



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Galleria mellonella* YANIK YARA ENFEKSİYON MODELİNDE
YAYGIN PATOJEN BAKTERİLERE KARŞI FAJ TERAPİ VE
HÜCRE İÇERMEYEN LAKTİK ASİT BAKTERİ KÜLTÜR
SIVILARININ TEDAVİ AMAÇLI KOMBİNE KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mine EĞİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Trabzon-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mine EĞİN

İthaf

Bu yüksek lisans, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ders ve tez sürecim boyunca bilgi birikimi ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan, bu yolda emin adımlar ile devam etmemi sağlayan, kıymetli danışmanım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a;

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerini paylaşarak gelişimime katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Metin SANCAKTAR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Merve CORA'ya,

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimiyle her zaman destek olan Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, Laboratuvar çalışmalarında her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen Dr. Ahu REİS ve Neslihan AKARSU'ya; istatistiksel analizlerde desteği için Dr. Zeynep A. KOCER'e,

Bu süreçte manevi desteğini esirgemeyen, her daim yanımda olan tüm dostlarıma;

Hayatım boyunca yanımda olarak beni bugünlere taşıyan, sevgili annem Hanife ve babam Ömer EĞİN'e ve canım kardeşlerime;

Hayatımın her anında yanımda olarak desteğini esirgemeyen, sabrı ve sevgisiyle bana güç veren sevgili Arif Yunus ŞEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Mine EĞİN

Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TYL-2024-16172).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR

xiii

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. Deri

4

2.1.1. Derinin Yapısı

4

2.2. Yanık Nedir?

5

2.2.1. Yanık Epidemiyolojisi

5

2.2.2. Yanık Yara Sınıflandırılması

5

2.3. Yanık Yara Enfeksiyonları ve Yaygın Patojenler

7

2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

8

2.3.2. *Staphylococcus aureus*

9

2.3.3. *Klebsiella pneumoniae*

10

2.3.4. *Escherichia coli*

11

2.3.5. *Acinetobacter baumannii*

12

2.3.6. *Staphylococcus epidermidis*

13

2.3.7. *Enterococcus faecalis*

14

2.4. Bakteriyofajlar ve Genel Özellikleri

15

2.4.1. Bakteriyofajların Tarihçesi

15

2.4.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

16

2.4.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri	19
2.4.4. Bakteriyofaj Terapi	20
2.5. Laktik Asit Bakterileri	22
2.5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	22
2.5.2. Laktik Asit Bakterilerinin Kullanımı ve Önemi	23
2.6. <i>Galleria mellonella</i>	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Gereç	26
3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	26
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	26
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması	27
3.2.2. Kimyasal ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	27
3.2.3. Bakteri Suşları, Bakterilerin Üretilmesi ve Stoklanması	27
3.3. Fajların Zenginleştirilmesi	28
3.3.1. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması	30
3.3.2. Yüksek Titre Faj Lizatlarının Hazırlanması ve Saklanması	30
3.3.3. Faj Titresinin Belirlenmesi	31
3.3.4. Fajların Konak Aralığının Belirlenmesi	31
3.3.5. Fajların Elektron Mikroskopik Morfolojileri	31
3.3.6. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabilitelerinin Saptanması	31
3.3.7. Fajların Optimum Enfektivite Değerlerinin Belirlenmesi	32
3.3.8. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi	32
3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Hücresiz Kültür Sıvılarının Hazırlanması	33
3.4.1. Laktik Asit Hücresiz Kültür Sıvılarının Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi	33
3.4.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi	33
3.4.3. Laktik Asit Hücresiz Kültür Sıvılarının Faj-Konak Enfeksiyonuna Etkisinin Belirlenmesi	33
	37

3.5. <i>G. mellonella</i> 'nın Üretilmesi ve Enfeksiyon Testlerinde Kullanılacak Larvaların Elde Edilmesi	34
3.5.1. Patojen Bakterilerin <i>G. mellonella</i> Larvaları için Öldürücü Enfeksiyon Dozlarının Belirlenmesi	34
3.6. <i>G. mellonella</i> Yanık Yara Enfeksiyon Modelinin Oluşturulması, Faj ve LAB Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Uygulanması	35
4. BULGULAR	37
4.1. Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi	37
4.2. Litik Etkili Fajların ve Konak Spektrumlarının Saptanması	37
4.3. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması	39
4.4. Faj Titrelerinin Belirlenmesi	40
4.5. Fajların Elektron Mikroskopik görüntüleri	40
4.6. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabiliteleri	42
4.7. Fajların Optimal Enfeksiyon Koşullarının Belirlenmesi	44
4.8. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi	45
4.9. Laktik Asit hücresiz kültür sıvılarının antibakteriyel etkisinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi	48
4.10. Laktik Asit Hücresiz kültür sıvılarının Faj-Konak Enfeksiyonuna Etkisinin Belirlenmesi	49
4.11. Patojen Bakterilerin <i>G. mellonella</i> Larvaları için Öldürücü Enfeksiyon Dozlarının Belirlenmesi	50
4.12. <i>Galleria mellonella</i> Yanık Yara Enfeksiyon Modelinin Oluşturulması, Faj ve LAB Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Uygulanması	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
6. ÖNERİLER	73
7. KAYNAKLAR	74
EKLER	87
EK 1. Etik Kurul Onayı	87
ÖZGEÇMİŞ	88

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Genom tiplerine göre bakteriyofajların sınıflandırılması	18
Tablo 2. Çalışmada kullanılan bakteri türleri ve suşları	29
Tablo 3. <i>G. mellonella</i> larvalarında tek ve iki doz tedavi uygulama rejimi	36
Tablo 4. Fajların <i>Staphylococcus aureus</i> klinik izolatlarına karşı etkinliği	37
Tablo 5. Fajların <i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinik izolatlarına karşı etkinliği	38
Tablo 6. Fajların <i>Escherichia coli</i> klinik izolatlarına karşı etkinliği	38
Tablo 7. Fajların plak morfolojik özellikleri ve titreleri	40
Tablo 8. <i>L. reuteri</i> 1 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak <i>E. coli</i> üzerine etkisi	49
Tablo 9. <i>L. reuteri</i> 1 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak <i>P. aeruginosa</i> üzerine etkisi	49
Tablo 10. <i>L. reuteri</i> 1 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak <i>S. aureus</i> üzerine etkisi	50
Tablo 11. <i>L. plantarum</i> 16 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak <i>E. faecalis</i> üzerine etkisi	50
Tablo 12. <i>G. mellonella</i> larvaları için patojen bakteri suşları ile öldürücü enfektif dozların belirlenmesi	51
Tablo 13. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları	54
Tablo 14. <i>E. coli</i> ATCC 35218 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları	58
Tablo 15. <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları	62
Tablo 16. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Yanık yaralanması sınıflandırması ve derinliği	7
Şekil 2.	Bradley'e göre Bakteriyofaj Sınıflandırması	17
Şekil 3.	Ackermann'a göre bakteriyofaj sınıflandırması	17
Şekil 4.	<i>Myoviridae</i> faj T4, <i>Podoviridae</i> faj ϕ 29ve <i>Siphoviridae</i> faj TP901'in yapısı	18
Şekil 5.	Fajların yaşam döngüsü	20
Şekil 6.	<i>Galleria mellonella</i> dişi ve erkek birey ve yaşam döngüsü	25
Şekil 7.	Fajların plak morfolojileri	39
Şekil 8.	Φ ECO 35, Φ EFE 2, Φ SA 43 ve Φ PAG 2 fajlarının elektron mikroskop görüntüleri	41
Şekil 9.	Fajların farklı sıcaklık ve pH koşullarına karşı stabiliteleri.	43
Şekil 10.	Φ ECO35, Φ EFE 2, Φ SA 43 ve Φ PAG 2 fajlarının optimum bakteriyolitik aktivitelerinin farklı enfeksiyon çokluğu değerleri	45
Şekil 11.	Fajlarının tek aşamalı gelişme grafikleri	47
Şekil 12.	LAB hücresiz kültür sıvılarının mikroorganizmalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları	48
Şekil 13.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile oluşturulan <i>G. mellonella</i> yanık yara enfeksiyon modelinde faj PAG 2 ve <i>L. reuteri</i> 1 CFE kombine tedavi etkinliği	52
Şekil 14.	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları	55
Şekil 15.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ile oluşturulan <i>G. mellonella</i> yanık yara enfeksiyon modelinde faj ECO 35 ve <i>L. reuteri</i> 1 CFE kombine tedavi etkinliği	56
Şekil 16.	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları	59

Şekil 17. <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ile oluşturulan <i>G. mellonella</i> yanık yara enfeksiyon modelinde faj SA 43 ve <i>L. reuteri</i> 1 hücreli kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği	60
Şekil 18. <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları	63
Şekil 19. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ile oluşturulan <i>G. mellonella</i> yanık yara enfeksiyon modelinde faj EFE 2 ve <i>L. plantarum</i> 16 hücreli kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği	64
Şekil 20. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ile enfekte edilen <i>G. mellonella</i> larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları	67



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

CFE	Hücresiz kültür sıvısı (cell-free extract)
CFU	Colony Forming Unit
dak	Dakika
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LB	Luria Bertani
µL	Mikrolitre
MOI	Multiplicity of Infection
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PEG	Polietilen Glikol
PFU	Plaque Forming Units
TEM	Transmission Electron Microscope
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

ÖZET

***Galleria mellonella* Yanık Yara Enfeksiyon Modelinde Yaygın Patojen Bakterilere Karşı Faj Terapi ve Hücre İçermeyen Laktik Asit Bakteri Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Kombine Kullanım Potansiyelinin Araştırılması**

Yanık yaralanmaları, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olup, enfeksiyonlara bağlı ölümlerle ilişkilendirilmektedir. Mevcut tedavi yöntemleri iyileşmeyi zorlaştırmakta, bu nedenle yeni ve etkili yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, yanık yara enfeksiyonlarının sık görülen patojenleri kullanılarak *Galleria mellonella* larvalarında bir yanık yara enfeksiyon modeli geliştirilmiş ve laktik asit bakterilerinin hücresiz kültür sıvıları (cell-free extract, CFE) ile litik bakteriyofajların kombine tedavi potansiyeli araştırılmıştır. Enfeksiyon, yaygın yanık yara patojenleri olan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* suşları ile oluşturulmuştur. Tedavide *Lactobacillus reuteri* ve *L. plantarum*'a ait CFE'ler ile geniş konak spektrumuna sahip ΦECO 35, ΦSA 43, ΦPAG 2 ve ΦEFE 2 fajları kullanılmıştır. Fajlar elektron mikroskopisi ile morfolojik olarak, konak aralığı, sıcaklık, pH stabiliteleri, latent dönem ve patlama büyüklüğü gibi parametrelerle karakterize edilmiştir. Larvalar (180–250 mg) dört gruba ayrılarak ($n \geq 10$): kontrol (fosfat tamponu), yalnızca faj, yalnızca CFE ve faj+CFE kombinasyonu olmak üzere tedavi edilmiştir. Termal hasar sonrası enfeksiyon oluşturulan larvalara tedaviler tek ve iki doz olarak uygulanmış, sağkalım oranları 96 saat boyunca takip edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, *P. aeruginosa* enfeksiyonunda faj+CFE kombinasyonunun tek dozunda 96. saatte sağkalım ortalama %75, iki dozunda ise %90 olarak korunmuştur. *E. coli* enfeksiyonunda kombinasyon tedavisiyle sağkalım tek dozda ortalama %85, iki dozda %90 seviyesine çıkmıştır. *S. aureus* enfeksiyonunda kombinasyon tedavisinde sağkalım tek dozda %80, iki dozda en az %85, *E. faecalis* enfeksiyonunda ise sağkalım tek dozda ortalama %70, iki dozda ortalama %75 oranında kalmıştır. Fosfat tamponu kontrol gruplarında sağkalım %0-20 gözlenmiştir. Bu sonuçlar, litik fajlar ile LAB CFE'lerin kombinasyonunun yanık enfeksiyonlarının tedavisinde sinerjik bir etki göstererek sağkalım oranlarını artırabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle iki dozluk uygulamalarda sağkalımın belirgin biçimde yükseldiği gözlenmiştir. Kombine tedavi, tekli uygulamalara kıyasla daha etkili bir alternatif olarak öne çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj Tedavisi, *Galleria mellonella*, Hücresiz Kültür Sıvısı, Laktik Asit Bakterileri, Yanık Yara Enfeksiyonu

ABSTRACT

Exploring the Potential of Combining Phage Therapy and Cell-free Culture Supernatant of Lactic Acid Bacteria for Treating Common Pathogenic Bacteria in a *Galleria mellonella* Burn Wound Infection Model

Burn injuries are a significant public health concern worldwide and are often associated with infection-related mortality. Existing treatment methods make the healing process challenging, highlighting the need for new and effective therapeutic approaches. In this study, a burn wound infection model was developed in *Galleria mellonella* larvae using common burn wound pathogens, and the therapeutic potential of combining cell-free extracts (CFEs) from lactic acid bacteria (LAB) with lytic bacteriophages was investigated. Infections were established using the prevalent burn pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, and *Escherichia coli*. The treatments involved CFEs derived from *Lactobacillus reuteri* and *L. plantarum*, in combination with broad-host-range phages Φ ECO 35, Φ SA 43, Φ PAG 2, and Φ EFE 2. The phages were characterized morphologically by electron microscopy, as well as by parameters such as host range, thermal and pH stability, latent period, and burst size. The larvae (180–250 mg) were divided into four groups ($n \geq 10$): control (phosphate buffer), phage only, CFE only, and phage+CFE combination. After thermal injury and infection, treatments were administered as single or double doses, and survival rates were monitored over 96 hours. According to the findings, in *P. aeruginosa* infection, survival at 96 hours was approximately 75% with a single dose of the phage+CFE combination and increased to 90% with a double dose. In *E. coli* infection, survival was about 85% with a single dose and reached 90% with a double dose. In *S. aureus* infection, survival was 80% with a single dose and at least 85% with a double dose, while in *E. faecalis* infection, survival was approximately 70% with a single dose and about 75% with a double dose. In the phosphate buffer control groups, survival remained between 0-20%. These results suggest that the combination of lytic phages and LAB CFEs exerts a synergistic effect in the treatment of burn infections, improving survival rates. Notably, survival increased markedly with two-dose applications. The combined therapy appears to be a more effective alternative compared to single-agent treatments.

Keywords: Bacteriophage Therapy, Burn Wound Infection, Cell-free Extract, *Galleria mellonella*, Lactic Acid Bacteria,

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yanık yaralanmaları, küresel ölçekte önemli bir halk sağlığı sorunudur ve bu tür yaralanmalarda gelişen enfeksiyonlar en sık karşılaşılan ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Yanıklar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre ciddi yaralanmalar kategorisinde dördüncü sırada yer almakta ve her yıl dünya nüfusunun yaklaşık %1'ini etkilemektedir (1, 2). Yanık yaralanmalarındaki enfeksiyon ve sepsis, bu hastalarındaki ölümlerin %33 ila 80'inden sorumlu tutulmaktadır (3).

Her ne kadar yanık tedavisine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiş olsa da mevcut yaklaşımlarla iyileşme süreci zor bir süreçtir ve bu nedenle etkili alternatif tedavi stratejilerine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavi yaklaşımlarının temel hedefleri; cilt bariyerinin yeniden oluşturulması, yara iyileşmesinin hızlandırılması, lokal enfeksiyonların önlenmesi ve etkin biçimde tedavi edilmesidir (4).

