar bozukluk ve birçok psikolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan bir antipsikotiktir. Beyinde serotonin, histamin ve adrenerjik reseptörlere antagonistik etkilidir. Bipolar I bozukluk ve şizofrenide önerilen klinik dozu 400-800 mg/gün'dür. Bazı durumlarda daha yüksek dozlardada kullanılabilir. Antipsikotik etkisi hızlı ve geçici bağlanma sayesinde de ortaya çıkmaktadır. Ketiapinin α_1 ve h_1 reseptör afinitesi d_2 reseptör afinitesinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı bu ilacı kullanan hastalarda ortostatik hipotansiyon ve geçici sedasyon riski olabilmektedir. En belirgin yan etkileri uykuya eğilim, sersemlik, ağız kuruluğu, kabızlık, kilo alımı olarak bildirilmiştir. Antipsikotiklerin kullanımı kardiyak belirtilerinede neden olmaktadır [20].

2.2.7. Risperidon

Benzizoksazol türevi olan bir antipsikotiktir. Adrenerjik reseptörlerine afinite göstermektedir. Besinlerle etkileşime girmeden %70-85 oranında emilmektedir. Karaciğerde CYP 2D6 enzimi tarafından metabolitlerine ayrılmaktadır. 9-hidroksirisiperidon (9-OH-risperidon) metabolitide aynı bu enzim tarafından metabolize olmaktadır. Risperidonun %90'ı, aktif metabolitin %77'si plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Oral alımdan bir saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Böbrekler ile dış ortama atılmaktadır [21].

2.2.8. Olanzapin

Dopaminerjik, serotonerjik, histamin, adrenerjik ve muskarinik reseptörlerini inhibe eden bir antipsikotiktir. 5 mg/gün dozu bile bu reseptörleri etkilemektedir. Gastrointestinal yoldan %65-85 oranında emilen olanzapin besinlerle etkileşmemektedir. Karaciğerden ilk geçişte %40'ı inaktif hale gelmektedir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %93 olan olanzapin 5-6 saate maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Gastrointestinal ve böbrekler ile vücuttan atılmaktadır.

Yan etkilerinden uyku hali, uykusuzluk, ajitasyon, baş ağrısı, halsizlik gibi belirtiler görülebilmektedir. Önerilen tedaviye başlanma dozu 5 mg/gün'dür [22].

2.2.9. Sertralin

Seçici merkezi seratonin geri alım inhibitörüdür (SSRI). Bu nedenle seratonerjik iletiyi artırarak antidepresan etki yaratmaktadır. Yarılanma ömrü 26 saattir. Obsesif kompulsif bozukluğun tedavisinde kullanılmaktadır. Yaşlılarda, kalp hastalığı olanlarda kullanılabilir. Kullanımında bilişsel ve psikomotor performansları etkilememektedir. Yavaş emilir, maksimum plazma konsantrasyonuna 4-8 saatte ulaşmaktadır. Besinlerle alınması emilimini artırmaktadır. Karaciğerde metabolize olup, idrarla vücuttan atılmaktadır. Önerilen doz rahatsızlığa göre 50-200 mg/gün'dür. En yaygın yan etkisi gastrointestinal sistem şikayetleridir. Bulantı, kusma, ishal'dir. Bunların yanında ağız kuruluğu, uykusuzluk, tremor, yorgunluk, ajitasyon, somnolans, baş dönmesi gibi yan etkiler görülebilir. Ayrıca erkek hastalarda cinsel anormalliklere sebep olabilmektedir [28].

2.2.10. Fluoksetin

Bilinen antidepresanlarla eşit etkili bir antiobsesif ve antipanik etkili bir ilaçtır. Yarılanma ömrü 1-3 gündür. Kilo kaybına neden olabilmektedir. Kardiyovasküler açıdan güvenlidir. 100 mg ve daha yüksek dozlarda nöbetlere neden olabilmektedir. Anoreksi, bulantı, ishal, dispepsi, cinsel anormallikler, cild sorunları yan etkileri olarak bildirilmiştir. Diğer antidepresanların kullanımında ortaya çıkan uyku durumunu azaltmaktadır. Önerilen doz 20-60 mg/gün'dür [29]. Fluoksetin kullanımına bağlı olarak hematolojik yan etkiler bildirilmiştir. Bunlar deri altı kanama, uzamış ve artmış menstruasyon kanamaları, burun kanamaları ve bazı durumlarda kafa içi kanamalar bildirilmiştir [30].

2.2.11. Atomoksetin

Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), çocukluk çağı ve ergenlikte görülen sinir sistemi hastalıklarından biridir. Bu rahatsızlığı yaşayan çocuklarda dikkatsizlik, hiperaktivite ve dürtüsellik gibi belirtiler görülmektedir. Bu hastalığı geçiren çocuklarda, çocuğun birçok açıdan becerilerini etkilediği için tedavinin çok kapsamlı olması gerekmektedir [23]. Tedavi ile düzelen bu hastalık, tedavi edilmediği

zaman birçok olumsuzluklara neden olabilmektedir. Bu hastalığı ilk olarak 1902 yılında İngilterede George Still “ahlaki kontrolün ileri düzeyde yetersizliği” olarak tanımlamıştır. Hastalığın etiyojisi tam olarak açıklanmamıştır [24].

DEHB hastalığında kullanılan psikostimulan ilaçların etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen hastaların % 20'sinde etkisiz olup birçok yan etkiye sebep olmaktadır. Bu hastalığı tedavi etmek için stimulan olmayan etki ve yan etkisi karşılaştırılan birçok çalışma yapılmıştır. Bu hastalık tanısı konulan çocuklarda 2002 yılında stimulan olmayan atomoksetin FDA onayı almıştır. Tek doz kullanılması ve kötüye kullanılıp bağımlılık yapmaması ilacı avantajlı kılmaktadır. Atomoksetinin farmakolojik özelliklerine bakıldığında atomoksetin merkez sinir sisteminde presinaptik norepinefrin taşıyıcılarının seçici bir inhibitörüdür. Düşük seviyede serotonin ve dopamin taşıyıcılarına afinitesi bulunmaktadır. Bu özelliği frontal bölgede belirgindir. Norepinefrin taşıyıcıları nöradrenerjik nöronların plazma zarlarında bulunurlar ve sinaptik aralıktaki norepinefrin geri alımında işlev görmektedir. Atomoksetinin etkisi özellikle prefrontal korteks bölgesinde presinaptik norepinefrin taşıyıcılarının inhibisyonunu sağlayarak dopamin ve nöradrenalin seviyelerini artırarak sağlanmaktadır. Atomoksetin oral yolla alındıktan sonra gastrointestinal sistemde tamamen emilmekte ve besinlerle etkileşmemektedir. Maksimum plazma konsantrasyonuna 1-2 saatde geçmektedir. Karaciğerde sitokrom P4502D6 enzim sistemi ile metabolize olmaktadır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmaktadır. Primer metaboliti 4-hidroksiatomoksetindir. Bütün metabolitleri idrar yoluyla 24 saat içinde vücuttan atılır. Atomoksetinin etki etmeye başlama süresinin yavaş olduğu bildirilmiştir. Tek ve iki doz arasında karşılaştırılma yapılmış ve bir fark tespit edilememiştir.

Tedaviye başlamada önerilen günlük doz 0,5 mg'dır. Komplikasyon olmadığı sürece onar gün aralıklarla kilo başına 0,8 , 1,0 ve 1,2 mg kademeli olarak doz artışı tavsiye edilmektedir. Uyku hali komplikasyonu gelişen hastalarda dozun bölünerek verilmesi uygun bulunmuştur. Maksimum dozun 1,4 mg/kg/gün ve 100 mg/gün'ü geçilmemesi önerilmektedir. Karaciğer rahatsızlığı olanlarda başlangıç dozu %25-50 oranında düşürülmektedir. Yapılan araştırmalarda atomoksetinin iyi tolere edildiği ve yan etkilerinin'de az olduğu saptanmıştır. Yan etkileri; karın ağrısı, kusma, iştahsızlık, uyku hali, sinirlilik, halsizlik, baş dönmesi ve dispepsi olarak bildirilmiştir [25].

2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analiz Testleri

2.3.1. Minium inhibisyon konsantrasyon (MIK)

Minimum inhibisyon konsantrasyon analizi mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan bir antimikrobiyal analiz yöntemidir. Makro ve mikro dilüsyon olmak üzere iki şekilde hazırlanmaktadır. Yöntem gecelik kültürü hazırlanan mikroorganizmaların belli konsantrasyonlar arasında ikişer katlı dilüsyonları hazırlanan kimyasallar ile uygun koşullarda inkübasyonu sonucu aktivitesi araştırılan maddenin mikroorganizma üzerine etkisinin belirlenmesini içermektedir [42].

2.3.2. Checkerboard (Dama Tahtası Deneyi)

Dama tahtası deneyi olarakta isimlendirilen checkerboard analizi araştırılacak olan iki farklı maddenin kombinasyonunu teşkil etmektedir. Ana stok solüsyonlar ve dilüsyonlar hazırlandıktan sonra 96'plakalara yatay ve dikey olacak şekilde dağıtılmaktadır. Üzerinde araştırılacak mikroorganizma suşu plakalara eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Inkübasyon sonrasında plaklara rezasurin boya verilerek ve tekrar inkübe edilerek renk değişimine göre sonuçlar alınmaktadır. Alınan sonuçlar FİK indeksi hesaplamasına göre sinerjistik, aditif, indiferan (etkisiz) ve antagonist etkileşim olmak üzere değerlendirilmektedir [43].

2.3.3. Time kill (Ölüm Kinetiği Deneyi)

Ölüm kinetiği analizi araştırılacak olan kimyasalların mikroorganizmalar üzerindeki zamana karşı ölümlerini tayin etmektedir. Ana stok solüsyonlar ve dilüsyonlar hazırlandıktan sonra 3 saat inkübasyona bırakılmaktadır. 3 saat inkübe edilen dilüsyonlar seyreltilir ve katı besiyerlerine inoküle edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Bunu sırasıyla 9. 12. ve 24- üncü saatler takip etmektedir. Örneklemeler hazırlandıktan 24 saat sonra katı besiyerlerinde gelişen 30-300 arasındaki koloniler değerlendirilerek sonuçlar alınmaktadır [42].

2.3.4. Gen ekspirasyon alışmaları

Gen ekspirasyon çalışmalarında kullanılan üç yöntem bulunmaktadır. Bunlar

1. qPCR
2. Mikroarray
3. RNA dizilemedir

Bu üç yöntemin amacı aynı olup yapılabilirlikleri ve ulaşılabilir sonuçları açısından farklılık göstermektedirler. Birinci metod ile çalışılmak istenen genlerin ekspirasyon seviyeleri aydınlatılmakta olup 2. ve 3. Yöntemde ise organizmanın tüm gen analizi yapılabilir. Mikroarray çalışmalarında ise özellikle hangi genlerle çalışılmak istendiği bilinmediğinde tercih edilmektedir. RNA seq ile mikroarray aynı amaca hizmet etmekte fakat RNAseq ile farklı ekspirasyon seviyelerine daha geniş bir çerçeveden bakılabilmektedir. DNA varyasyonları, yeni genlerin keşfi bu metod ile daha mümkündür. Bu projede daha geniş kapsamlı tarama yapmak üzere RNA seq analizi kullanılmıştır.

2.3.5. Transkriptom Analizi

Genetik materyalin fonksiyonel birimi olan gen, genom dizisinde lokasyonu belirlenebilen, transkripsiyonu yapılan, düzenleyici ve fonksiyonel birimleri olan bir bölgedir. Genom ise bir organizmada bulunan kromozomların ve bu kromozomların içinde yer alan genetik şifrelerin tamamını ifade etmektedir. Genomik, genetik materyalin işlevsel fonksiyonlarını kodlayan bütün genlerin teker teker birbirleri ve evre ile ilişkilerini incelemektedir [24].

Transkriptom tanımına bakıldığında bir hücre ve dokudaki gen transkriptlerinin (RNA) bütününü ifade eden bir kavramdır. Transkriptom analizinde dokuda bulunan hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA transkriptlerini eř zamanlı incelenmektedir. Örneklerde bulunan RNA miktarına bağlı, genlerin tamamını veya seçilmiş bir alt grubunun ekspresyon veya ifade edilme düzeyinin ölçülmesini amaçlamaktadır. Genler etki mekanizmalarını mRNA üretimi ile ortaya çıkarmaktadır [24]. Transkriptom analiziyle tek nükleotid değişimlerini, insersiyonları, delesyonları, translokasyonları ve kodlanmayan RNA'ları da incelemek mümkündür [27].

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerleri

- MHB (Mueller Hinton Broth) – Meat infusion 2,0 g/L , Casein hydrolysate 17,5 g/L , Starch 1,5 g/L
- SDB (Sabour dextrose Broth) – Peptone from meat 10,0 g/L , D(+) Glucose 20,0 g/L (Sabour d 2 % Dextrose Broth)
- SDA (Sabour dextrose Agar) – Peptone 10,0 g/L , D(+) Glucose 20,0 g/L , Agar-agar 17,0 g/L
- YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Broth) – Yeast extract 10,0 g/L , Peptone 20,0 g/L , 2 % Dextrose 20,0 g/L

Kimyasallar: Glibenklamid (antidiabetik), antidepresanlar grubunda; voinokamid, buspiron hidroklorid, gabapentin, karbamazepin, diprion, ketfapin fumarat, risperidon, olanzapin Anadolu Üniversitesi Farmakoloji ve Farmasötik Toksikoloji Laboratuvarlarından, fluoksetin ve atomoksetin Abdi İbrahim ilaç şirketinden, sertralin, escitalopram Nobel ilaç şirketinden, antifungal kontrol grubundan; flukanazol yine Nobel ilaç şirketinden temin edilmiş olup diğer kontrol grubu antibiyotikler ketokonazol ve kloramfenikol ise Farmasotik Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunmakta idi.

Fluorasan Boya: Resazurin 20 µg/mL steril distile su içinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1.’ de verilen mikroorganizmalar antimikrobiyal analizler sırasında kullanılan bakteri ve maya suşlarını göstermektedir.