Bakteriyofajlar (fajlar), bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir. Özellikle çoklu ilaca dirençli patojenlerin neden olduğu yanık yara enfeksiyonlarında ve mevcut tedavi seçeneklerinin yetersiz kaldığı durumlarda, faj terapisi potansiyel bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Faj terapisi uygulamalarını içeren 8'i yanık yaralarına odaklanmış, 27 çalışmayı kapsayan sistematik bir derlemede, faj tedavisinin yaklaşık %77.5 oranında klinik düzelme veya iyileşme sağladığı bildirilmiştir (5). Bu, özellikle geleneksel antibiyotiklerin yetersiz kaldığı durumlarda, fajların enfeksiyonları etkili bir şekilde yönetebileceğini göstermektedir. Faj tedavisi uygulamalarında yanık yarası enfeksiyonu bulunan fare modelinde *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı, karın içine uygulanan tek doz faj kokteyli ölüm oranlarını %87'ye kadar azalttığı gösterilmiştir (6). *Klebsiella pneumoniae* ile enfekte fare modelinde faj tedavisinin, yanık yaralarının tamamen iyileşmesini sağladığını ve herhangi bir toksisite gözlemlenmediği gösterilmiştir (7).

Benzer bir çalışmada, domuzlarda ve *ex vivo* insan yara enfeksiyon modellerinde faj terapinin etkili olduğu ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı etkili olduğu gösterilmiştir (8). Son yıllarda laktik asit bakterilerinin (LAB) hücresiz ekstraktlarının, özellikle yanıklarda yaygın olarak görülen patojenlere karşı umut verici tedavi seçenekleri arasında yer aldığı görülmektedir. Probiyotik LAB suşlarından elde edilen bu ekstraktların, antimikrobiyal bileşikler ve yara iyileşmesini destekleyen biyoaktif moleküller içerdiği ve yanık

yaralarından izole edilen patojenlere karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bazı *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen ekstraktlar, elastaz, proteaz ve piyosiyanın gibi virülans faktörlerinin üretimini engelleyerek bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğini azalttığı saptanmıştır. Bu özelliklerin, biyofilm oluşumunun kronik enfeksiyonlara ve iyileşmenin gecikmesine neden olduğu yanık yaralarında son derece önemli olduğu gösterilmiştir (9).

LAB hücresiz ekstraktlarının, antimikrobiyal etkilerinin ötesinde yara iyileşmesini teşvik edici özellikler gösterdiği ve bu ekstraktların topikal uygulanması, epitelizasyon süreci için gerekli olan keratinosit proliferasyonu ve göçünü desteklediği gösterilmiştir (10). Son yıllarda, LAB hücresiz ekstraktlarının insanlarda uygulanmalarına yönelik çalışmaların hız kazandığı özellikle geleneksel antibiyotik tedavilerine ek ya da alternatif olabileceğini göstermektedir. *Lactobacillus plantarum* hücre kültür sıvılarının ikinci derece yanıklarda kullanımını araştıran bir faz I çalışması, bu tedavinin yara iyileşmesini desteklediğinin en önemli kanıtlarından biridir (11). Bu enfeksiyonların önlenmesi ve yanık yaralarının iyileştirilmesine yönelik dikkat çeken tedavi stratejilerinden biri de yara yatağına topikal olarak probiyotik bakterilerin direkt uygulanmasıdır. Bu uygulama, yüzeysel cilt ve yanık yarası enfeksiyonlarının önlenmesinde umut vadetmektedir (12). Bir çalışmada, probiyotik bakterilerden biri olan *Lactiplantibacillus plantarum*'un enfekte yanık yaralarına uygulanmasının bakteri yükünü azalttığı ve yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir (13). Ayrıca, *Lactobacillus* kültür sıvısının topikal uygulanmasının travmaya bağlı *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarında sağ kalımı ve yara iyileşmesini artırdığı bildirilmiştir (14).

Özetle, LAB hücresiz ekstraktlarının, yanık yaralarının tedavisinde çok yönlü bir yaklaşım sunarak, antimikrobiyal, anti-biyofilm, yara iyileştirici ve bağışıklık düzenleyici özellikleri sayesinde topikal tedavilerde değerli birer aday oldukları görülmektedir.

Literatürde fajların ve LAB hücresiz ekstraktlarının yanık yara tedavisinde ayrı ayrı kullanımlarına yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, ikisinin kombine kullanımına yönelik çalışmalar mevcut değildir. Bu çalışmada, yanık yara enfeksiyonlarında yaygın olarak karşılaşılan patojen mikroorganizmalardan *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* ile *Galleria mellonella* larvalarında yanık yara enfeksiyonu oluşturmak ve bu enfeksiyon modelinde, laktik asit bakterilerinin hücre

içermeyen kültür sıvıları ile patojenlere karşı etkili litik fajların kombinasyon halinde tedavi amaçlı kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, insan vücudunun en büyük organıdır ve vücudun dış çevreyle olan doğrudan temasını sağlayan ilk katmandır. Aynı zamanda homeostazın korunması duyuşsal algıların iletilmesi, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi gibi birçok hayati görevi üstlenmektedir. Deri, mikroorganizmalara, kimyasal maddelere ve fiziksel travmalara karşı bir bariyer oluşturarak organizmayı dış etkenlerden korur (15).

2.1.1. Derinin Yapısı

Deri, temel olarak üç katmandan oluşmaktadır. Derinin en dış tabakası olan epidermis, epidermisin altındaki dermis tabakası ve en derin katman olan deri altı hipodermis (subkutan) dokudur. Epidermis, derinin en dış katmanıdır ve keratinize yassı epitel hücrelerinden oluşur. Koruyucu görev üstlenen bu tabaka, aynı zamanda su kaybını önler ve mikroorganizmaların girişine karşı fiziksel bir bariyer görevi görür. Epidermis, sırasıyla stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum corneum olmak üzere dört temel tabakadan meydana gelir. En alt tabaka olan stratum basale, epidermal yenilenmeyi sağlayan, proliferatif kapasiteye sahip progenitor keratinositleri içerir. Bu hücreler farklılaştıkça üst katmanlara doğru ilerler ve epidermisin en dış yüzeyine ulaştıklarında deskuamasyonla uzaklaştırılırlar. Epidermis, vasküler olmayan bir yapıdır; besin ve oksijen ihtiyacı altındaki dermis tabakasından difüzyon yoluyla sağlanır. Keratinositlerin yenilenme döngüsü, bireyin yaşına, çevresel faktörlere ve hormonal durumuna göre değişmekle birlikte genellikle 30 ila 40 gün arasında tamamlanır (16). Dermis, yapı sağlamada önemli bir rol oynar. Bu katman, deriye esneklik ve dayanıklılık kazandıran kollajen ve elastin lifleri içerir. Bu tabakada aynı zamanda kan damarları, lenf damarları, sinir uçları, kıl kökleri, ter ve yağ bezleri ile mast hücreleri bulunur. Bu yapılar derinin duyuşsal, immün ve metabolik işlevlerini destekler (17). Hipodermis (subkutan doku), derinin en derin katmanıdır ve büyük oranda yağ dokusundan oluşur. Bu tabaka, enerji depolanması, yalıtım ve mekanik travmalara karşı tampon görevi görür. Ayrıca burada bulunan büyük kan damarları dermisin beslenmesine katkı sağlar.

2.2. Yanık Nedir?

Yanık, deri başta olmak üzere deri altı dokularının ve bazen daha derin yapıların yüksek ısı, elektrik akımı, radyasyon, lazer enerjisi ya da kimyasal maddeler gibi çeşitli dış etkenlere maruz kalması sonucu ortaya çıkan doku hasarıdır. Bu travmatik durum, genellikle dokuların tolerans sınırını aşan ısıya maruz kalması sonucunda hücre membranlarının bozulması, proteinlerin denatürasyonu ve hücre içi yapıların harabiyetiyle karakterizedir (18). Yanığın neden olduğu doku yıkımı, yalnızca maruz kalınan alanla sınırlı kalmayabilir; çevre dokularda da inflamatuvar yanıt ve vasküler bozulmalar yoluyla sekonder hasar gelişebilir. Yanık yaralarında iyileşme süreci, genel yara iyileşme mekanizmalarıyla benzer aşamalardan geçse de (hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme) yanıkların özellikleri nedeniyle bu süreç genellikle daha kompleks, daha uzun süreli ve komplikasyonlara daha açıktır. Özellikle tam kat deri kaybı, enfeksiyon riski, sıvı-elektrolit kaybı ve hiper-metabolik yanıt yanık iyileşmesini zorlaştıran başlıca etkenlerdendir (19).

2.2.1. Yanık Epidemiyolojisi

Küresel ölçekte yanıklar, dünyada her yaş grubundan, her kesimden insanın karşılaştığı yaygın bir sorundur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her yıl yaklaşık 180.000 kişi yanık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu ölümlerin büyük bir kısmı düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Ancak ölümlerin çok daha ötesinde, milyonlarca insan yanık sonrası ciddi morbiditelerle yaşamını sürdürmek zorunda kalmaktadır. WHO raporuna göre yanıklar, trafik kazaları, düşmeler ve kişilerarası şiddetin hemen ardından ciddi yaralanmalar kategorisinde dördüncü sırada yer almaktadır (20). Yanıkların neden olduğu mortalite oranı gelişmiş ülkelerde ciddi şekilde düşmüş olsa da morbidite oranı halen yüksek seyretmektedir. Türkiye’de yapılan araştırmalar, yanık vakalarının her yaş grubunda görüldüğünü ve sıklıkla ev kazaları sonucunda oluştuğunu göstermektedir. Devlet İstatistik Enstitüsü’nün (DİE) yaptığı bölgesel incelemelere göre, her yıl yaklaşık 70.000 kişi yanık tedavisi. Görmekte ve yaklaşık 200 kişi yanıklara bağlı nedenlerle hayatını kaybetmektedir.

2.2.2. Yanık Yara Sınıflandırılması

Yanıklar, derinliklerine ve yaygınlıklarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılır. Klinik değerlendirme ve tedavi planlaması açısından en yaygın kullanılan sınıflandırma,

yanığın derinliğine göre yapılan sınıflandırmadır: Yanıklar birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece olarak dört sınıfa ayrılırlar (Şekil 1) (21).

Birinci derece yanıklar (I. derece): Sadece epidermisi etkileyen yanıklardır. Deride kızarıklık, hassasiyet ve hafif ödem görülür; kabarcık oluşmaz. Genellikle güneş yanıkları bu sınıfa girer. İyileşme genellikle 3-7 gün içinde spontan olarak ve iz bırakmadan gerçekleşir. Hasarlı epidermis 5-10 gün sonra soyulur.

İkinci derece yanıklar (II. derece): Bu tür yanıklarda, epiderminin tamamı ve dermis tabakasının bir kısmı zarar görmüştür. Yara klinik olarak ödem ve şiddetli ağrı ile karakterizedir. İyileşme süresi ise 2-3 haftadır. Ek olarak, bu yanıklar yüzeysel ve derin olarak iki gruba ayrılmaktadır (22).

Yüzeysel II. derece yanıklar: Epidermis ve derminin yüzeysel katmanları bozulmuştur. Epiderminin bazal membrandan ayrılması nedeniyle kabarcıklar oluşur. Yara 14-21 günde iyileşmektedir.

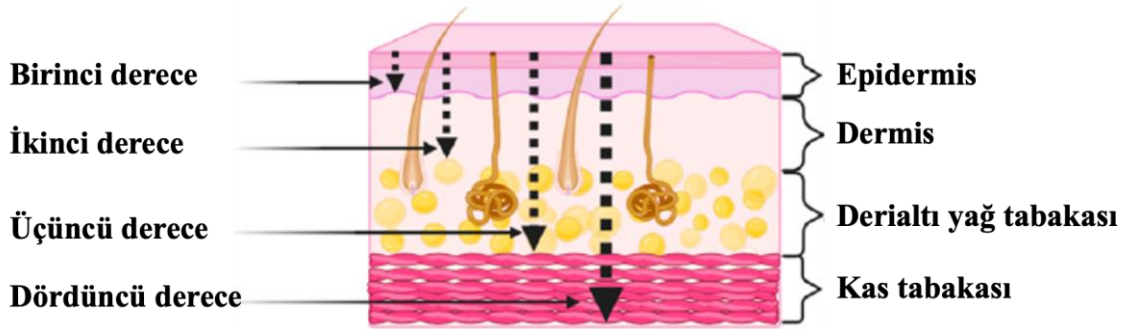
Derin II. derece yanıklar: Epidermis ve derminin katmanları farklı derinliklerde bozulmuştur. Cilt kırmızı, nemli ve ağrılıdır. Yara izleri kalabilir. İyileşme 21-35 gün sürer. Yanıklardan birkaç dakika sonra, yırtılmaya meyilli sıvı dolu kabarcıklar oluşur. Bu tür yaralar cerrahi eksizyon ve deri nakli gerektirir (23).

Üçüncü derece yanıklar (III. derece): Epidermisi, dermisi ve hatta hipodermisi (deri altı doku) etkileyen yanıklardır. Kuru görünümlü ve deride fonksiyon kaybı ve sinir uçları hasar gördüğü için ağrı yoktur. Cerrahi tedavi (greftleme) olmazsa ileri derecede enfeksiyon, sepsis, mortalite riski artar.

Dördüncü derece yanıklar (IV. derece): Bu tür yanıklar kas, tendon ve hatta kemik gibi daha derin dokulara zarar verir. Genellikle yara siyah ve ağrısızdır. Cerrahi müdahale (deri grefti gibi) veya amputasyon gibi ciddi işlemler gerektirir.

Yanık derecesi/derinliği

Derinin katmanları



Şekil 1. Yanık yaralanması sınıflandırması ve derinliği (24).

2.3. Yanık Yara Enfeksiyonları ve Yaygın Patojenler

Yanık yara enfeksiyonları, çoğunlukla hastaların gastrointestinal sistemleri, hastane ortamları, fomitler veya sağlık çalışanlarının elleri gibi kontamine dış kaynaklarda bulunan organizmalar aracılığıyla oluşmaktadır (25). Yanık hastalarında meydana gelen deri bariyerinin bütünlüğünün bozulması, bağışıklık sisteminin baskılanması ve uzun süreli hastanede kalış gibi olası nedenler invaziv yanık yarası enfeksiyon gelişme riski önemli ölçüde artırmaktadır. Böylece, sıklıkla bakteriyemiye ve devamında çoklu organ disfonksiyonu (MODS) sendromu gelişmesine yol açmaktadır.

Yanık yarası enfeksiyonlarının doğrudan veya dolaylı olarak %33 ila %80 oranında ölüme yol açabildiği bildirilmektedir (26). Yanık yaralarında enfeksiyon gelişimi, yara yüzeyinin genişliği, cilt bariyerinin bütünlüğünün bozulması ve hastane kaynaklı patojenlerle temas nedeniyle oldukça yaygındır. Bu enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* yer almaktadır (27). Yapılan araştırmalar sonucunda, hastaneye yatıştan sonraki ilk 5 gün içerisinde *S. aureus*'un en sık görülen patojen olduğunu, *P. aeruginosa*'nın ise 5 gün sonra baskın hale geldiğini göstermektedir (28).

Yanık yara enfeksiyonlarında, enfeksiyona neden olan birincil ajanlar Gram-negatif bakterilerdir (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*) ve vakaların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Gram pozitif bakteriler (*S. aureus* ve *Enterococcus* spp.) ise vakaların yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (29). Çin'de 2010-2023 yılları arasında yapılan bir

çalışmada, yanık hastalarında görülen nozokomiyal enfeksiyonlara ilişkin toplam 62.819 izolatı değerlendirmiştir. Analiz sonucunda, en sık izole edilen patojenler sırasıyla *S. aureus* (%18.3), *P. aeruginosa* (%16.2), *A. baumannii* (%13.7), *K. pneumoniae* (%7.4) ve *S. epidermidis* (%5.9) olarak belirlenmiştir (30).