Çizelge 3.1. Analizlerde kullanılan gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve maya suşları

Gram pozitif bakteriler	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
	<i>Staphylococcus aureus</i> NRRL B-767
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51922
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
	<i>Bacillus cereus</i> NRRL B-3711
	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL NRS-744
Gram negatif bakteriler	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 254992
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NRRL B-4420
	<i>Aeromonas spp.</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i> NRRL B-4420
Candidalar	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
	<i>Canida glabrata</i> ATCC 80030
	<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019

3.2. METOD

3.2.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi

Antidepresan ve antifungal ilaçlarının bakteri ve mayalar üzerine antibakteriyel ve antifungal etkilerini analiz etmek MİK testi uygulanmıştır.

Mikroorganizmaların gecelik kültürleri bakteriler için MHB'da, mayalar için SDB'da hazırlanmıştır. Çalışma sırasında kontrol antimikrobiyal olarak bakteriler için kloramfenikol; mayalar için ketakonazol ve flukanazol kullanılmıştır.

Kimyasal ajanların ana stokları Dimetil sülfoksit (DMSO)' da 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Kimyasallar 333-0.65 µg/mL ½ seri dilüsyonlar hazırlanarak 96'lık plakalara 100 µL aktarılmış ve bakterilerin son konsantrasyonları $1,0 \times 10^6$, mayaların son konsantrasyonları $2,5 \times 10^3$ olacak şekilde 100 µL inokülasyon yapılmıştır. Deneyler sırasında sadece besiyeri içeren, sadece kimyasal içeren ve mikrobiyal gelişimi kontrol etmek amacı ile mikroorganizma içeren kontrol kuyucukları çalışılmıştır. 24-36 saat içinde kuyucuklardaki gelişim resazurin 20 µL (20 µg/mL) eklenerek 6 saat inkübasyondan sonra renk değişimine bağlı olarak tayin edilmiştir. Üremenin olduğu kuyudan bir önceki konsantrasyon üremeyi durduran konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Anlamlı antimikrobiyal etki gösteren antidepresanlar bir sonraki aşamada değerlendirilmiştir.

3.2.2. Checkerboard analizi (dama tahtası) sinerji deneyi

MİK testi sonucu elde edilen veriler ışığında atomoksetinin *C.albicans* üzerine diğer ilaçlara göre daha etkin çıkması sonucu ve son zamanlarda artan ilaç direncine karşı aranan yeni ilaç formülasyonlarının çözümü için atomoksetin ve flukanazol kombinasyon çalışması ile devam edilmiştir.

C. albicans, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilopsis* gecelik kültürlerini hazırlamak amacı ile mayalar SDB' ye inoküle edilmiştir. Checkerboard deneyi için kimyasalların (atomoksetin ve flukanazol) 20 mg/mL ana stok solüsyonu DMSO'da hazırlanmıştır. Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra checkerboard yöntemine göre 96'lık plakalara yatay ve dikey olacak şekilde dağıtılmıştır. Dilüsyonların dağıtımına 4-üncü dilüsyon 250 µg/mL tüpünden başlanmıştır. Atomoksetin kimyasalının dilüsyonları 50 µl olacak şekilde dikey Flukanazol kimyasalının dilüsyonları ise 50 µL olacak şekilde

yatay olarak plaklara dağıtılmıştır. *Candida* suşlarının son konsantrasyonları $2,5 \times 10^3$ olacak şekilde 100 µL kuyucuklara ilave edilmiştir. Kontrol grubunda sadece besiyeri ve sadece *Candida* kültürleri kullanılmıştır. Plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda sonra plakalara 20 µL resazurin (20 µg/mL) eklenerek 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3. Time kill (ölüm kinetiği)

Ölüm kinetiği deneyinin amacı, zamana karşı analizi yapılacak olan maddenin mikroorganizmalara etki ederek hangi zaman aralığında öldürdüğünü tespit etmektir. Mikrobiyolojide ölüm kinetiği bakterilerin bakterisidal etkinliğini hedeflemektedir. Önceki deneylerden elde edilen olumlu sonuçlar ölüm kinetiği deneyi ile çeşitlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizma türlerinin *Candida sp.* olması nedeniyle fungisidal etkinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Time kill deneyi için 24 saatlik *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilopsis* suşlarının gecelik kültürü SDB (Sabour dextrose Broth) besiyerinde hazırlanmıştır. İnokülasyon işlemi için katı besiyeri olarak SDA (Sabour dextrose Agar) hazırlanmıştır. Deney sırasında kullanılan atomoksetin ve flukanazol'un stok çözeltileri 20 mg/mL olarak DMSO'da hazırlanmıştır. Dilüsyon aşamasından geçirilerek checkerboard yöntemine göre dilüsyonlar 96'lık plakalara 100 µL olacak şekilde transfer edilmiştir. *Candida* suşlarının son konsantrasyonları $2,5 \times 10^3$ olacak şekilde 100 µL olarak kuyucuklara ilave edilmiştir. Sadece kimyasal, sadece besiyeri ve sadece mikroorganizma içeren kontrol grupları kullanılmıştır. Deney süresince zamana bağlı örneklem alındığından ve bu hacimsel değişimin sonuçları etkilemesini önlemek için plakalar 5 paralel olarak hazırlanmıştır. Plakalar etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 3., 6., 9. 12. ve 24. saatlerde örneklem yapılmıştır. Plakalar hazırlandıktan sonra ilk örneklem 3. Saat sonunda yapılmış olup her bir kuyucuktan alınan 10 µL örnek SDA 'a besiyerine 990 µL steril distile su içerisinde seyreltilerek drigalski spatülüyle yayma ekim yapılacak şekilde inoküle edilmiştir. İnkübe edilen 6., 9., 12. ve 24-üncü saatlerde alınmıştır. Katı besiyerine yapılan bu yayma ekim işlemi sonrasında petrilere 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Time kill tekniğine göre 24 saat sonra 30-300 arasında gelişen koloniler anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. RNA İzolasyonu için Hücre Hazırlanması

Transkriptom analizi yapmak üzere atomoksetin flukanazol kombinasyonu ile ilaçla muamele edilmiş ve kontrol olarak ilaçla muamele edilmemiş *C. albicans* örneklerini hazırlamak üzere gecelik *C. albicans* kültürü YPD besiyerinde 30°C’de inkübe edilerek hazırlanmıştır. Gecelik kültürden; üç paralel ilaçlı örnek, üç paralel ilaçsız örnek olmak üzere OD 600:0.1 olacak şekilde 25 mL’lik YPD besiyerine 6 inokülasyon yapılmıştır.

3 saatlik inkübasyondan sonra erlenlerde gelişen *C. albicans*’ın 1mg/mL OD600 değeri belirlenmiş ve OD600:0.4 olduğu zaman atomoksetin-fluoksetin kombinasyonlarından 3 erlene atomoksetin 62.5 µL/mL ve flukanazol 0.75 µL/mL aktarılmış diğer 3 erlene ise aynı miktarda steril distile su eklenmiştir.

14 saat sonra erlenler çalkalamalı etüvden alınarak 5000 r.p.m’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücreler 50 mL’ik steril falkon tüplerine alınarak distile suyla 3 kez yıkanmıştır. Hazırlanan hücreler RNA izolasyonu için -80°C’de saklanmıştır.