2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, çubuk şeklinde, fakültatif aerob, oksidaz ve katalaz pozitif Gram-negatif bir bakteridir. Birçok antibiyotiğe karşı doğal direnci ile tanınan *P. aeruginosa*, yara enfeksiyonlarının yaygın bir etkenidir. Geniş çevresel toleransı sayesinde toprak, su, hastane ortam koşullarında bile yaşayabilen, çevresel koşullara hızlı adaptasyon yeteneği, düşük besin gereksinimi ve biyofilm oluşturma kapasitesi ile öne çıkmaktadır (31).

Pseudomonas aeruginosa, özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde, hastane kaynaklı enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biridir. Solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, hasarlı dokular içinde hızlı çoğalması ile yara ve yanık enfeksiyonları ile bakteriyemi gibi çok sayıda ciddi enfeksiyonun etkenidir. Bu patojenin, özellikle nemli ortamları tercih etmesi ve çoklu ilaç direnci geliştirme kapasitesi nedeniyle yanık ünitelerinde ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), *P. aeruginosa*'yı en tehlikeli patojenlerden biri olarak "kritik öncelikli" antibiyotik direnci listesine dahil etmiştir. Mahmood ve ark. (32), 200 hastanın yara ve yanıklarından toplam 31 *P. aeruginosa* suşu izole etmiş ve gentamisin, trimetoprim, amikasin ve amoksisilin direnç oranlarının yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Başka bir çalışmada, Campos-Silva ve ark. (33), *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı faj tedavisinin etkinliği, omurgasız bir model olan *G. mellonella* larvaları kullanılarak değerlendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, faj tedavisinin *P. aeruginosa* kaynaklı kronik yara enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına veya antibiyotiklerle kombine şekilde kullanıldığında etkili olabileceğini göstermektedir. Bu kombinasyon terapileri, tedavi etkinliğini artırmakta ve direnç gelişimini azaltmaktadır (34). Ayrıca, faj tedavisi düşük toksisite, daha az yan etki ve çoklu ilaç dirençli suşları hedef alabilme gibi avantajlar sunar. Bu yönleriyle, geleneksel antibiyotik tedavilerine alternatif ya da tamamlayıcı olarak cazip bir seçenek oluşturmaktadır.

Loc-Carrillo ve ark. (35), yaptıkları geniş kapsamlı bir klinik çalışmada, kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastalarda faj tedavisinin etkinliğini incelemiştir. Çalışmada, enfeksiyona neden olan suşa özel kişiselleştirilmiş bir faj kokteyli kullanılmıştır ve sonuçlar,

birçok hastada bakteri sayılarında anlamlı azalmalar ve klinik iyileşme olduğunu göstermiştir. Özellikle, bu çalışma faj tedavisinin antibiyotik direnciyle mücadeledeki potansiyelini vurgulamış; fajların hedefe yönelik, toksik olmayan bir seçenek sunduğunu ve antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında tedavi sonuçlarını iyileştirebileceğini ortaya koymuştur.

2.3.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, katalaz ve koagülaz pozitif özellik gösteren gram pozitif bir bakteridir. Bu bakteri, insan vücudunda özellikle burun, cilt ve mukozal yüzeylerde kommensal olarak bulunmasına rağmen, fırsatçı bir patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Staphylococcus aureus* ürettiği toksinlerle doku harabiyetine, sistemik inflamasyona ve ciddi durumlarda toksik şok sendromuna yol açabilmektedir. Ayrıca, keratinositler, makrofajlar ve endotel hücreleri gibi konak hücrelerin içine girip orada yaşamaya devam edebilmektedir. Bu hücre içi yaşam tarzı, bağışıklık sisteminden ve hücre içine geçemeyen antibiyotiklerden kaçmayı mümkün kılarak tedaviye dirençli ve tekrarlayan enfeksiyonlara katkı sağlamaktadır.

Staphylococcus aureus, özellikle MRSA suşları, yanık ve kronik yara enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmektedir. *S. aureus*'un biyofilm oluşturmaya karşı eğilimi ve artan antimikrobiyal direnç prevalansı, yanık yarası enfeksiyonlarının tedavi olarak antibiyotiklerin kullanımını sınırlandırmaktadır. *Staphylococcus aureus* ile ilişkili enfeksiyonlar hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı ortamlarda yaygın bulunurlar. Özellikle MRSA suşları, yara kolonizasyonu ve invaziv enfeksiyonlarda önemli bir yer tutmaktadır. Hong ve ark. (36), Çin'deki dört farklı hastaneden 2016-2021 yılları arasında toplam 90 *S. aureus* suşunu toplayarak moleküler yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Çalışma sonucunda, *S. aureus*'un yanık ünitesi hastalarında yaygın bir enfeksiyon etkeni olduğu, özellikle metisiline dirençli MRSA suşlarının hem yüksek oranda izole edildiği hem de belirgin antibiyotik direnç profilleri sergilediği ortaya konmuştur.

Faj tedavisi, özellikle MRSA kökenli yara enfeksiyonlarının tedavisinde umut verici bir alternatif veya tamamlayıcı yöntem olarak öne çıkmaktadır. Molendijk ve ark. (37), *S. aureus*'a bağlı yanık yarası enfeksiyonlarında faj tedavisinin etkinliğini değerlendirmiş ve hem domuz hem de insan kaynaklı olmak üzere iki farklı *ex vivo* yanık modeli kullanmışlardır. Bu çalışma, faj uygulama dozunun ve zamanlamasının tedavi başarısını

etkilediğini göstermiş; profilaktik ve çok dozlu uygulamaların daha güçlü antibakteriyel etki sağladığını bildirmişlerdir.

Avrupa destekli Phagoburn projesinde, yanık hastalarında uygulanan PP1131 adlı faj kokteyli güvenli bulunmuş; ancak formülasyon kararlılığına dair sorunlar nedeniyle etkinlik sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalar, özellikle antibiyotik direncinin tedavi etkinliğini azalttığı durumlarda, faj tedavisinin hedefe yönelik, toksik olmayan ve geleneksel antibiyotiklere alternatif veya tamamlayıcı bir seçenek olabileceğini ortaya koymaktadır (38).

2.3.3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, fakültatif anaerob, kapsüllü ve çubuk şeklinde bir gram-negatif bakteridir. *Enterobacteriaceae* ailesine ait olan bu mikroorganizma fırsatçı bir patojen olarak hem çevresel ortamlarda hem de insan gastrointestinal sisteminde bulunabilir. *Klebsiella pneumoniae*, artan antibiyotik direnci ve virülans potansiyeli nedeniyle hem toplum kökenli hem de hastane enfeksiyonlarında önemli bir patojen haline gelmiştir.

Klebsiella pneumoniae enfeksiyonları hafif topikal deri, mukozal ve yanık yarası enfeksiyonlarından üriner sistem enfeksiyonlarına ve pnömoni, sepsis ve menenjit gibi daha ciddi invaziv hastalıklara kadar çeşitlilik göstermektedir. Günümüzde bu bakteriyle mücadelede alternatif tedavi yaklaşımları giderek daha fazla araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Mingfang ve ark. (39), *K. pneumoniae* S-2007'ye karşı BUCT541 diye adlandırılan bir litik faj bulmuşlardır. *Galleria mellonella* larvalarında ve farelerde *K. pneumoniae* enfeksiyon modeli oluşturmuşlardır ve elde ettikleri faj BUCT541'nin etkisini *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda, faj BUCT541, özellikle MOI 10'da *K. pneumoniae* S-2007'nin büyüme oranını önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Buna karşın *G. mellonella*'da fajın MOI 10 ziyade daha düşük BUCT541 faj dozlarının (MOI 1), daha iyi terapötik etkinliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. BUCT541 fajının *in vitro* ve *in vivo* arasındaki MOI farkı *K. pneumoniae*'nin parçalanmasının, *G. mellonella* larvalarının ölümüne neden olan endotoksin gibi toksik maddeler üretmiş olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Diğer bir çalışmada, Kumari ve ark. (40), *K. pneumoniae* B5055 suşuna karşı fare modelinde oluşturulan yanık yarası enfeksiyonunda, hidrojel içinde karıştırılan faj Kpn5'in topikal olarak uygulayarak, faj tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir ve bu tedaviyi

gentamisin ve gümüş nitrat tedavisi gibi geleneksel antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırmışlardır. Tedaviyi takiben enfekte farelerin sağkalım sonuçları, tek bir faj Kpn5 dozunun mortalitede önemli bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Gentamisin ve gümüş nitrat tedavisine oranla faj terapisi farelerde yanık yarası enfeksiyonunun tedavisinde terapötik bir faydaya sahip olduğunu göstermiştir.

2.3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli kaynaklı yara enfeksiyonları, özellikle çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşların giderek artan yaygınlığı nedeniyle dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (41).

Antibiyotik direncinde gözlenen artışlar ve daha virülen suşların ortaya çıkışı, bu enfeksiyonların yönetimini zorlaştırmakta ve daha etkin sürveyans sistemlerine ve hedefe yönelik müdahalelere duyulan ihtiyacı artırmaktadır. *Escherichia coli*, yara enfeksiyonlarında en sık izole edilen ilk beş bakteri arasında yer almakta olup, çeşitli çalışmalarda önemli bir etken olarak bildirilmiştir. Huang ve ark. (42), 312 hasta örneğini kapsayan çalışmalarında *E. coli*'nin çok sayıda antibiyotiğe karşı dirençli bir patojen olarak öne çıktığını gösterilmişlerdir. Yara enfeksiyonlarında *E. coli*'nin prevalansına ilişkin yapılan bölgesel araştırmalar bu bakterinin klinik önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Başka bir çalışmada, cerrahi alan enfeksiyonları (CAE) incelenmiş ve *E. coli*'nin en sık izole edilen mikroorganizma olduğu, vakaların %39.8'ini oluşturduğu belirlenmiştir. Daha da endişe verici olan ise, izole edilen tüm *E. coli* suşlarının seftriaksona karşı %100 direnç göstermesidir. Ayrıca amoksisilin-klavulanik asit (%94), amoksisilin (%94), sefiksim (%90.7) ve sefepim (%89.8) antibiyotiklerine karşı da yüksek direnç oranları saptanmıştır. Bununla birlikte, bu izolatların imipenem (%100), tigesikline (%96), meropenem (%95.1), kloramfenikole (%84), amikasin (%81.5) ve gentamisine (%81,5) karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (43).

Kuzeydoğu Etiyopya'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, *E. coli*'nin yara enfeksiyonlarından izole edilen bakterilerin %20.7'sini oluşturduğu bildirilmiştir. Bu suşların test edilen çoğu antibiyotiğe karşı yüksek direnç seviyeleri gözlemlerken, ertapenem (%32.9), amikasin (%24.3), imipenem (%20.3) ve meropenem (%17.6) gibi ilaçlara karşı daha düşük direnç oranları tespit edilmiştir. Özellikle, ÇİD *Enterobacteriaceae* suşlarının

sıklığı alarm verici derecede yüksek olduğu, farklı hastaneler arasında bu oranın %84.5 ile %97.3 arasında değiştiği bildirilmiştir (44).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede faj terapi çalışmalarına ve özellikle faj özgüllüğünü ve etkinliğini iyileştirmeye odaklanmıştır. Pasteur Enstitüsü'nde bir grup araştırmacı bakteriyel genomik verilere dayanarak etkili faj-bakteri etkileşimlerini tahmin edebilen yapay zeka modelleri geliştirmiştir. Birçok *E. coli* suşu ile farklı fajlar arasındaki etkileşimleri analiz ederek, yapay zekâ, kişiye özel faj karışımlarını önerebilmekte ve ilk çalışmalarla hedeflenen bakterilerin %90'a kadar ortadan kaldırılmasında başarı sağladıklarını bildirmişlerdir (45).

2.3.5. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, aerob, kapsülsüz, oksidaz-negatif ve hareketsiz bir kokobasil olup, non-fermentatif bakteri grubuna ait bir gram negatif bakteridir. Toprak, su ve hastane ortamı gibi alanlarda yaygın olarak bulunan bu bakteriler, insan vücudunda geçici olarak kolonize olabilir ve fırsatçı patojen olarak ciddi enfeksiyonlara yol açabilirler. *A. baumannii*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde uzun süre yatan, invaziv işlemler uygulanan veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkenidir. Yanık yara enfeksiyonunda sıklık bakımından *P. aeruginosa*'dan sonra ikinci sırada yer alan *A. baumannii* gibi fırsatçı patojenler, yoğun bakım koşullarında bağışıklığı baskılanmış hastalarda hızla çoğalabilmekte ve dirençli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu bakterilerin polimikrobiyal enfeksiyonlar oluşturabileceği ve yara iyileşmesini geciktirerek mortalite riskini artırabileceği vurgulanmaktadır (46). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Bilgin ve ark. (47), 2019-2020 Haziran tarihleri arasında Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yanık Merkezi'nde tedavi gören hastaların yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların türlerini ve bu mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Çalışmada izole edilen mikroorganizmaların %76'sını Gram negatif bakteriler, %18'ini Gram pozitif bakteriler ve %6'sını *Candida* türleri oluşturmuştur. En sık izole edilen patojenler arasında *Acinetobacter* spp. %23,6 oranı ile üçüncü sırada yer almıştır. İzole edilen *Acinetobacter* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık testleri, bu patojenlerin yüksek düzeyde antibiyotik direncine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle amikasin direnci %62.5 olarak belirlenirken; meropenem, imipenem, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) antibiyotiklerine karşı direnç oranı %87.5'e ulaşmıştır.

Acinetobacter baumannii'nin mevcut antibiyotiklere karşı direncinin artması nedeniyle, *A. baumannii* enfeksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek için yeni stratejiler geliştirme isteği artmıştır. Yapılan bir çalışmada, Luo ve ark. (48), çoklu ilaca dirençli (MDR) *A. baumannii* suşlarına karşı yeni bir faj lizati elde etmişler ve çeşitli antibiyotiklerin kombinasyonu ile hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda sinerjik bakterisidal etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda, faj ve antibiyotik kombinasyonları, özellikle meropenem ve colistin ile kullanıldığında sinerjik etki göstermiştir. Yapılan *in vivo* sonuçlarında da *G. mellonella* enfeksiyon modelinde, faj ve antibiyotiklerin kombinasyonu ile tedavi edilen gruplarda sağkalım oranı belirgin şekilde artmıştır.

2.3.6. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis, koagülaz-negatif stafilokoklar grubuna ait, katalaz pozitif ve fakültatif anaerob özellik gösteren Gram pozitif bir bakteridir. İnsan cildi, mukoz membranları ve mukokütanöz yüzeylerin doğal mikrobiyotasında yaygın olarak bulunmaktadır. Genellikle zararsız, kommensal bir bakteri olmasına rağmen, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde veya invaziv tıbbi cihazların kullanıldığı durumlarda fırsatçı patojen olarak cerrahi ve yanık yara enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Yanık hastalarında, cilt bariyerinin bozulması ve bağışıklık sisteminin baskılanması nedeniyle *S. epidermidis* enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır. Bu enfeksiyonlar, bakterinin biyofilm oluşturma yeteneği nedeniyle tedavisi zor hale gelir. Biyofilmler, bakterileri hem antibiyotiklere hem de bağışıklık sistemine karşı koruyarak enfeksiyonun kalıcılığına ve antibiyotik direncine katkıda bulunur.