3.2.5. RNA izolasyonu

Hazırlanan hücrelerin RNA izolasyonu “PureLink RNA Mini Kit (Ambion 12183018A, 12183025)” talimatına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla %2’lik mercaptoethanol, %96-100 etanol, zimoliyaz çözeltileri hazırlanmıştır.

- Bu çözeltilerden 200 µL alınarak 800 µL hücre kullanılmış olup 1 mL’ye tamamlanmıştır.
- Mikrosantrifüj tüpleri 500x g’de 5 dakika ve 4°C’de santrifüj edildikten sonra süpernatantları atılmıştır.
- 100 µL zimolaz pelletlere eklenmiştir ve 30-60 dakika inkübe edilmiştir.
- %2’lik mercaptoethanol’lü Lysis buffer 200 µL olacak şekilde eklenmiş ve vortekste karıştırılmıştır.
- Oda sıcaklığında 12,000 x g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant steril RNase-free mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- %96-100’lük etanol 220 µL tüplere eklenmiştir, vorteksenerek karıştırılmıştır.

- Kitle bulunan koleksiyon tüplerine 500 μ L aktarılmıştır.
- 12,000 x g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir, süpernatant atılmıştır.
- Son iki adım tekrarlanmıştır. 700 μ L wash buffer eklenerek 12,000 x g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak koleksiyon tüpleri yenilenmiştir.
- Etanol ile birlikte 500 μ L wash buffer iki eklenmiştir. 12,000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir, süpernatant atılmıştır. Son iki adım tekrarlanmıştır.
- Oda sıcaklığında 1 dakika 12,000 x g' de santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüplerinden alınarak normal tüplere alınmıştır. 50 μ L 1 RNase-free water tüplerin tam ortasına gelecek şekilde aktarılmıştır. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak oda sıcaklığında 12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Nanometre ölçümleri yapılarak istenilen konsantrasyona ulaşılmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirilen hücreler transkriptom analizine gönderilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon test bulguları

Bacillus cereus, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 35218, *Aeromonas spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 25922, *Yersinia spp.*, *Enterococcus faecalis* 51299, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* 29212 suşlarında ve *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* ve *Candida parapsilopsis* maya suşlarında antimikrobiyal aktivitesinin MİK test sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.1. , 4.2. ve 4.3.'te verilmiştir. Sonuçlar 24-36 saat içinde 96'lık plakalara 20 µL/mL resazurin verilerek 6 saat inkübasyondan sonra tayin edilmiştir.

Çizelge 4.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testinin bakterilerdeki sonuçları. (µg/mL). (-) herhangi bir sonuç alınmadığını ifade etmektedir

Bakteriler	Atomoksetin	Fluoksetin	Escitalopram	Sertralin	Kloramfenikol
<i>B.cereus</i>	166,5	41,62	-	10,40	10,40
<i>K. pneumoniae</i>	83,25	20,81	333	10,40	2,60
<i>E. coli</i> 35218	166,5	20,81	333	10,40	2,60
<i>Aeromonas spp.</i>	166,5	20,81	166,5	10,40	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	83,25	10,40	166,5	10,40	-
<i>S. aureus</i>	83,25	41,62	-	10,40	5,20
<i>E.coli</i> 25922	166,5	83,25	333	10,40	10,40
<i>Yersinia spp.</i>	83,25	41,62	333	20,81	1,30
<i>E. faecalis</i> 51299	166,5	41,62	-	10,40	83,25
<i>B. subtilis</i>	166,5	20,81	333	10,40	2,60
<i>P. aeruginosa</i>	83,25	166,5	-	20,81	20,81
<i>E. faecalis</i> 29212	166,5	20,81	166,5	10,40	-

Çizelge 4.2. Antidepresanların *Candida* türleri üzerine etkili MIK konsantrasyonları. ($\mu\text{g/mL}$). Minimum inhibisyon konsantrasyon testinin *Candida* türleri (-) herhangi bir sonuç alınamadığını ifade etmektedir

Candidalar	Atomoksetin	Fluoksetin	Escitalopram	Sertralin	Flukanazol	Ketokonazol
<i>C. albicans</i>	333	166,5	333	10,40	1,30	1,30
<i>C. krusei</i>	166,5	41,62	333	20,81	333	83,25
<i>C. glabrata</i>	333	166,5	-	41,62	20,81	10,40
<i>C. parapsilopsis</i>	166,5	20,81	-	20,81	166,5	83,25

Çizelge 4.3. Minimum inhibisyon konsantrasyon testinin *Candida* 'lardaki sonuçları ($\mu\text{g/mL}$). (-) herhangi bir sonuç alınamadığını ifade etmektedir

Antidepresanlar	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilopsis</i>
Karbamazepin	333	333	-	83,25
Ketfapin fumarat	-	83,25	333	41,62
Gabapentin	-	333	-	-
Olanzapin	-	-	-	333
Buspiron hidroklorid	-	-	-	-
Dipriyon	-	-	-	-
Risperidon	-	-	-	-
Voinoktamid	-	-	-	-
Glibenklamid	-	-	-	-

4.1.1. Checkerboard deneyi sonuçları

C. albicans, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilopsis candida* suşlarında yapılan kombinasyon deneylerinin sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Kombinasyonun etkinliğini belirlemek için FİK indeksi hesaplamasına göre sonuçlar aşağıdaki **Çizelge 4.4**'te gösterilmiştir. FİK indeksi hesaplaması

$$(\sum FİK) = FİK_a + FİK_b \quad (4.1)$$

$$\sum FİK \leq 0.5 \text{ ise sinerjist,}$$

$$> 0.5 - \leq 4 \text{ ise aditif veya indiferan,}$$

$$> 4 \text{ ise antagonist etki}$$

- FİK A maddesi için B madesinin varlığında A'nın MİK sayısal değerinin, tek başına A'nın MİK sayısal değerine bölümü
- FİK B maddesi için A madesinin varlığında B'nin MİK sayısal değerinin, tek başına B'nin MİK sayısal değerinin bölümünün toplamı kombinasyon etkinliğini belirlemektedir.

$$C. albicans \quad FİK A = \frac{3}{2} = \frac{31,25}{62,5} = 0,5$$

$$FİK B = \frac{7}{3} = \frac{1,95}{31,25} = 0,062 \quad 0,5+0,062=0,56 \quad (4.2)$$

$$C. krusei \quad FİK A = \frac{7}{2} = \frac{1,95}{62,5} = 0,031$$

$$FİK B = \frac{4}{5} = \frac{15,62}{7,81} = 2 \quad 0,031+2=2,031 \quad (4.3)$$

$$C. glabrata \quad FİK A = \frac{7}{1} = \frac{1,95}{125} = 0,015$$

$$FİK B = \frac{3}{5} = \frac{31,25}{7,81} = 4,001 \quad 0,015+4,001=4,016 \quad (4.4)$$

$$C. parapsilopsis \quad FİK A = \frac{7}{5} = \frac{1,95}{7,81} = 0,24$$

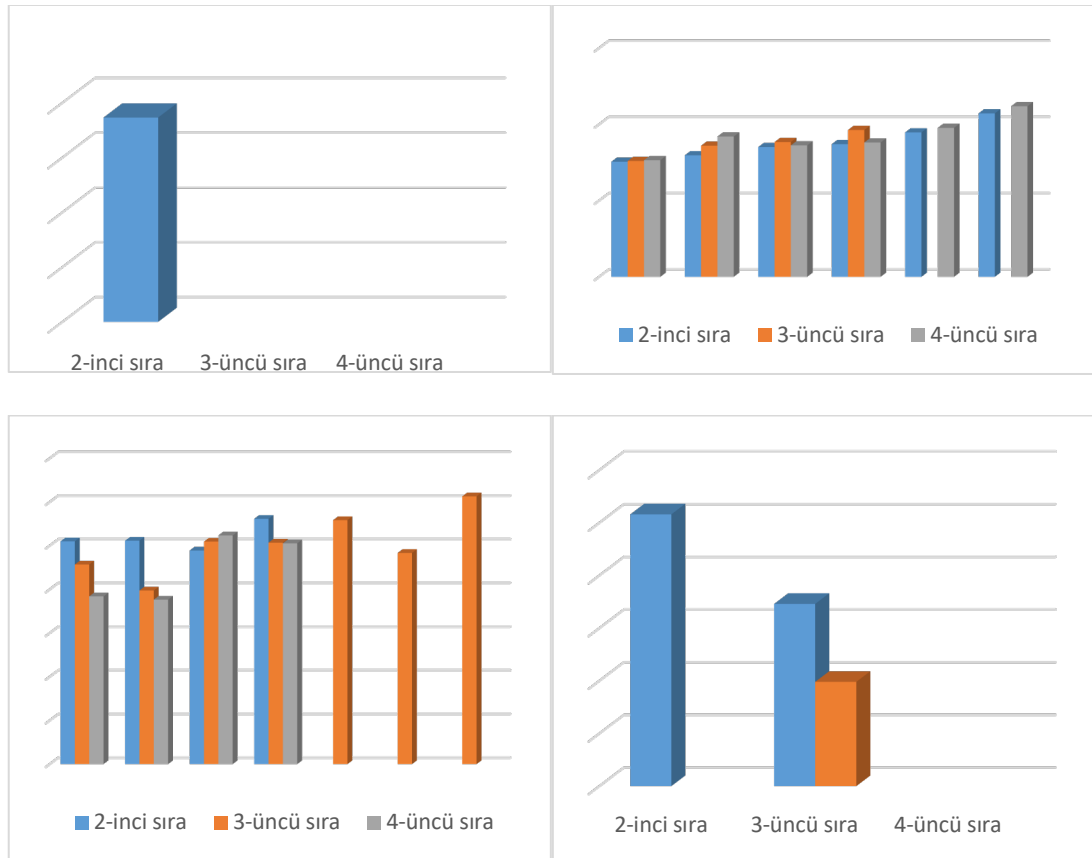
$$FİK B = \frac{4}{5} = \frac{15,62}{7,81} = 2 \quad 0,24+2=2,24 \quad (4.5)$$

Çizelge 4.4. *Candida* türlerinde atomoksetin ve flukanazol kombinasyonunun FİK hesaplaması sonucu

	Atomoksetin	FLukanazol		
	MİK (µg/L)	MİK (µg/L)	FİK (µg/L)	sonuç
<i>C. albicans</i>	62,50	31,25	0.56	sinerji
<i>C. krusei</i>	62,50	1,95	2.03	antagonist
<i>C. glabrata</i>	125	1,95	4.16	antagonist
<i>C. parapsilopsis</i>	7,81	1,95	2.24	antagonist

4.1.2. Ölüm kinetiği sonucu

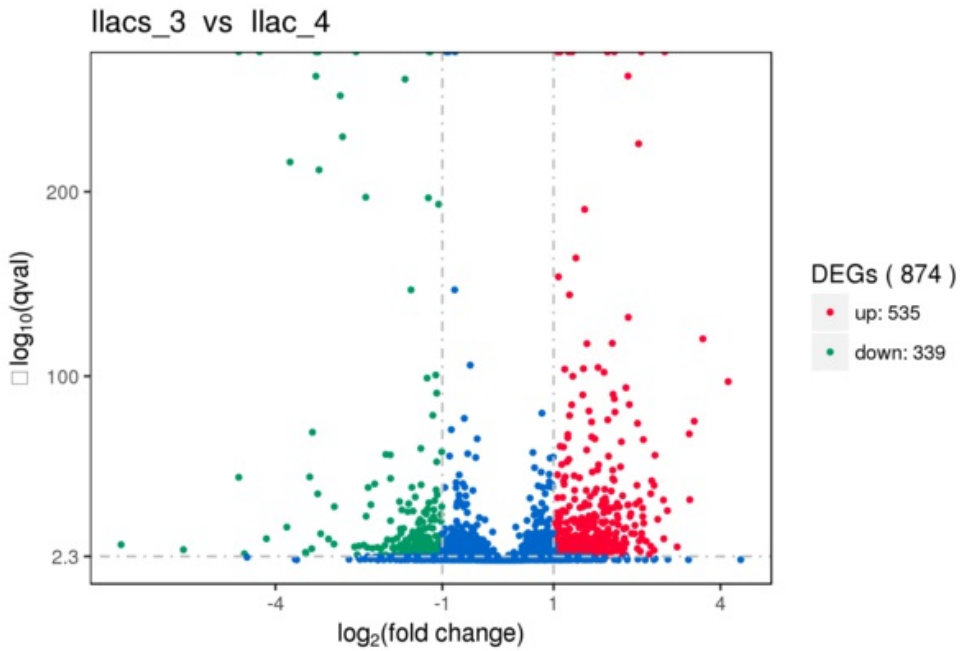
C. albicans 'taki atomoksetin ve flukanazol kombinasyonun ölüm kinetiği deneyi sonucunda 24-36 saat içinde etüvde katı besiyerinde SDA'da gelişen 30-300 arasındaki koloniler sayılmıştır. Sayılan bu koloniler $\log_{10}$ tabanına göre hesaplanarak logaritmaları alınmıştır. **Şekil 4.5**'te gösterilen grafikte bu logaritmik değerler yerleştirilerek grafik verisi elde edilmiştir. Grafik altıncı saatten itibaren üremenin başladığı ve giderek artan saatlerdeki üremenin aşırı bir fark göstermeksizin geliştiğini yansıtmaktadır. Buda fungisidal etkinin var olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.5. *C. albicans* üzerine atomoksetin ve flukanazol kombinasyonun ölüm kinetiği sonucu. 6., 9., 12. ve 24. saatlerdeki örneklemelerden elde edilen veriler. 2-inci, 3-üncü ve 4-üncü plakadaki örnekleme yapılan sırayı ifade etmektedir.