Staphylococcus epidermidis enfeksiyonları genellikle, merkezi venöz kateterler, idrar sondaları ve protezler gibi tıbbi cihazların yüzeyinde biyofilm oluşturmaları ile meydana gelmektedir. *Staphylococcus epidermidis*'in biyofilm oluşturmaları, antibiyotiklere ve konak bağışıklık yanıtına karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır ve bu durumda enfeksiyonların tedavisi zorlaştırmaktadır (49). Yapılan bir çalışmada, Roya ve ark. (50), İran'ın Ahvaz kentinde hastane enfeksiyonlarından izole edilen 46 *S. epidermidis* suşu izole edilmiştir. *S. epidermidis* suşlarının antibiyotik direnç profillerini ve virülans faktörlerini belirlemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre suşların %95.65'i penisiline, %91.30'u tetrasikline, %82.60'ı eritromisine ve %78.26'sı klindamisine karşı dirençli bulunmuştur. Ayrıca suşların %45.65'inde *mecA* geni tespit edilmiştir. Valente ve ark. (51) *S. epidermidis*'in oluşturduğu

biyofilmlere bakteriyofajların penetre olduğunu ve fajların biyofilm-ilişkili enfeksiyonlarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

2.3.7. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, koagülaz negatif, katalaz negatif, fakültatif anaerob ve sporsuz gram pozitif bir kok bakteridir. *Enterococcus faecalis*, insan gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunan, genellikle kommensal olarak yaşayan ancak bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ve uzun süreli hastane yatışlarında fırsatçı patojen haline gelerek yara enfeksiyonları da dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Cerrahi yara enfeksiyonlarını analiz eden bir çalışmada, vakaların %12'sinde *E. faecalis* izole edilmiş ve bu bakterinin enfeksiyonlardaki önemli rolü vurgulanmıştır (52).

Enterococcus faecalis, aynı zamanda artan antimikrobiyal direnç profiline sahiptir. Yapılan bir çalışmada, Jun ve ark. (53), yanık yaralarından izole edilen 57 *Enterococcus* suşunun antimikrobiyal direnç profillerini ve virülans faktörlerini fenotipik ve genotipik yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Çalışma bulgularına göre, tüm izolatların vankomisin ve tigesikline duyarlı olduğu, izolatların %64'ünün eritromisine dirençli olduğu ve *E. faecalis* suşlarının %65.2'sinde yüksek düzeyde gentamisin direncinin saptandığı rapor edilmiştir.

Enterococcus faecalis kaynaklı yara enfeksiyonlarında çoklu ilaç direnci nedeniyle faj tedavisi antibiyotiklere alternatif veya tamamlayıcı umut verici bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, Zienab ve ark (54), çoklu ilaç dirençli *E. faecalis* suşlarına karşı etkili olan vB_Efa_ZAT1 (kısaca ZAT1) adlı bakteriyofajı kanalizasyon suyundan izole etmiş ve farelerde oluşturulan bakteremi modelinde terapötik etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışma bulgularına göre, enfeksiyondan bir saat sonra intraperitoneal yolla uygulanan 3×10^8 PFU dozundaki ZAT1 fajı, tedavi edilen tüm farelerde %100 sağkalım sağlamıştır. Abed ve ark. (55) tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, antibiyotiklere dirençli *E. faecalis* suşlarına karşı etkili olan yeni bir bakteriyofaj olan SAM-E.f 12 izole edilmiş ve bu fajın terapötik etkinliği, *E. faecalis* ile enfekte edilmiş fare yara modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma bulgularına göre, SAM-E.f 12 fajı test edilen 60 klinik *E. faecalis* izolatının %70'ine karşı litik aktivite göstermiştir. Farelerde yapılan *in vivo* deneylerde, faj uygulanan grupta yara iyileşme sürecinin hızlandığı ve enfeksiyonun etkin şekilde kontrol altına alındığı gözlemlenmiştir. Ayrıca histopatolojik analizler, faj tedavisinin inflamatuvar yanıtı azalttığını ve doku onarımını anlamlı düzeyde desteklediğini ortaya koymuştur.

Yapılan bir başka çalışmada, geliştirilen faj içeren hidrojellerin, *E. faecalis* ile enfekte yaraların tedavisinde etkili bulunduğu ve kontrollü faj salınımı ile bakteri yükü azaltılırken doku yenilenmesi desteklenmiş, epitelizasyon ve doku onarımının hızlandığı gösterilmiştir (56).

2.4. Bakteriyofajlar ve Genel Özellikleri

Bakteriyofajlar (fajlar), bakterileri enfekte eden ve öldüren virüslerdir. Fajların, küresel bolluğu yakalaşık olarak 10^{31} parçacıktır (57). Tatlı su, deniz suyu, toprak ve atık su gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilebilen fajlar, bakterilerin yaşadığı her yaşam ortamında bulunabilirler ve günlük olarak bakteri biyokütlesinin yaklaşık %40'ını ortadan kaldırıldığı bilinmektedir (58). Fajların genom büyüklükleri değişiklik gösterir. Bu farklılık fajların genetik çeşitliliğini ve evrimsel adaptasyonlarını anlamak açısından önemlidir. Bazı fajlar oldukça küçük genomlara sahiptir. Örneğin, *Microbacterium foliorum* fajının (Evcara) genomu 16 285 baz çifti uzunluğundadır ve 22 protein kodlayan gen içerir (59). Genomu 200 000 baz çiftinden büyük olan fajlar "jumbo faj" olarak sınıflandırılır. Örneğin, *Sinorhizobium meliloti*'yi enfekte eden AP-J-162 fajının genomu 471 510 baz çifti uzunluğundadır (60). Fajlar genellikle 20-200 nm uzunluğundadır ve genetik materyalin çevresinde onu koruyan bir protein kılıfı (kapsid) bulunur. Kapsid yapısı genellikle ikosahedral simetri gösterir ve çapı 20-120 nm arasında değişebilir (61). Birçok fajda, fajın bakteriye tutunmasını ve genetik materyalini konak hücreye aktarmasını sağlayan kuyruk yapıları mevcuttur.

2.4.1. Bakteriyofajların Tarihçesi

Fajların keşfi, 19. yüzyılın sonlarına kadar uzanmaktadır. 1896 yılında İngiliz bakteriyolog Ernest Hankin, Hindistan'daki Ganj ve Jumna nehirlerinden aldığı su örneklerinin *Vibrio cholerae* bakterisi üzerindeki öldürücü etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Hankin, bu suların antibakteriyel özelliklerinin kolera salgınlarının yayılmasını önleyici olduğunu ileri sürmüş, bu gözlemiyle fajların varlığına işaret eden ilk bilim insanı olmuştur (62).

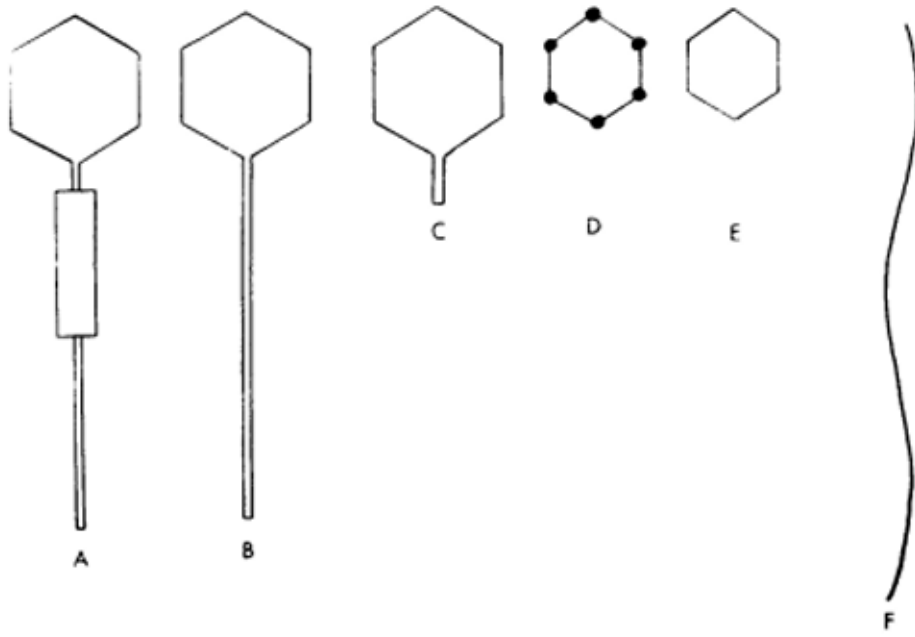
20. yüzyılın başlarında, 1915 yılında Frederick Twort, stafilokok kültürlerinde lizis gözlemleyerek fajlara "bakteriyolitik bir ajan" olarak tanımlamıştır ve bu tanımlama bakteriyofajların bilimsel olarak fark edilmesinin ilk somut adımı olmuştur. 1917'de ise Félix d'Hérelle, *Shigella* bakterilerine karşı etkili ve çoğalabilen bir ajan keşfetmiş ve bu

varlığa “bakteriyofaj” adını vererek bağımsız olarak bakteriyofajları tanımlamıştır D’Hérelle’in çalışmaları, faj tedavisinin temellerini oluşturmuş ve bakteriyofajların terapötik potansiyelini ortaya koymuştur (63).

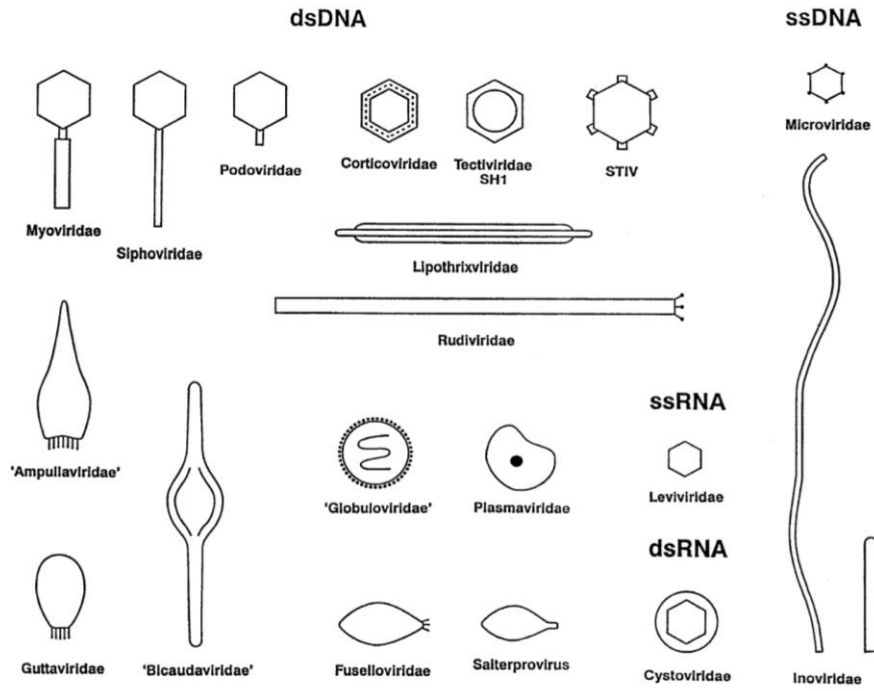
Özellikle eski Sovyetler Birliği ve Gürcistan’da 1920’li ve 1930’lu yıllarda faj tedavisi klinik olarak uygulanmış; ancak antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile batı dünyasında bu yaklaşım arka planda kalmıştır (64). Günümüzde ise artan antibiyotik direnci, bakteriyofajlara olan ilgiyi yeniden gündeme getirmiş ve bu biyolojik ajanlar, alternatif tedavi seçenekleri arasında değerlendirilmeye başlanmıştır.

2.4.2. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Fajlar, boyut, morfoloji ve genomik organizasyon açısından son derece çeşitlidirler. 1937 yılında Avustralya’lı mikrobiyolog Frank M. Burnet, bakteriyofajların fiziksel ve fizikokimyasal etkenlere karşı dirençliliklerinde farklılıklar gösterdiğini deneysel olarak ortaya koymuştur (65). 1943 yılında Helmut Ruska, elektron mikroskobu kullanarak bakteriyofajların morfolojik çeşitliliğini gözlemlemiş ve bu gözlemlerine dayanarak virüslerin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmasını önermiştir (66). 1948 yılında Francis O. Holmes, virüsleri konakçı özgüllüklerine göre sınıflandırarak üç ana alt gruba ayırmıştır: bitki virüsleri (*Phytophaginae*), hayvan virüsleri (*Zoophaginae*) ve bakteriyofajlar (*Phaginae*) (67). Daha sonra, 1962 yılında André Lwoff, Robert Horne ve Paul Tournier, virüs sınıflandırmasının nükleik asit türü, kapsid simetrisi, zar varlığı ve virion boyutu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere dayanması gerektiğini öne sürmüşlerdir (68). Bu yaklaşım, virüslerin taksonomik olarak sınıflandırılmasında önemli bir adım olmuştur. 1967 yılında David Bradley, elektron mikroskobu kullanarak bakteriyofajları baş ve kuyruk morfolojilerine göre altı gruba (A-F) ayırarak detaylı bir morfolojik sınıflandırma sistemi geliştirmiştir (Şekil 2) (69). Bu sınıflandırma, bakteriyofajların morfolojik çeşitliliğini ve taksonomik ilişkilerini daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamıştır. İlave olarak, Ackermann (2007) elektron mikroskopik olarak incelediği 5500 fajı 1 takım ve 17 familyaya ayırmış, 3 grubu ara grup olarak sınıflandırmıştır (Şekil 3) (70).



Şekil 2. Bradley'e göre bakteriyofaj sınıflandırması (69).



Şekil 3. Ackermann'a göre bakteriyofaj sınıflandırması (70).

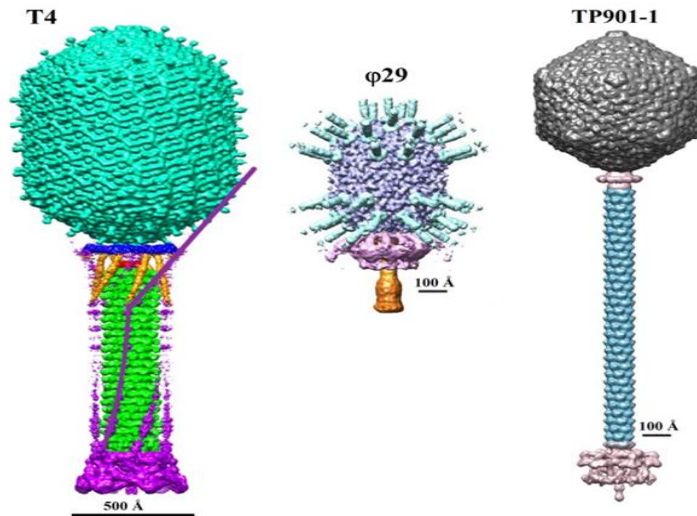
Fajların taksonomik sınıflandırılması, son yıllarda genomik verilerin artışıyla birlikte önemli değişiklikler geçirmiştir. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV), morfolojik temelli sınıflandırma sisteminden genomik temelli bir yaklaşıma geçiş yapmıştır

(71). Bu sınıflandırmada *Myoviruses*, *Siphoviruses* ve *Podoviruses* grupları *Caudoviricetes* ailesi altında toplanmıştır. Bu değişiklikler, bakteriyofajların daha doğru ve evrimsel ilişkilerini yansıtan bir şekilde sınıflandırılmasını sağlamıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Genom tiplerine göre bakteriyofajların sınıflandırılması

Familya / Sınıf	Genom Tipi	Morfoloji
<i>Caudoviricetes</i>	dsDNA	Kuyruklu (<i>Myoviruses</i> , <i>Siphoviruses</i> , <i>Podoviruses</i>)
<i>Myoviridae</i>	dsDNA	Kuyruklu, kasılabilir kuyruk
<i>Siphoviridae</i>	dsDNA	Kuyruklu, uzun, kasılmayan kuyruk
<i>Podoviridae</i>	dsDNA	Kısa kuyruk
<i>Microviridae</i>	ssDNA	İkosahedral baş, zarfsız
<i>Inoviridae</i>	ssDNA	Filamentöz, zarfsız
<i>Leviviricetes</i>	ssRNA (+)	İkosahedral baş, zarfsız
<i>Corticoviridae</i>	dsDNA	İkosahedral baş, lipit içerikli
<i>Tectiviridae</i>	dsDNA	İkosahedral baş, lipit iç membranlı
<i>Autolykiviridae</i>	dsDNA	Kuyuksuz, kısa-tıknaz

Fajların çoğu çift sarmallı DNA (dsDNA) genomlarına sahipken, bazıları tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarına sahiptir. Kuyruklu dsDNA fajlar, *Caudovirales* takımı altında sınıflandırılır ve bilinen fajların yaklaşık %96'sını oluşturur. Kuyruk yapısı ise, *Myoviridae* ailesine ait fajlar, kontraktıl (kasılabilir) kuyruklara sahipken, *Siphoviridae* ailesi uzun, esnek kuyruklara ve *Podoviridae* ailesi ise kısa kuyruklara sahiptir (72, 73) (Şekil 4).



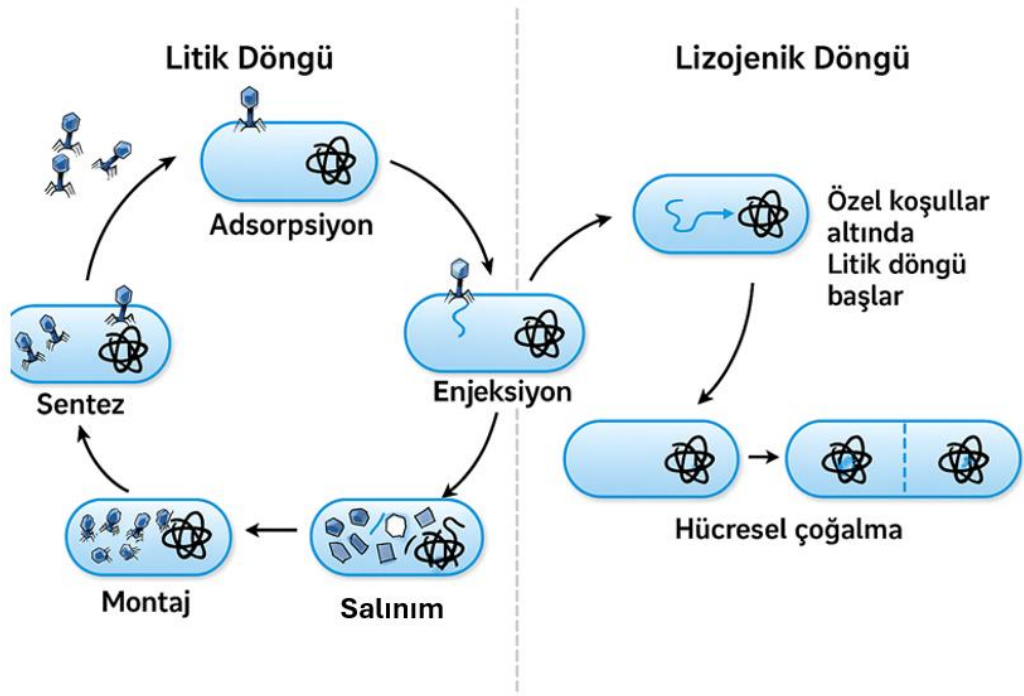
Şekil 4. *Myoviridae* faj T4'ün (sol) (74), *Podoviridae* faj φ29'un (orta) (75) ve *Siphoviridae* faj TP901-1'in (sağ) (76) yapısı.

2.4.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir ve çoğalmak için konak bakterilerin metabolik mekanizmalarını kullanırlar (zorunlu hücre içi parazitleridir). Fajların konak bakterideki yaşam döngüleri genellikle litik, lizojenik ve psödolizojenik olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 5) (77).

Litik yaşam döngüsünde olan bakteriyofajlar virülan, lizojenik yaşam döngüsünde olan fajlar ılımlı olarak ve psödolizojeni yaşam döngüsünde fajların ne konakçıyı parçaladığı ne de bakteri genomuna entegre olmadığı klasik olmayan bir faj yaşam döngüsü olarak tanımlanmaktadır. Litik yaşam döngüsü 4 aşamada gerçekleşir. Adsorpsiyon aşaması, faj enfeksiyon döngüsünün ilk basamağını oluşturur ve bu aşamada faj, özgül konak bakterinin yüzeyine bağlanır. Kuyruklu fajlarda, bu bağlanma genellikle kuyruk yapıları ve üzerindeki reseptör bağlayıcı proteinler (RBPs) aracılığıyla gerçekleşir. Örneğin, T4 fajı, *E. coli* hücrelerinin lipopolisakkarit (LPS) ve dış membran proteini (OmpC) porinlerine uzun kuyruk lifleri ile bağlanarak adsorpsiyonu başlatır (78). Filamentöz veya kuyruksuz fajlar doğrudan yüzey proteinleri veya kapsid yapıları üzerinden konak hücreye tutunurlar. Bakteri yüzeyinde yer alan çeşitli yapılar faj bağlanma noktaları olarak işlev görür; bunlar arasında pilus, flagella, teikoik asit ve lipopolisakkarit molekülleri bulunmaktadır.

Gram pozitif bakterilerde teikoik asit, fajın spesifik bağlanmasında önemli bir rol üstlenir. Öte yandan bazı fajlar, flagellaya bağlanarak flagellanın dönme hareketinden yararlanarak hücre yüzeyine ulaşır; bu hareket "somun-cıvata" modeli ile açıklanmaktadır. Adsorpsiyonu takiben gelişen penetrasyon evresinde, faj, genetik materyalini konak bakterinin sitoplazmasına enjekte eder ve bu işlem genellikle fajın kuyruk yapısının bakteriyel hücre duvarını delmesiyle gerçekleşir (79). Latent dönemde, faj nükleik asitleri bakteriyel sitoplazmaya girdikten sonra konak hücre metabolizması tarafından çoğaltılır ve faj proteinlerinin sentezini başlatmıştır. Bu süreç, yeni faj partiküllerinin bir araya gelerek olgun faj virionlarının oluşmasıyla devam eder (80). Son aşama olan lizis evresinde ise olgun fajlar bakteriyel hücreyi parçalamak amacıyla spesifik enzimler (endolizin ve holin gibi) üretir ve bu enzimler hücre duvarını yıkarak fajların serbest kalmasını sağlar.



Şekil 5. Fajların yaşam döngüsü (81)

Lizojenik döngü, bakteriyofajların konak bakterinin genomuna entegre olarak enfeksiyon sürecini sürdürdüğü alternatif yaşam döngüsüdür. Bu süreçte fajın genetik materyali, bakteriyel kromozoma entegre olarak bir profaj oluşturur. Profaj, konak hücrede latent (uyku halinde) kalabilir ve bu durum, bakteriyofajın genetik materyalinin konak hücreyle birlikte çoğalmasını sağlar. Bu entegrasyon sonucunda, bakteriyel DNA kendini replike ettiğinde, profaj da eş zamanlı olarak replike edilir. Ancak bazı fiziksel ve kimyasal etkenler ile profaj aktive olabilir ve lizojenik döngüden litik döngüye geçiş yapabilir (82).

2.4.4. Bakteriyofaj Terapisi

Son yıllarda artan antimikrobiyal direnç (AMR) ve/veya çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin ortaya çıkması, alternatif tedavilere ihtiyaç olduğunu ortaya çıkarmıştır ve faj terapisi gibi yeni alternatifler yeniden ilgi çekmektedir (83). AMR, 21. yüzyılın önde gelen halk sağlığı tehditlerinden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Birleşik Krallık Hükümeti tarafından yapılan bir incelemede, AMR'nin 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 10 milyon insanı öldürebileceğini bildirilmiştir (84). Antimikrobiyal dirençle ilişkili mortaliteye neden olan başlıca mikroorganizmalar arasında *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* bulunmaktadır. Bu patojenler 2019 yılında, antimikrobiyal dirençle ilişkili dünya çapında 250 000'den fazla ölümden sorumlu bulunmuştur (85). Ayrıca, *S. aureus* ve

P. aeruginosa gibi yaygın yara patojenleri, DSÖ tarafından "yüksek öncelikli" patojenler grubunda yer almaktadır (86).

Faj terapisi, bakterilere karşı litik fajların kullanılmasını içermektedir. Faj terapisi uzun yıllardır bakterilerinin tedavisi için uygun bir alternatif olsada, 1980'lere kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Bunun sebebi, fajlar hakkında farkındalığın eksik olması ve deneysel verilerin sınırlı olmasıdır. Fajların etki mekanizması veya etki şekline göre farklı faj terapisi yaklaşımları mevcuttur. Bu yaklaşımlar arasında, litik fajların doğrudan uygulanan konvansiyonel faj tedavisi, fajlara özgü enzimlerle (endolizin vs.) terapi, faj protein bazlı tedaviler ve antibiyotiklerle kombinasyon tedavileri yer almaktadır (87). Faj terapisine yönelik yenilikçi stratejilerden biri, çeşitli patojenlere karşı hızlı ve etkili fajların sistematik bir şekilde toplanarak ve karakterize edilerek faj kütüphanelerinin oluşturulmasıdır. Bunun yanı sıra, genetik olarak faj genomlarının modifiye edilmesi, genetik mühendislik teknolojisi olan CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) kullanarak, fajların özgülüklerinin artırılıp, çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı daha etkili ve spesifik rekombinant fajların elde edilmektedir. Bu yeni stratejiler, endüstriyel ölçekte rekombinant fajların ve birden fazla faj kokteyllerinin (çoklu faj kombinasyonlarının) geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (88).

Son yapılan araştırmalar ile klinik olarak önemli bir dizi patojen mikroorganizmalara karşı faj tedavisi çalışmaları artarak devam etmektedir. ESKAPE grubundan çoklu ilaca dirençli organizmalar olan *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri faj terapisi uygulanan başlıca adaylardır (89).

Faj-antibiyotik sinerjisinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi, kombinasyon tedavilerine yön vermek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Kebriaei ve ark. (90) yaptığı bir çalışmada, antibiyotik direnci gösteren *S. aureus* (özellikle MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde faj terapisinin potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışmalar, fajların antibiyotiklerle kombinasyonunun MRSA'ya karşı sinerjik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Faj Sb-1 tek başına MRSA seviyelerini %35 azaltırken, oksasilin ile kombinasyonu bu oranı yaklaşık %90'a çıkarmıştır.

Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada, Kelly ve ark. (91), antibiyotik direnci gösteren *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* suşlarına karşı etkili bir bakteriyofaj kokteyli geliştirilmiş ve bu kokteylin hem *in vitro* hem de canlı model organizma olan *G. mellonella*

larvalarında *in vivo* etkinliğini değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, faj kokteyli, hem *K. pneumoniae* hem de *K. oxytoca* suşlarına karşı tekli faj uygulamalarına göre daha yüksek bakterisidal aktivite göstermiştir. Faj kokteyli uygulanan enfekte larvaların hayatta kalma oranı, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artış göstermiştir.

Bu bulgular, faj terapinin klinik uygulamalara geçişi için umut verici sonuçlar ortaya koymakta ve özellikle dirençli enfeksiyonların tedavisinde güçlü bir alternatif olabileceğini desteklemektedir.

2.5. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), mikrobiyoloji biliminin gelişmeye başladığı 20. yüzyılın başlarında tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik ilk ve en önemli adım, 1873 yılında Joseph Lister tarafından bir süt örneğinden izole edilen ve başlangıçta *Bacterium lactis* olarak adlandırılan, günümüzde ise *Lactococcus lactis* olarak bilinen suş ile atılmıştır (92). Laktik asit bakterileri, fermantasyon sırasında laktik asit üretmek amacıyla karbonhidratları metabolize eden Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, patojenik olmayan, tipik olarak anaerobik veya fakültatif aerobik bakterilerdir.

2.5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterilerinin son taksonomik sınıflandırılmasında, *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı ve *Lactobacillales* takımı altında yer alır. Laktik asit bakterileri, çeşitli taksonomik gruplara ayrılmakla birlikte, başlıca cinsler arasında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Melissococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Vagococcus* ve *Tetragenococcus* yer almaktadır. Ancak 2020 yılında yapılan taksonomik değişiklik ile *Lactobacillus* cinsine ait birçok tür, genetik yakınlıklarına göre yeniden sınıflandırılmış ve *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Agrilactobacillus* ve *Dellaglia* gibi yeni cinsler bu aileye tanımlanmıştır (93).

2.5.2. Laktik Asit Bakterilerinin Kullanımı ve Önemi

Laktik asit bakterileri, probiyotik potansiyele sahip olmaları sayesinde insan sağlığına çok yönlü faydalar sağlayan mikroorganizmalardır. Bu bakteriler, özellikle bağırsak vajina mikrobiyotasının korunmasında ve dengelenmesinde kritik öneme sahiptir. Laktik asit bakterileri, konakçıya zararlı olacak patojenlerin çoğalmasını engelleyerek ve immün yanıtları düzenleyerek sindirim sisteminin sağlığını olumlu yönde etkilerler. Mikrobiyotada yaygın olarak bulunan bu mikroorganizmalar, gıda sektöründe, yalnızca bozulabilir gıdaların raf ömrünü uzatmakla kalmaz; aynı zamanda istenen tat, aroma ve doku gibi duysal özelliklerin oluşumuna ve besin değer içeriğinin artırılmasına katkı sağlar. Çeşitli karbon kaynaklarını metabolize edebilme yetenekleri ve bunun sonucunda organik asitler, hidrojen peroksit (H_2O_2), bakteriyosinler ve diğer antimikrobiyal bileşikler sentezlemeleri, bu mikroorganizmaları gıda koruma, lezzet geliştirme ve mikrobiyal güvenliğin sağlanması açısından vazgeçilmez kılmaktadır (94).

Laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz süpernatantlar (CFS), fermentasyondan türetilen metabolitleri veya metabolizmadan kaynaklanan sekonder mikrobiyal ürünleri içerdikleri için bakteri ve mantarlara karşı potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak dikkat çekmektedir. En iyi bilinen probiyotik bakterilerden biri *Lactobacillus*'tur (bazı türler *Lactiplantibacillus* spp. olarak yeniden adlandırılmıştır). Yapılan bir araştırmada, Peral ve ark. (95), *Lactiplantibacillus plantarum*'un (daha önce *Lactobacillus plantarum* olarak biliniyordu) elde edilen CFS enfekte yanık yaralardaki bakteri yükünü azalttığı ve yara iyileşmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Stanbro ve ark. (96), *L. acidophilus* ve *L. reuteri* kullanarak farede yanık yara modeli oluşturulmuş ve *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde iyi sağkalım gözlemlenmiştir.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada Christensen ve ark. (97), fermente sebzeler ile sağlıklı gönüllülerin vajinal, dışkı ve cilt örneklerinden toplam 680 laktik asit bakterisi suşu izole etmişlerdir. İzole edilen bu suşlar, atopik dermatit ile ilişkili *S. aureus* clonal complex 1 (CC1) suşlarına karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından taranmış ve en yüksek inhibisyon gösteren dört LAB suşu seçilmiştir. Seçilen suşlar üzerinde yapılan değerlendirmelerde, ko-agregasyon yetenekleri, bakteriyosin üretimi ve organik asit üretimi gibi olası antibakteriyel mekanizmalar detaylı olarak incelenmiştir. Bulgular, bu dört LAB suşunun *S. aureus* CC1'in büyümesini anlamlı düzeyde inhibe ettiğini göstermiştir. Bu inhibisyonun başlıca mekanizmasının, LAB suşlarının çevre mikroortamı asidifiye etme yeteneğinden

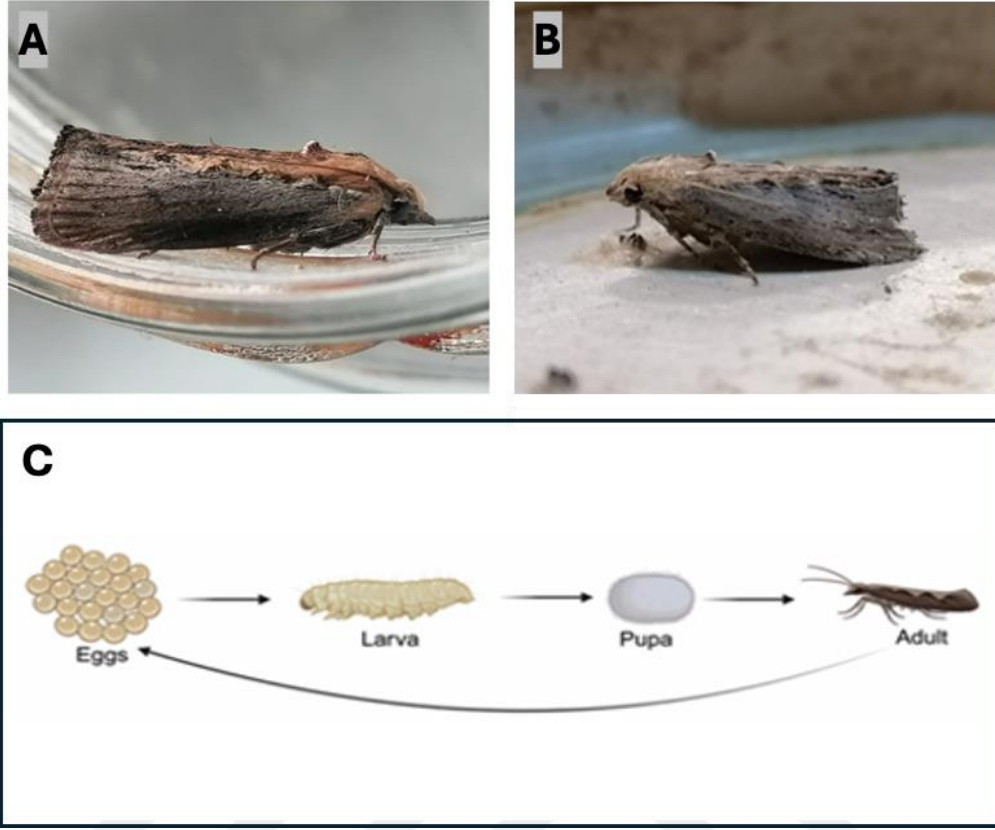
kaynaklandığı belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan genom analizleri sonucunda bazı LAB suşlarının plantaricin EF ve JK gibi bakteriyosinleri kodlayan genlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada, Guarnieri ve ark. (98), insan anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin, yanık enfeksiyonlarının yönetiminde önemli bir patojen olan LAB suşlarının, *P. aeruginosa* karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Araştırmada, *G. mellonella* larvaları alternatif bir hayvan modeli olarak kullanılmış ve laktik asit bakterilerinin etkileri yaygın kullanılan bir antibiyotik ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* analizler, LAB suşlarının *P. aeruginosa*'ya karşı belirgin antimikrobiyal aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. *In vivo* uygulamalarda ise, LAB ile gerçekleştirilen tedavi, larvaların sağkalım oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır.

Sonuç olarak, laktik asit bakterilerinin potansiyel etkilerine ilişkin çalışmalar devam etmektedir ve yanık yarası ve postoperatif enfeksiyonlara karşı umut verici terapötik potansiyel gösterdiği bilinmektedir.

2.6. *Galleria mellonella*

Galleria mellonella, yaygın adıyla balmumu güvesi, *Lepidoptera* takımından ve *Pyrilidae* (burun güveleri) familyasından bir güve türüdür. Holometabolik (metamorfoz süreci) bir yaşam döngüsüne sahip olan *G. mellonella*, beş gelişim aşaması (yumurta, larva, pre-pupa, pupa ve yetişkin) ile kısa bir yaşam döngüsüne sahiptir. Dişi erkekten daha büyüktür ve palpleri öne doğru uzamıştır. Yumurtadan 5 ila 8 gün sonra çıkan larvalar yaklaşık 6 haftalık bir süre içerisinde gelişimini tamamlayarak olgun larva evresine ulaşırlar. Bu aşamada larvalar, genellikle 16-20 mm uzunluğunda, silindirik bir yapıya sahiptir. Gelişim süreci boyunca 8 ila 10 kez deri değiştirirler ve bu süreç genellikle 4 ila 6 haftalık bir süredir. Olgunlaşma evresine ulaşan larva, beslenmeyi bırakır ve bu dönemde çevresine ipek liflerinden oluşan bir koza örmeye başlar; bu evre pupa öncesi olarak tanımlanır. Dişi bireyler, uygun koşullarda (örneğin $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $65 \pm 5\%$ bağıl nem) yaklaşık 300 yumurta bırakabilirler (99,100).



Şekil 6. *Galleria mellonella* dişi (A) ve erkek (B) birey ve yaşam döngüsü (C).

Son yıllarda *G. mellonella*'nın *in vivo* hayvan modeli olarak kullanımı artmıştır. Özellikle mikrobiyal patogeneze ve antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesinde ön çalışmalar için değerli bir model olarak murin modellerine kıyasla benzer sonuçlar göstermiştir (101). *Galleria mellonella* larvalarının, diğer omurgasız model organizmalara kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır. Kolay yetiştirme ve bakım koşulları, etik kaygı oluşturmamaları, memeli modellerine kıyasla düşük maliyetli beslenme gereksinimleri ve kısa yaşam döngüleri sayesinde araştırmalarda pratik ve verimli bir model sunmaktadırlar (102). Hızlı yaşam döngüsü sayesinde deney sonuçları 1-2 gün gibi kısa sürede elde edilebilmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemleri memelilerdeki sistemle benzerlik gösterir; özellikle hemositlerin makrofajlara benzer işlevleri sayesinde enfeksiyon, bağışıklık yanıtı ve antimikrobiyal etkiler üzerine çalışmalar için uygundur. *Galleria mellonella* larvalarında bakteri yükü, hayatta kalma oranı ve histopatolojik değişiklikler kolaylıkla değerlendirilebilir. Ayrıca *G. mellonella* mikrobiyotası insan mikrobiyotasına göre daha basittir, bu da mikrobiyal etkileşimleri sınırlı şekilde yansıtabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific, ABD), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya) 37°C'lik etüv (Memmert, Almanya), biyogüvenlik kabini (Class II Safety Cabinet, Powtech, Türkiye), biyogüvenlik kabini (Clean Air, Hollanda), çalkalayıcı inkübatör (Nbiotek, Güney Kore), pH metre (Hanna, Romanya), santrifüj (Eppendorf, Almanya), santrifüj (Sigma, Almanya), su banyosu (Memmert, Almanya), Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya).

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Otomatik pipet uçları (10 µL, 100 µL, 1000 µL), otomatik pipetler (10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL), Petri kapları, eldiven, 0.22 ve 0.45 µm'lik şırınga ucu filtre, plastik vidalı kapaklı test tüpleri (15 mL, 50 mL), 10-16 cm vidalı kapaklı ve kapaksız test cam tüpler, mezür, erlen, Oak Ridge santrifüj tüpleri, 1.5 mL mikrosantrifüj tüpleri, 2 mL kapasiteli krayojenik tüpler, parafilm, test tüp standı vb. malzemeler değişik firmalardan temin edildi.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Tris-HCl (AppliChem, ABD), magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sodyum klorür (NaCl), Polyethylene glycol (PEG)-8000, fosfat tamponu (PBS), agar (Bioife, İtalya).

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Escherichia coli ve *P. aeruginosa*'nın kültür edilmesinde Luria Bertani (LB) Broth, Luria Bertani (LB) Agar (Condalab, Spain), bu bakterilerin fajlarını üretme, titrelerinin ve litik aktivitelerinin saptanması için Luria Bertani (LB) yarı-katı agar (%0.8 w/v), *S. aureus* ve *E. faecalis* ve bu bakterilerin fajları için Tryptic Soy agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy yarı-katı agar (%0.8 w/v) (Acumedia, İtalya) kullanılmıştır. *Lactobacillus* suşlarının rutin kültürlerinde De-Man Rogosa and Sharpe (MRS) Agar ve De-Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Neogen, USA) besiyerleri kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Tüm ticari besiyerleri, üretici firmaların kullanım talimatlarına uygun şekilde cam şişelerde veya erlenmayerlerde hazırlandı ve 1.5 atmosfer basınç altında ve 121°C sıcaklıkta 20 dakikada otoklavlanarak sterilize edildi. Agar içeren besiyerleri, otoklav işlemi tamamlandıktan sonra 50-55°C su banyosunda kontrollü olarak soğutuldu ve steril petri kaplarına biyogüvenlik kabin içinde yaklaşık 25 mL olacak şekilde dökülerek katılaşması bekledi. Stoklanması gereken katı besiyerleri 4°C’de buzdolabında muhafaza edildi, sıvı besiyerleri ise oda sıcaklığında, kapalı dolaplarda saklandı.

3.2.2. Kimyasal ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

1M Tris-HCl

Ticari Tris-HCl (moleküler ağırlık (MW): 157.6 g/mol) kullanılarak hazırlandı. 78.8 g Tris-HCl tartıldı, distile su ile 500 mL’e tamamlandı. Solüsyonun pH’sı 1 N HCl ile 7.5’e ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

SM Çözeltisi

Faj partiküllerini süspanse etmek için kullanılan sodyum-magnezyum (SM) çözeltisi için 5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄.7H₂O ve 50 mL 1 M Tris-HCl (pH 7,5) bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

3.2.3. Bakteri Suşları, Bakterilerin Üretilmesi ve Stoklanması

Faj konağı ve larva enfeksiyon deneylerine kullanılan *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 23213, *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşları KTÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Bu suşlar -80°C’deki stoklarından Luria-Bertani (LB) ve Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerlerine ekim yapıldı ve 37°C’de 12–24 saat inkübe edildi. Agar besiyerlerinde üreyen bakterilerden birer koloni alınarak 5 mL sıvı besiyerine (Tryptic Soy Broth ve Luria-Bertani Broth, De-Man Rogosa and Sharpe Broth) inoküle edildi ve 12-24 saat *Lactobacillus* suşları hariç çalkalayıcı inkübatörde 120 rpm’de üretildi. *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus plantarum* suşları agar ve test tüplerinde sıvı besiyerlerinde mumlu kavanozda 37°C’de 24-48 saat kültür edildi. Sıvı besiyerinde üreyen bakteriler çalışma kültürleri olarak %20 gliserol içeren 2 mL kapasiteli krayo tüplerde birer mililitre hacimlerde -80°C’de stoklandı. Bu

çalışmada kullanılan TRSA kodlu klinik *S. aureus*, TEC kodlu klinik *E. coli* ve PA kodlu klinik *P. aeruginosa* suşları Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen tez çalışmaları kapsamında izole edilen suşlardan seçildi. KPA kodlu klinik *P. aeruginosa* suşları Dr. Enis F. Tüfekçi (Kastamonu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı) ve SSA kodlu gıda ve gıda çalışanlarının el ve burunları ile gıda çalışması yapılan yüzeylerden izole edilmiş *S. aureus* suşları Dr. İsmail Aydın'dan (Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü) temin edilmiştir. *Escherichia coli* suşları, kandan izole edilmiş çoklu ilaca dirençli (ÇİD) özelliğe sahip suşlardır. *Pseudomonas aeruginosa* suşları idrar, kan ve yaradan izole edilmiş karbapenem dirençli suşlar olarak karakterize edilmiştir. *Staphylococcus aureus* suşları metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşları içermektedir. Laktik asit bakteri suşları dirençli nişasta ile beslenen ratların kolonlarından izole edilmiş ve çalışmada kullanılan bakteri tür ve suşları Tablo 2'de listelenmiştir.

3.3. Fajların Zenginleştirilmesi

Litik fajlar, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Faj Kültür Koleksiyonunda mevcut tanımlanmamış faj karışımları ve Khorshidtalab ve ark. (108) tarafından tez çalışması kapsamında toplanan ve filtre edilerek -80°C'de stoklanan atık su örneklerinden izole edilerek saflaştırıldı. Bu amaçla, 100-200 µL karışık faj lizatı ve filtre edilmiş atık su örnekleri konak olarak kullanılacak bakterilerin LB ve TSB sıvı besiyerine (30 mL) 0,5 OD'ye ayarlanmış taze kültürlerine ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, faj enfeksiyonu yapılan kültürler 10 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Faj partiküllerini içeren süpernatant önce por çapı 0.45 µm ardından 0.22 µm olan enjektör filtrelerinden geçirildi ve bir damla kloroform ilave edilerek 4°C'de saklandı.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan bakteri türleri ve suşları

Bakteri türü/suşu	Kaynak/Referans
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	ATCC (https://www.atcc.org/products/43300)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	ATCC (https://www.atcc.org/products/35218)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ATCC (https://www.atcc.org/products/29212)
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	ATCC (https://www.atcc.org/products/7469)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC (https://www.atcc.org/products/4356)
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> ATCC 27139	ATCC (https://www.atcc.org/products/27139)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	ATCC (https://www.atcc.org/products/14917)
<i>Lactobacillus reuteri</i> (suş no: 1, 12, 21)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> (suş no: 15)	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>) (suş no: 16)	(103)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (suş no: 8)	
<i>Lactobacillus curvatus</i> (suş no: 11)	
<i>Enterococcus faecium</i> (suş no: 20)	
<i>Enterococcus durans</i> (suş no: 10)	
<i>Pediococcus acidilactici</i> (suş no: 6,16)	
<i>Escherichia coli</i> (suş no: TEC 003, TEC 007, TEC 008, TEC 013, TEC 017, TEC 020, TEC 026, TEC 027, TEC 034, TEC 045, TEC 052, TEC 053, TEC 055, TEC 064, TEC 069, TEC 071, TEC 092, TEC 095, TEC 096, TEC 097)	(104)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (suş no: KPA 1, KPA 2, KPA 3, KPA 4, KPA 7, KPA 9, KPA 11, KPA 12, KPA 16, KPA 17, KPA 18, KPA 19, KPA 20, KPA 21)	(105)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (suş no: PA 6, PA 15, PA 17, PA 29, PA 44)	(106)
<i>Staphylococcus aureus</i> [(suş no: TRSA 1, TRSA 2, TRSA 3, TRSA 4, TRSA 5, TRSA 6, TRSA 7, TRSA 8, TRSA 9, TRSA 10, TRSA 11, TRSA 12, TRSA13 (MRSA), TRSA 14, TRSA 15 (MRSA)]	(107)
<i>Staphylococcus aureus</i> [suş no: SSA 15 (MRSA), SSA 20 (MRSA), SSA 33 (MRSA), SSA 35, SSA 40, SSA 44 (MRSA), SSA 45, SSA 52 (MRSA), SSA 54, SSA 80, SSA 87 (MRSA), SSA 88, SSA 91 (MRSA), SSA 97 (MRSA), SSA 117 (MRSA)]	Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü

3.3.1. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması

Zenginleştirilen fajların titresinin ve saflıklarının test edilmesi amacıyla sıvı kültürlerde faj enfeksiyonu yapılarak çift kat agar besiyerlerinde tek plak deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, logaritmik fazın başında olan konak bakteriler, OD_{600 nm} de 0.5'e ayarlandı. Sıvı kültürlerden 0.3 mL ve zenginleştirilmiş faj lizatından 0.1 mL alındı ve 50°C'de soğutulmuş ve 1 mM MgCl₂ içeren 4 mL yarı-katı agara (%0.8) ilave edildi. Düşük devirde vortekslenerek tüm komponentler karıştırıldı ve bekletilmeden LB ve TSA agar bulunan plaklara döküldü ve donması beklendi. Ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve faj plaklarının oluşması sağlandı. Fajların saflaştırılması için, iyi izole olmuş bir faj plağı steril bir pipet ucu yardımıyla alınarak 5 mL taze konak kültürü içeren sıvı besiyerine (LB broth veya TSB) transfer edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün lizat santrifüj edildi (10 000 rpm, 15 dak) ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Sterilize edilmiş faj lizatı çift kat agar yöntemi ile saflık ve titre yönünden test edildi.