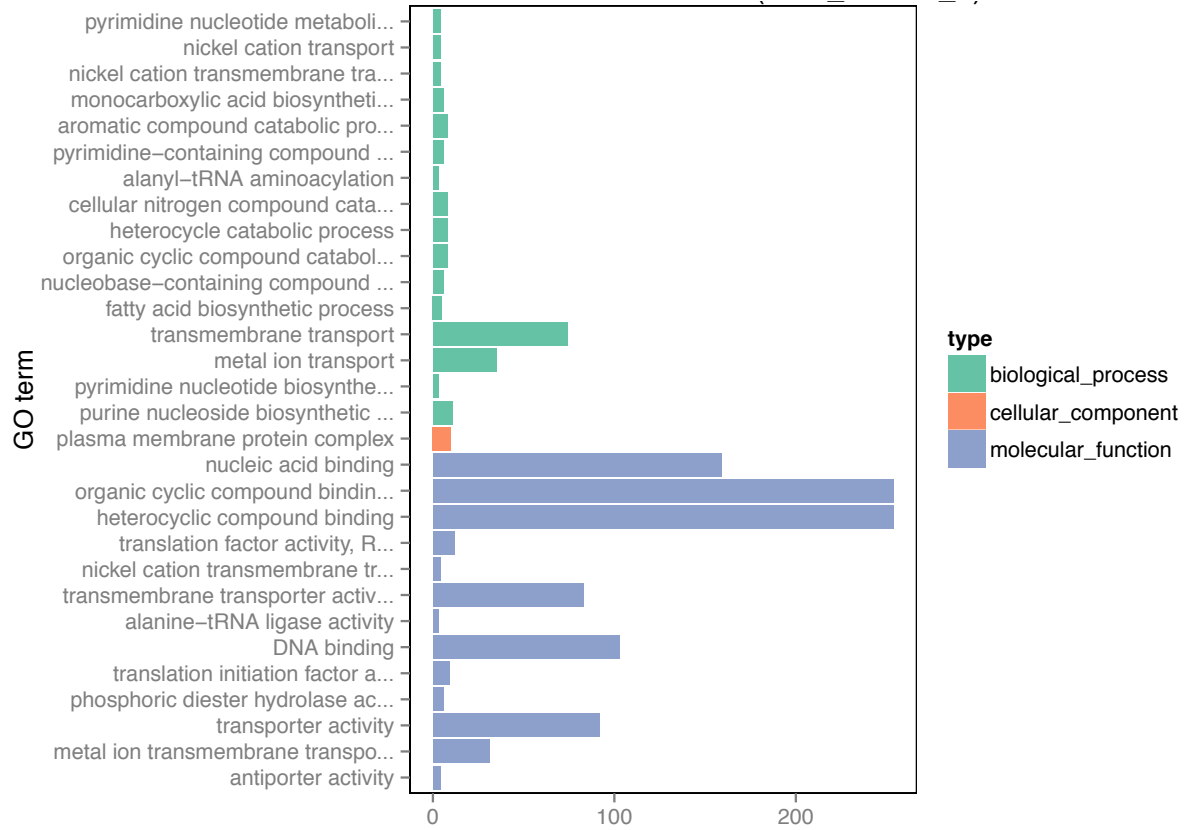
4.1.3. Transkriptom Analiz

Transkriptom analizi için ilaçla muamele edilmiş ve kontrol grubu yani ilaç ile muamele edilmemiş *C. albicans* hücrelerinin transkript profilleri RNA seq yöntemi ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Cluster oluşturulması BM laboratuvarları tarafından cBot Cluster Generation System using HiSeq PE Cluster Kit cBot-HS (Illumina) üretici talimatına göre oluşturulmuş ve kütüphane oluşumu Illumina HiSeq platform ile gerçekleştirilmiştir. FASTQ formatındaki ham datalar yüksek kaliteye sahip temiz veriler oluşturulmak üzere işlenmiştir. Referans genom ve model genom verileri TopHat v2.0.12 kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki farklı koşulun diferansiyel ekspresyon analizleri DESeq yöntemi ile analiz edilmiştir. Her iki grup için elde edilen p anlamlılık değerleri Benjamini ve Hochberg yaklaşımına göre düzeltilmiştir. $p < 0.05$ olan genler farklı ifade edilen genler olarak işaretlenmiştir. Bu anlamlı bulunan transkriptlerin biyolojik süreç ve biyokimyasal yollarının belirlenmesi için gen ontoloji (GO) analizi, KEGG analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre toplam 6102 gen haritalanmıştır. **Şekil 4.6.**'da verilen sonuca göre ilaçsız örneklerde ilaçlı örneklerle göre 535 genin ifadesi artmış. 339 genin ise ifade seviyesi azalmıştır.



Şekil 4.6. İlaçlı ve ilaçsız örneklerde farklı ifade edilen genler. Grafiğin x eksenini farklı örnekler arasında gen ifadelerindeki değişimi kat olarak ifade ederken y eksenini farklılıkların istatistiksel önemini belirtmektedir. Önemli şekilde ifadesi artan ve ifadesi azalan genler sırası ile kırmızı ve yeşil ile belirtilmiştir. İlaçlı ve ilaçsız örnekler arasında farklı bir şekilde ifade edilmeyen genler ise mavi renkte gösterilmiştir.

Farklı ifade edilen genlerin biyolojik süreçteki dağılımı, hücresel içeriği ve moleküler fonksiyonuna göre dağılımına bakıldığında **Şekil 4.7.**'de belirtildiği gibi kontrol grubu ve ilaçla muamele edilmiş örnek arasında toplam 30 anlamlı değişim olmak üzere biyolojik süreçler, hücresel içerik ve moleküler fonksiyonda farklılıklara rastlanmıştır.



Şekil 4.7. GO analizi sonucu ilaçlı ve ilaçsız örneklerdeki biyolojik süreçlerdeki, hücresel bileşenlerdeki ve moleküler fonksiyonlardaki değişimler. X eksenini ifadesi değişen genlerin yer aldığı 30 farklı süreci yansıtırken y eksenini ise bu süreçlerde farklı şekilde ifade edilen genlerin sayılarını ifade etmektedir.

İki farklı koşulda (ilaçlı ve ilaçsız) farklı ifade edilen genlerin hangi yollarla ilişkili olduğunu belirlemek için yapılan KEGG analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin özellikle 85 farklı yolak üzerinde etkili olduğu bu yollardan ribozom biyogenez, yağ asidi metabolizması yollarında diğerlerine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Günümüzde artan ilaç dirençlerine karşı ve bu dirençlerin beraberinde getirmiş olduğu komplikasyonlar önemli sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunlar toplumda sosyal ekonomik dengeyi sarsmakla birlikte refah seviyesini etkilemektedir. Bireyin sağlıklı ve rahatsız olması birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar aile kurumunda mutsuzluk yaratarak psikolojik açıdan ek sorunlara neden olabilmektedir. Bu nedenle klinikte ve araştırma laboratuvarlarında bireye yönelik tedavi sistemlerinin geliştirilmesi gibi yeni yaklaşımlar söz konusudur. Farmakoloji alanında ise araştırmacılar bu sorunların çözülebilmesi için yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi yönünde araştırmalarını sürdürmektedir. Farklı ilaç gruplarından gelen ilaçların kombinasyon çalışmaları yine bu amaca yönelik yeni tedavi yöntemleri geliştirmeyi hedeflemektedir. Bu çalışmada da yer alan atomoksetin ve flukanazol kombinasyonunun sinerjik etki yaratması yeni bir ilaç formülasyonu olma yönünde umut vermektedir.