3.3.2. Yüksek Titre Faj Lizatlarının Hazırlanması ve Saklaması

Yüksek titre faj lizatları yüzeyi %80 ve üzeri faj plakları ile kaplanmış yarı-katı agarların toplanması veya sıvı konak kültürlerinin faj enfeksiyonu ile gerçekleştirildi. Sıvı kültürlerde tam enfeksiyon olmaması ve kültürlerin liz sonucu iyi berraklaşmaması durumunda yarı-katı agarlardan fajların kazınarak toplanması yöntemi tercih edildi. Faj plakları ile kaplı agar yüzeyi 3-4 mL SM tamponu ile kaplandı ve orbital çalkalayıcıda 60 dak çalkalanarak fajların yumuşak agardan ayrılmaları sağlandı. Agar yüzeyindeki yumuşak agar steril bir drigalski veya öze yardımı ile kazınarak 50 mL'lik falkon tüplere aktarıldı. Tüpler 10 000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek agar ve hücre kalıntılarının çökmesi sağlandı. Faj içeren süpernatant 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra titresini >10⁹ plak oluşturan birim (EOP) veya plaque forming unit (PFU)/mL olan lizatlar 4°C'de ve -80°C'de %20 gliserol içinde saklandı. Titresi düşük olan faj lizatları konsantre edilerek >10⁹ PFU/mL saklandı. Bu amaçla, düşük titreli fajlar geniş hacimlerde (100-250 mL konak enfeksiyonu veya 6-10 yarı-katı agar yöntemi) üretildikten sonra 0.5 M NaCl ve %10 PEG içinde 4°C'de bir gece bekletilerek 10 000 rpm'de 30 dak çöktürülerek konsantre edildi. Tuz varlığında PEG ile çöktürülen fajlar orijinal hacimlerinin 10 ila 100 kat küçük hacimde SM tamponunda süspanse edildikten sonra tekrar filtreden geçirilerek sterilize edildi ve titresini belirlenerek stoklandı.

3.3.3. Faj Titresinin Belirlenmesi

Titresi belirlenecek faj lizatlarının SM tamponunda 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı ve her dilüsyondan 0.1 mL alınarak yukarıda (3.3.1.) belirtildiği gibi konak hücre ve yarı katı agarla karıştırılıp faj titresi belirlendi. Her bir dilüsyon için iki agar plağı kullanıldı ve plak sayısı 25-250 arasında olan agar plakları mililitredeki faj partikül sayısı [plaque forming units/ mililitre (PFU/mL) = agar besiyerindeki plak sayısı (PFU) / ekilen faj miktarı x dilüsyon katsayısı] hesaplandı.

3.3.4. Fajların Konak Aralığının Belirlenmesi

Yüksek titrede saflaştırılan ve *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 23213, *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşlarına litik etki gösteren fajların konak spektrumları klinik izolatlar kullanılarak agar yüzeyine damlatma (agar-spot test) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bakteriyel süspansiyonların, spektrofotometrede optik yoğunlukları 0.4-0.5'e ayarlandı (yaklaşık 1×10^8 CFU/mL) ve 0.1-0.2 mL hacimde TSA ve LB agar besiyeri yüzeyine yayıldı ve biyogüvenlik kabini içinde 15 dak agar yüzeyinin kuruması sağlandı. Otomatik pipet yardımıyla 10 µL faj lizatı agar yüzeyine damlatıldı ve 37 °C'de 12-18 saat kültür edildi. Faj damlatma bölgelerinde oluşan inhibisyon miktarı "+++", "++" ve "+" berrak veya yarı-berrak olarak, litik etki göstermeyen konaklar "-" olarak değerlendirildi.

3.3.5. Fajların Elektron Mikroskopik Morfolojileri

Faj süspansiyondan 5 µL alınarak karbon kaplı formvar film gridine (Sigma-Aldrich, USA) damlatıldı, iki dakika sonra filtre kâğıdı ile fazla sıvı toplandı ve iki kez 5 µL distile su ile 1 dak yıkandı ve ekstra su filtre kâğıdı ile toplandı. Takiben 10 µL, %2'lik uranil asetat (pH 4-4.5) ile üç dak boyandı ve kurutuldu. Hazırlanan preparat 100x büyütmede, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi, ARUM Merkezi Laboratuvar TEM bölümünde bulunan JEOL JEM 1220 markalı geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) görüntülendi ve fotoğraflandı (109).

3.3.6. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabilitelerinin Saptanması

Fajların farklı sıcaklık koşullarındaki stabilitesi 4, 36, 42, 50, 55, 60, 70 ve 80°C'de 60 dak süreyle inkübe edilerek test edildi. İnkübasyon sonrası fajların biyolojik aktivitesi, çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak oluşan plak sayısı saptanarak belirlendi.

Sıcaklık stabilite testine benzer şekilde faj lizatları, 2 ila 13 arasında değişen pH'lara ayarlanmış fosfat tamponunda (PBS) 60 dak boyunca farklı pH seviyelerine maruz bırakıldı

ve fajların biyolojik aktivitesi (titre değışikliğı), çift tabakalı agar yöntemi ile belirlendi (110).

3.3.7. Fajların Optimum Enfektivite Değerlerinin Belirlenmesi

Fajın enfekte ettiğı konak bakteriye oranı veya enfeksiyonun derecesi (multiplicity of Infection, MOI) fajın enfektivitesini en verimli şekilde gösterebildiğı optimum MOI değeri belirlendi. MOI 0.01, 0.1, 1 ve 10 olacak şekilde dört farklı MOI (faj/bakteri oranı) test edildi. Deneysel uygulamada, konak bakterinin optik yoğunluğu ($OD_{600\text{ nm}}$) 0.4–0.5'e (yaklaşık 10^8 CFU/mL) ulaştığında, her MOI değerine karşılık gelecek şekilde hesaplanan miktarda faj, bakteri süspansiyonuna ilave edildi. Faj-bakteri karışımı 37°C'de statik (*S. aureus* ve *E. faecalis*) ve çalkalamalı (*P. aeruginosa* ve *E. coli*) inkübasyonda (120 rpm) 6 saat inkübe edildi ve faj süspansiyonları seri dilüsyonlarla seyreltildi ve çift tabakalı agar yöntemi kullanılarak faj titreleri (PFU/mL) belirlendi. En yüksek faj titre değerinin elde edildiğı MOI, optimum MOI olarak kabul edildi (111).

3.3.8. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi

Tek aşamalı gelişme eğrisi (one-step growth curve) analizinde, absorbans değeri 0,5'e ulaşan logaritmik fazdaki bakteri (10^8 CFU/mL) kültürleri ve faj MOI değeri 10 olacak şekilde eşit hacimde (1:1) karıştırıldı ve adsorpsiyon işlemi için 37°C'de 15 dak inkübe edildi. Adsorpsiyon süresinin ardından, ortamda kalan serbest faj partiküllerini uzaklaştırmak amacıyla karışım 8,000 rpm'de 15 dak santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen faj-bakteri peleti, 10 mL taze LB sıvı besiyerinde süspanse edildi ve 180 rpm'de çalkalanarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 90 dak boyunca her 15 dakikada bir 50 µL örnek alınarak SM buffer ile 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı ve ardından çift tabakalı agar yöntemiyle plak sayımı yapılarak faj titreleri (PFU/mL) belirlendi (112).

3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Hücresiz Kültür Sıvılarının Hazırlanması

Hücresiz kültür sıvısı (cell-free extract, CFE) veya süpernatant (postbiyotik), kaynağı olarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan 15 laktik asit bakteri (Tablo 2) suşu tarandı. Bu bakterilerden rat colon izolatu olan *Lactobacillus reuteri* 1 ve *Lactobacillus plantarum* 16 suşlarının (113) hücresiz kültür sıvıları ile çalışma gerçekleştirildi. Hücresiz kültür sıvısı elde etmek için, her bir suşun, 25-30 mL MRS sıvı besiyerinde kültürleri yapılarak, mikroaerofilik olarak 37°C'de 24-36 saat inkübe edildi. Kültürler 10 000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi ve süpernatant, 0.22 µm membran filtreden geçirilerek sterilize edildi. Hazırlanan hücresiz kültür sıvıları, kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı (114).

3.5. Laktik Asit Hücresiz Kültür Sıvılarının Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

3.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Laktik asit hücresiz kültür sıvılarının antimikrobiyal etkisini değerlendirmek amacıyla agar kuyucuk difüzyon yöntemi uygulandı. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* PAO1 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşlarının optik yoğunlukları 0.4-0.5 ayarlandı ve steril pamuklu çubuk yardımıyla Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarının yüzeyine homojen şekilde yayıldı. Her petri kabında 6 mm çapında kuyucuklar açıldı ve her kuyucuğa 50 µL hücresiz kültür sıvıları eklenerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek en etkili antimikrobiyal etkiye sahip laktik asit bakteri hücresiz kültür sıvıları belirlendi ve çalışma bu sıvılar kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.2. Laktik Asit Hücresiz Kültür Sıvıları, Bakteri süspansiyonu ve Faj Kombinasyonunun *In Vitro* Bakterisidal Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakterisidal etkinlik testlerinde kullanılan *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşları Tryptic Soy Agar ve Luria-Bertani Agar besiyerlerinde 37°C'de 12-18 saat kültür edildi. Agar besiyerinden 3-5 izole koloni 5 mL PBS içinde süspanse edilerek yoğunlukları spektrofotometrede optik yoğunlukları (OD_{600nm}) 0.4-0.5'e ayarlandı. Her bakteri için tek başına kültür sıvısı, faj ve kültür sıvısı ile faj kombinasyonu olacak şekilde üç test edildi. Kontrol grubu olarak bakteri süspansiyonuna pH'sı kültür sıvısı pH'sına ayarlanmış PBS ilave edildi. Bakteri süspansiyonları 1:1:1 oranında kültür sıvısı, faj ve faj ile kültür sıvısı kombinasyonu ilave

edildikten sonra 37°C’de inkübe edildi. Başlangıçta ve birer saat aralıklarla toplamda 2 saat örnekler alınarak canlı bakteri sayısı saptandı. Faj enfeksiyonu için MOI değeri en az 10 kullanıldı. Bulgular kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edildi (115, 116).

3.6. *Galleria mellonella*’nın Üretilmesi ve Enfeksiyon Testlerinde Kullanılacak Larvaların Elde Edilmesi

Galleria mellonella kültürleri özel olarak hazırlanmış yapay bir besiyerinde larvalar 200- 350 mg ağırlığa ulaşınca kadar %60 bağıl nem ve 25-30°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Yapay besiyeri; 22 g buğday unu, 22 g buğday kepeği, 11 g süt tozu, 5.5 g kuru maya, 17 g bal mumu, 11 mL gliserol ve 11 mL bal içerecek şekilde hazırlandı. Katı ve sıvı bileşenler ayrı ayrı hazırlandı, ardından homojen şekilde karıştırıldıktan sonra 25-30 g olacak şekilde temiz kavanozlara dağıtılarak kullanılıncaya kadar 4°C’de muhafaza edildi (117).

3.7. Patojen Bakterilerin *G. mellonella* Larvaları için Öldürücü Enfeksiyon Dozlarının Belirlenmesi

Galleria mellonella larvaları için her bir patojen bakteri suşunun (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) öldürücü enfektif dozları (Lethal Enfective Dose, LD₅₀) için her bir bakterinin fosfat tamponu içinde taze süspansiyonları kullanıldı. Kısaca, bakterilerin bir gecelik agar kültürlerinden iyi izole olmuş 8-10 koloni 30 mL PBS içerisinde süspanse edilerek OD değeri 0.5’e ayarlandı (yaklaşık 10⁸ CFU/mL). Hazırlanan bu süspansiyondan 10 kat sulandırım ile 10⁵ CFU/10 µL, direkt kullanılarak ve 10⁶ CFU/10 µL, 10 kat konsantre edilerek 10⁷ CFU/10 µL enfeksiyon dozları elde edildi. Hazırlan her inokulum dozu koloni sayımı ile doğrulandı.

Larvaların enfeksiyon için hazırlanmasında ve enfeksiyonun gerçekleştirilmesinde Maslova ve ark, (118)’nın tarif ettikleri yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Enfeksiyon öncesinde, yaklaşık 180-250 mg ağırlığındaki her bir bakteri dozlaması için en az onar *G. mellonella* larvası içinde filtre kâğıdı olan bir petri plağına alındı ve %70 lik alkol ile birkaç saniye spreyleyerek vücudun dışı dezenfekte edildi. Larvalar bekletilmeden temiz filtre kâğıdı bulunan Petrilere transfer edildi ve alkolün buharlaşması için petrilerin kapakları açık olarak biyogüvenlik kabininde 5-10 dak bekletildi. Larvaların dorsal bölgelerinde yaklaşık 1 mm çapında kızdırılmış orta büyüklükte bir toplu iğne başı veya küçük çivi ile yaklaşık 1-

2 mm çapında yanık lezyonu oluşturuldu. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 10  L yanık bölgesine uygulandı. Larvalar 30 C’de 24-96 saat boyunca canlılık yönünden gözlemlenerek her bir patojenin larvaların yarısını öldürdüğü dozu belirlendi (119).

3.8. *Galleria mellonella* Yanık Yara Enfeksiyon Modelinin Oluşturulması, Faj ve LAB Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Uygulanması

Galleria mellonella larvalarında yanık ve enfeksiyon modeli oluşturularak, faj ve LAB hücresiz kültür sıvılarının kombine tedavi etkinliğ test edildi. Larvalar enfeksiyon sonrası faj ve hücresiz kültür sıvıları tek doz ve takip eden 6 saat sonra ikinci tedavi dozu uygulaması şeklinde gerçekleştirildi (Tablo 3). Yanık uygulamasının ardından LD₅₀’e göre enfeksiyon oluşturmak için her larvaya, 10⁶ CFU/larva olacak şekilde 10  L bakteri süspansiyonu yanık bölgesine uygulandı. Enfeksiyon oluşturulduktan 15 dak sonra, kombine tedavi grubunda yer alan larvalara önce 10  L bakteriyofaj süspansiyonu (MOI 10), 15 dakika sonra 10  L hücresiz kültür sıvısı (CFE) uygulandı. Tedavi sonrası larvalar, 30 C’de inkübe edildi ve larvalar gözlemlenerek tüm deney grupları için hayatta kalım oranları ve morfolojik değışiklikler 12, 24, 36, 48, 72 ve 96 saat boyunca takip edildi (120). Deneyler 3 kez bağımsız olarak tekrarlandı.

Tablo 3. *Galleria mellonella* larvalarında tek ve iki doz tedavi uygulama rejimi

Uygulanan Doz	Deney Grubu	Açıklama
Tek Doz	Kontrol (PBS)	Enfekte edilen larvalara tedavi uygulanmaz, sadece 10 µL PBS verilir.
Tek Doz	Faj (MOI 10)	Enfeksiyondan 15 dk sonra 10 µL faj (MOI:10) uygulanır.
Tek Doz	Laktik asit hücresiz kültür sıvıları (CFE)	Enfeksiyondan 15 dk sonra 10 µL hücresiz kültür sıvısı (CFE) uygulanır.
Tek Doz	Kombine (Faj + CFE)	Enfeksiyondan 15 dk sonra 10 µL faj, ardından 15 dk sonra 10 µL CFE uygulanır.
İki Doz	Faj (MOI 10)	0. ve 6. saatte 10 µL faj (MOI:10) uygulanır.
İki Doz	Laktik asit hücresiz kültür sıvıları (CFE)	0. ve 6. saatte 10 µL CFE uygulanır.
İki Doz	Kombine (Faj + CFE)	0. ve 6. saatlerde her biri 15 dk arayla 10 µL faj ve 10 µL CFE uygulanır.