Antibiyotiklerle yapılan kombinasyon çalışmalarında her bir antibiyotikğin farklı hedef molekülüne bağlanmasını ve daha geniş bir etki spektrumu ortaya çıkarmasına olanak sağlar. Kombinasyon çalışmalarında sinerjik etki farklı hedefleri farklı yollardan veya aynı yoldan inhibe etmesi ile meydana gelir. *Mycobacterium* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan çoklu ilaç kombinasyonunda, hücre duvarında bulunan mikolik asit (izoniazid), arabinogalaktan (etambutol) farklı iki ilaç ile inhibe edilirken, protein ve nükleik asit sentezi de streptomisin, rifampin gibi antibiyotiklerle engellenmesi buna örnek verilebilir. Bu sinerjik etki ilaç dirençlerinin önüne geçmesi, toksisiteyi azaltması ve geniş bir antimikrobiyal etki yaratması gibi üstünlüklere sahiptir. Bu çalışmada atomoksetin ve flukanazol kombinasyonu ile sinerjik etki 0.56 µg/L tespit edilmiştir. Antibiyotik direncinin doğada bulunan mikroorganizmalar arasında olmasıyla birlikte klinik direnç ve çevre mikroorganizmalarında bulunan direnç ile sıkı bir ilişki içinde olduğu bulguları giderek artmaktadır [32].

Antidepresanların klinikte potansiyel antifungal aktiviteleri ilk kez; PMDD (premenstrual dysphoric disorder) ve VVD (vulvovaginal candidosis) den muzdarip olan üç hastanın sertraline ile tedavi edilmesi sonucu gözlemlenmiştir. Hastalarda VVC ile ilgili semptomların tamamen yok olduğu ve tedavi durdurulduktan sonra da hastanın iyiye gittiği tespit edilmiştir. Bu klinik bulgudan sonra sertralinin in vitro antimikrobiyal

etkinliği *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus spp.* *Candida spp.*, ve *Cryptococcus neoformans* üzerine gösterilmiştir [33]. LasFlörl ve ark., yaptıkları çalışma ile sertraline in antikandidal aktivitesini göstermiş ve araştırmacılar yaptıkları bir başka çalışma ile fluoxetine, seroxate, paroxetine sertraline ve reboxetin in fungisidal etkisine *Aspergillus* izolatları üzerinde bakmışlar ve sertralini takiben fluoksetinin antifungal etkinliğinin diğer ilaçlara göre daha yüksek olduğunu ve diğer ilaçların ise karşılaştırılabilir bir etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında *Candida* suşları üzerinde sertralinin MİK verileri 41,62-10,40 µg/L aralığındadır [34].

SSRI'lar dışında yapılan çalışmalar ile farklı MAOI'lerin antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmış ve genital herpes ve solunum yolu enfeksiyonları üzerine etkinliği belirlenmiştir fakat etki mekanizmaları ile ilgili spesifik bir referans bulunmamaktadır. Diğer bir sınıf olan TCA ların ise antimikrobiyal etkinliklerinin bakteriyel plazmitler ve DNA giraz üzerine etkili olduğu belirlenmiştir [35].

Bir veya daha fazla benzen halkasına sahip bileşiklerin antimikrobiyal etkisi olduğunu savunmuş ve bu bağlamda trisiklik antidepresan ilaçlardan amitriptyline'in antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır. Amalesh ve ark., 2012 yaptıkları çalışmada 253 izolat kullanmışlardır. İlacın özellikle *Staphylococcus*, *Bacillus* türleri ve *Vibrio cholerae* üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. *Streptococcus faecalis*, *Proteus spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia spp.* nin ise ilaca karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Sertralin bu çalışmada *B. cereus* üzerinde 10,40 µg/L kaydadeğer bir sonuç vermiştir.

Sertraline HCl nin *in vitro* ve *iv vivo* antimikrobiyal potansiyelini bakteri izolatları ve *Candida* türleri üzerine araştırmış ve sertralinin zaman ve doz bağımlı etkisi olduğunu belirlemişlerdir [36].

Oliveira ve ark., 2017 yaptıkları çalışma ile sertraline'nin tek ve flukanazole ile kombine antimikrobiyal etkinliğini farklı *Candida* türleri üzerine denemişlerdir. MIC değerlerinin 9.8 µg/mL'den 78µg/mL'ye kadar değiştiğini sadece *Candida sphaerica* üzerine etkili MIC değerinin 4.9 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak atomoksetinin *C. albicans*'taki tek başına MİK değerı 333 µg/L, flukanzolünde 1,30 µg/L elde ettik. Sertralinin flukanazole ile kombine kullanımı ile birlikte dirençli suşlar için MİK değerinin 64 kat kadar dıştığı belirlenmiştir. Özellikle dirençli suşlar üzerine sinerjik etkinin görölmesi oldukça önemlidir [33].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MİK analizi ile *C. albicans* üzerine atomoksetinin antimikrobiyal etkisi 333 µg/mL tespit edilmiştir. Kullanılan bütün antidepresanların MİK analizinde *C. albicans* suşunda antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir. Karbamazepin'in *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi de 333 µg/mL olarak değerlendirilmiştir. Güçlü bir antifungal ajan olan ve aynı zamanda kontrol grubu olarak kullanılan flukanazolün *C. albicans* üzerindeki MİK değeri 1,30 µg/mL'dır. Yine kontrol amaçlı kullanılan diğer bir antifungal ajan olan ketokonazolün etkisi de 1,30 µg/mL'dır. Alınan tüm bu olumlu sonuçlar ile çalışmaların seyrini *C. albicans* üzerine yoğunlaştırmıştır

Güçlü ve klinik başarısı yüksek olan antidepresanlardan atomoksetin ve antifungal olan flukanazolün kombine kullanımı checkerboard analiziyle aydınlatılmıştır. Bu analiz ile birlikte bu iki kimyasalın *C. albicans* üzerine sinerjistik etki yaratması yeni bir ilaç olabilmesi yolunda önem arz etmektedir. Bu iki maddenin sinerjistik etkisi FİK indeksine göre hesaplanmıştır. Atomoksetinin 62,5 µg/mL MİK değeri ve flukanazolün 31,25 µg/mL MİK değeri ile FİK değeri 0,56 sinerjistik sonucu kaydedilmiştir.

Ölüm kinetiği analizi ile yapılan araştırmada atomoksetin ve flukanazol maddelerinin *C. albicans*' ta 6., 9., 12. ve 24. saatlerde yapılan örneklemeler ile üremenin 6-ıncı saatten başlayıp 24-üncü saate kadar artmadığı ve stabil kalması gözlemlenmiştir. Ölüm kinetiği analizinde katı besiyerlerinde baz alınan 30-300 arasında gelişen koloniler bu analizdede bu sayı aralığını korumuştur. Böylece fungisidal etkinin varlığı söz konusu olmaktadır.

Antimikrobiyal analizleri yapılan atomoksetin ve flukanazolün ve elde edilen antimikrobiyal sonuçlar moleküler çalışmalarla transkriptom analizi yapılarak hangi genler üzerine etkili olduğu aydınlatılmıştır. Bunun için ilaçla muamele edilmiş ve edilmemiş *C. albicans* izolatlarının RNA izolasyonu yapılarak transkriptom analizine tabi tutulmuştur. Bu analiz ile ilaçsız *C. albicans* suşlarının 22 genin ifadesi değişirken, ilaçlı örneklerde 49 genin ifadesinin değiştiği aydınlatılmıştır. Bu çalışma ile hedeflenen antimikrobiyal aktivite ve elde edilen pozitif sonuçlar gün geçtikçe artan ilaç ihtiyaçlarına karşı umut kaynağı olmaktadır. Bu antimikrobiyal etkinin yakalanması için kullanılan yöntemler ve elde edilen veriler ile bilim dünyasına ve literatüre katkı sağlanılmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Topal, M., Şenel, G., Arslan, E. ve Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü dergisi*, 31(3), 121-127.
- [2] Yong Tan, S. and Tatsumura (2015). Alxander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Medical Journal*, 56(7), 366-367.
- [3] Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, A. (2002). Antifungallerin sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanımı ve duyarlılık denyleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 33, 261-280.
- [4] Kuş, C. ve Alp, M. (2002). Sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yeni hedefler ve yeni bileşikler. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 91-131.
- [5] Doğan, O. (2006). Antidepresan ilaçların klinik kullanımları. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Blimleri Dergisi*, 2(1), 32-40.
- [6] Gündüz, K. (2003). Sistemik antifungal ilaçların güvenilirliği. *Türkderm*, (37), 294-301.
- [7] Güneş, G. (2011). Çocukluk çağı fungal enfeksiyonlar. *Türkderm*, (2), 109-16.
- [8] Somer, A. (2012). Pediatrik hastalarda antifungal tedavi stratejileri. *Ankem dergisi*, 26(ek2), 298-304.
- [9] Köksal,İ. ve Aksoy, F. (2008). Azoller. *Flora dergisi*, 13(3), 111-121.
- [10] Birol, A. ve Peksarı, Y. (2000). Antimikotik tedavide yenilikler. *Türkiye Klinik dermatoloji*,(10), 262-269.
- [11] Owens, J.N., Skelley, J.W., and Kyle,J.A. (2010). The fungus among us. *An antifungal review, U.S Pharm*, 35(8), 44-56.
- [12] American Society of Health System Pharmacists, Inc, Dynamed (internet). Ipswich (MA):EBSCO information services.1995-Record No. 233400 Flucanazole ; (updated 2011 august 03, cited 2017 december 13).
- [13] Öncel, S. ve Keçeli, S. (2018). Flucanazole. *Mantar dergisi*, (1), 67-75.

- [14] Çubuk, G. ve İnce, S. (2015). Oral antidiyabetik ilaçlar. *Kocatepe veteriner dergisi*, 8(1), 95-102.
- [15] Sacitoğlu, Ö. (2001). Yaygın anksiyete bozukluğunun tedavisi ve yeni yaklaşımlar. *Klinik psikofarmakoloji bülteni*, (11), 60-77.
- [16] Karataş, G., Tamam, L. ve Özpoyraz, N. (2003). Anksiyete bozukluklarında gabapentin tedavisi. *Klinik psikofarmakoloji bülteni*, (13), 37-42.
- [17] Çetinay Aydın, P., Akyalçın, S. ve Mete, L. (2009). Anksiyete bozukluklarının tedavisinde antiepileptik ilaçların kullanımı. *Psikiyatride güncel yaklaşımlar*, (1), 80-94.
- [18] Çetinkaya, Y., Sezikli, H., Ekmekçi, D., Baştuğ Gül, Z., Tutkavul, K. ve Tireli, H. (2014). Epilepsi hastalarında karbamazepin veya volvorik asit kullanımının kemik metabolizmasına etkisi. *Epilepsi*, 20(1), 29-34.
- [19] Alhan, E. ve Alabaz, D. (2004). Çocukta ateşin tedavisi. *ANKEM dergisi*, 18(ek2), 208-26.
- [20] Hoccoğlu, Ç., Hıdıroğlu, H. ve Kandemir, G. (2009). Ketiapin kullanımı sırasında ortaya çıkan sinüs taşikardisi: üç olgu sunumu, (9), 55-58.
- [21] Ersöz Alan, B. ve Çengel Kültür, E. (2014). Ergenlik öncesi risperidon kullanımı: meta analitik değerlendirme. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi*, (57), 78-86.
- [22] Cansever, A. ve Battal, S. (2000). Olanzapin farmakolojik özellikleri ve psikotik bozuklukların tedavisinde etkinliği. *Klinik psikiyatri*, ek (1), 22-28.
- [23] Sarı Gökten, E. (2018). Dikat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunda metilfenidat, atomoksetin ve kombine tedavinin etkinliği. *Çukurova tıp dergisi*, 43 (suppl 1), 15-23.
- [24] Kayaalp, L. (2008). Dikat eksikliği hiperaktivite bozukluğu. İ. Ü. Cerahpasa tıp fakültesi sürekli tıp eğitim etkinlikleri. *Türkiyede sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar sempozyum dizisi* no:62, 147-152.
- [25] Yıldız, Ö., Karakaya, I. ve Çakın Memik, N. (2007). Atomoksetin: çocuk ve ergenlerdeki etkinliği ve yan etkileri. *Çocuk ve gençlik ruh sağlığı dergisi*, 14(2).

- [26] Başaran, E., Aras, S. ve Cansaran Duman, D. (2010). Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 67(2), 85-96.
- [27] Sarıman, M. vd., (2015). Yeni nesil dizileme teknolojisi ile transkriptom analizi. *Deneysel tıp araştırma enstitüsü dergisi*, 5(10), 51-59.
- [28] Savaş, A.H., Coşkun, A. ve Arkonaç, O. (1994). Yeni bir antidepresan sertralin. 7(3), 46-48.
- [29] Duran, A. (1999). Depresyon tedavisinde hastaya yaklaşım, farmakoterapi prensipleri, trisiklik ve tetrasiklik antidepresanlar, SSRI'ler ve SNRI' ler. *Depresyon, somatizasyon ve psikiyatrik aciller sempozyumu*, 93-106.
- [30] Mırsal, H., Kalyoncu, A. ve Pektaş, Ö. (2002). Fluoksetin kullanımı ile ilişkili ekimoz olgu sunumu. *Türk psikiyatri dergisi*, 13(4), 320-324.
- [31] Özaras, R., Tabak, F. ve Öztürk, R. (2002). Antibiyotikler. *Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi*, 55-82.
- [32] Aktaş, G. (2014). Antibiyotik kombinasyonları ve sinerjistik etkileşimleri. *Türk mikrobiyal cem dergisi*, 44(2), 47-55.
- [33] Oliveira, A. vd., (2017). Antifungal activity of antidepressant sertraline against *Candida* species in vitro: A potential beneficial association with flucanazole. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. 5(1), 1095.
- [34] Lass-Flörl, C., Dierich, M.P., Fuchs, D., Semenitz, E. and Ledochowski, M. (2001). Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001,48,775-779.
- [35] Macedo, D. vd., (2017). Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implication of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. *Journal of Affective Disorders* 208, 22-32.
- [36] Amalesh, S., Debprasad, C., Chandrima, S., Ananda, D. J., Soma, G., Anurup M., Ananya, B., Oliver, H., Jorn, C. B., Jette, E. K., (2012). Evaluation of in vivo and in

vitro antimicrobial activities of a selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride, *Anti-Infective Agents*, 10, 95-104; 2012.

[42] http-1: <http://www.klimik.org.tr/2012/02/128201112107-49>. (Erişim tarihi: 02.2012).

[43] Bal, . (1999). Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması. *Flora dergisi*, 4(4), 219-229.