4. BULGULAR

4.1. Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Faj konağı ve larva enfeksiyon deneylerinde kullanılan *S. aureus* ATCC 43300, *E. faecalis* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşlarının optik yoğunlukları (OD_{600 nm} de 0.5 değerine ayarlanarak canlı hücre sayımları yapıldı. OD 0.5 değerinde, *S. aureus* ATCC 43300 için 4×10^8 CFU/mL, *E. faecalis* ATCC 29213 için 3×10^8 CFU/mL, *E. coli* ATCC 35218 için 4×10^8 CFU/mL ve *P. aeruginosa* PAO1 için 5×10^8 CFU/mL bulundu. Bu veriler, deneysel çalışmalarda enfeksiyon modelinin standardizasyonu açısından referans olarak kullanıldı.

4.2. Litik Etkili Fajların ve Konak Spektrumlarının Saptanması

Staphylococcus aureus klinik izolatu izole edilip saflaştırılan 5 faj lizatına karşı (ΦSA 29, ΦSA 43, ΦSA 65, ΦSA 3 ve ΦSA 5) konak olarak test edildi. Bu fajlardan ΦSA 43 fajı, 30 izolatu 15'inde litik aktivite göstererek %50 konak aralığı ile en geniş etkiye sahip faj olarak belirlendi. *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında 6 faj (ΦPA 3, ΦPA 2, ΦPAG 3, ΦPAG 2, ΦPA 4 ve ΦPA 5) test edilmiş olup, ΦPAH 2 fajı 15 izolat üzerinde pozitif etki göstererek %75 konak aralığı ile en etkili faj olarak tespit edildi. Ancak elektron mikroskop görüntüsünde istenilen görüntü alınamadığı için, görüntü alınabilen ΦPAG 2 fajı ile çalışmalara devam edildi. *Escherichia coli* klinik izolatlarında 3 faj (ΦECO 35, ΦEC 4 ve ΦEC 5) test edildi ve ΦECO 35 fajı 14 izolat üzerinde litik aktivite göstererek %70 konak aralığı ile en yüksek etkiye sahip faj oldu. *In vitro* ve *in vivo* deneylere en etkili konak aralığına sahip fajlar ile devam edildi.

Tablo 4. Fajların *S. aureus* klinik izolatlarına karşı etkinliği.

Faj Kodu	Pozitif test sayısı (n=30)	Konak Aralığı (%)
ΦSA 29	12	40
ΦSA 43	15	50
ΦSA 65	6	20
ΦSA 3	6	20
ΦSA 5	9	30

Tablo 5. Fajların *P. aeruginosa* klinik izolatlarına karşı etkinliği.

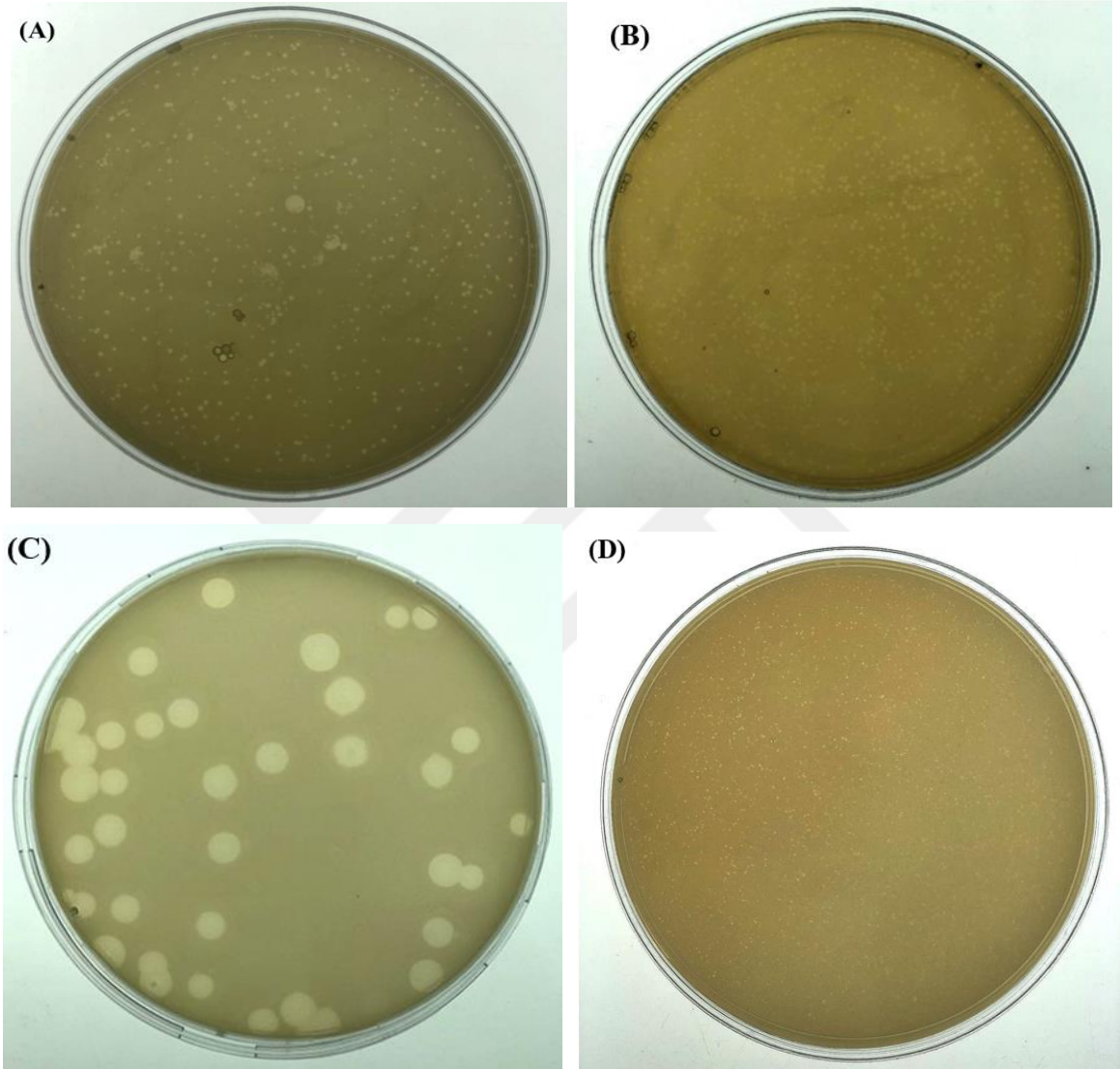
Faj Kodu	Pozitif test sayısı (n=20)	Konak Aralığı (%)
ΦPA 3	9	45
ΦPA 2	11	55
ΦPAG 3	6	30
ΦPAG 2	10	50
ΦPA 4	15	75
ΦPA 5	14	70

Tablo 6. Fajların *E. coli* klinik izolalarına karşı etkinliği.

Faj Kodu	Pozitif test sayısı (n=20)	Konak Aralığı (%)
ΦECO 35	14	70
ΦEC 4	8	40
ΦEC 5	10	50

4.3. Litik Faj Enfeksiyonunun Yapılması ve Fajların Saflaştırılması

Saf olarak izole edilen faj lizatları tekrar test edilerek litik etkinlik ve saflık doğrulandı (Şekil 7). Faj lizatları 4°C'de saklandı.



Şekil 7. Fajların plak morfolojileri. A; *P. aeruginosa* PA01 φPAG 2, B; *E. faecalis* ATCC 29213 φEFE 2, C; *E. coli* ATCC 35218 φECO 35, D; *S. aureus* ATCC 43300 φSA 43.

4.4. Faj Titrelerinin Belirlenmesi

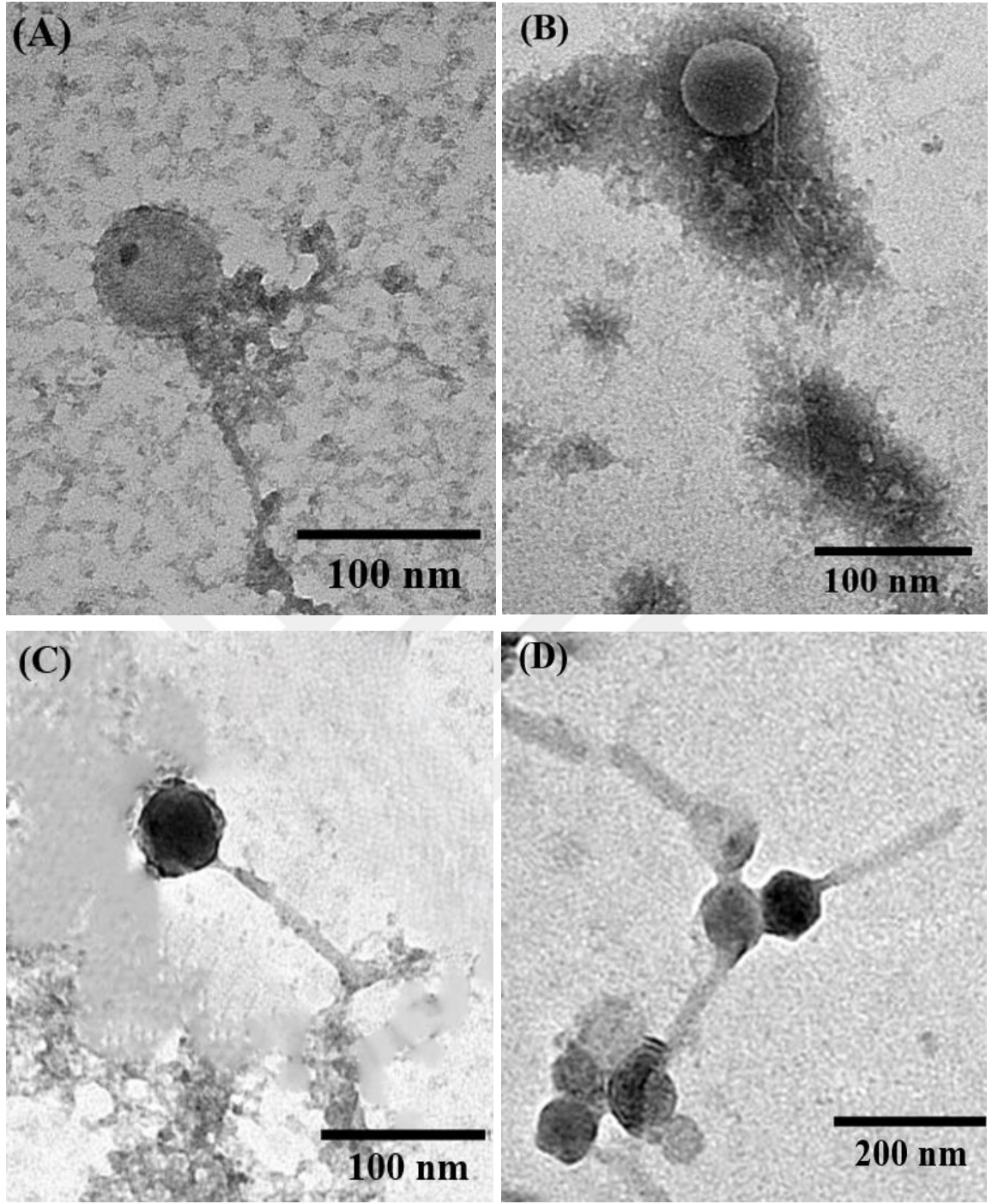
Faj titresi, 25–250 arası plak içeren örneklerden elde edilen sonuçlar ile PFU/mL değerleri hesaplandı. Hesaplamada kullanılan formül: $\text{PFU/mL} = \text{Plak sayısı} / (\text{ekilen hacim} \times \text{dilüsyon katsayısı})$ şeklindedir. Tablo 7'de fajların, plak morfolojilerinin görünümü ve titreleri verilmiştir. Φ PAG 2, en yüksek titreye ait fajdır. Fajlarda halo gözlemlenmemiştir. Çap ölçümlerinin sonuçlarında en yüksek çapa sahip Φ ECO 35 fajıdır.

Tablo 7. Fajların plak morfolojik özellikleri ve titreleri.

Faj	Plak morfolojisi	Plak çapı (mm)	Faj titresi (PFU/mL)
Φ ECO 35	Berrak, halosuz	3.0	1×10^{10}
Φ EFE 2	Berrak, halosuz	1.0	$1,1 \times 10^{10}$
Φ PAG 2	Berrak, halosuz	1.0	2×10^{12}
Φ SA 43	Yarı-Berrak, halosuz	1.0	1×10^{10}

4.5. Fajların Elektron Mikroskopik görüntüleri

Fajların morfolojik karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirildi. Negatif boyama yöntemiyle elde edilen mikrograflarda, faj partiküllerinin baş ve kuyruk yapıları net bir şekilde gözlemlenmiştir. Şekil 8'de faj partiküllerinin TEM görüntüsü sunulmuştur.

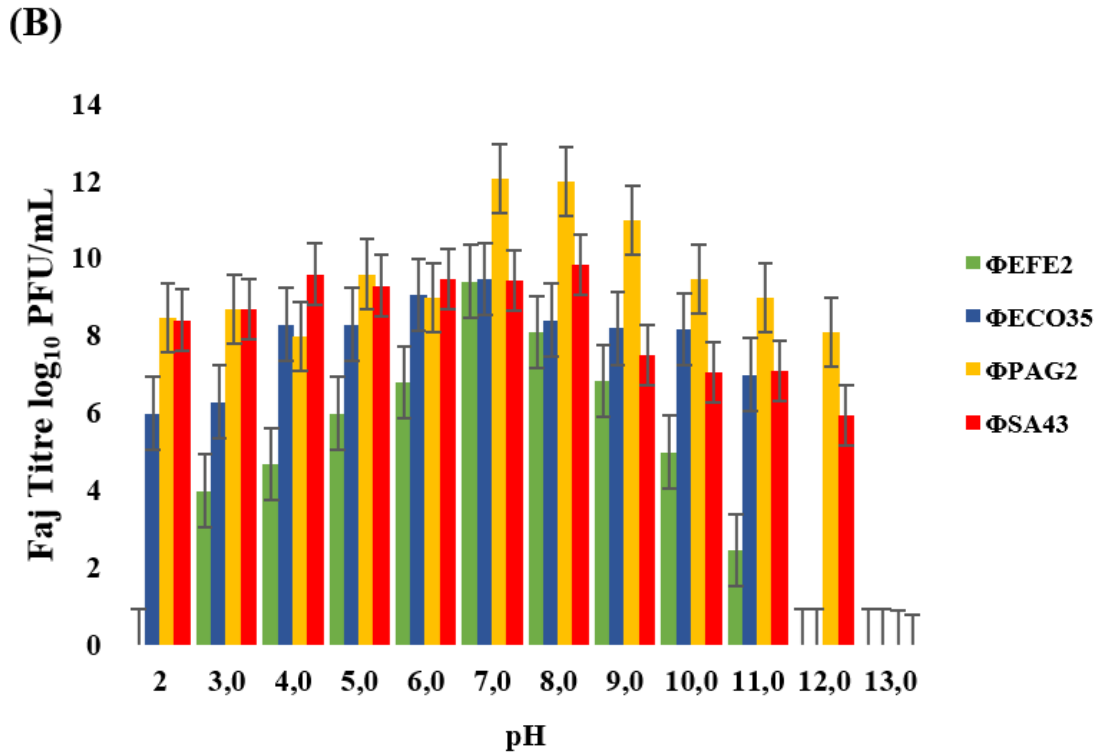
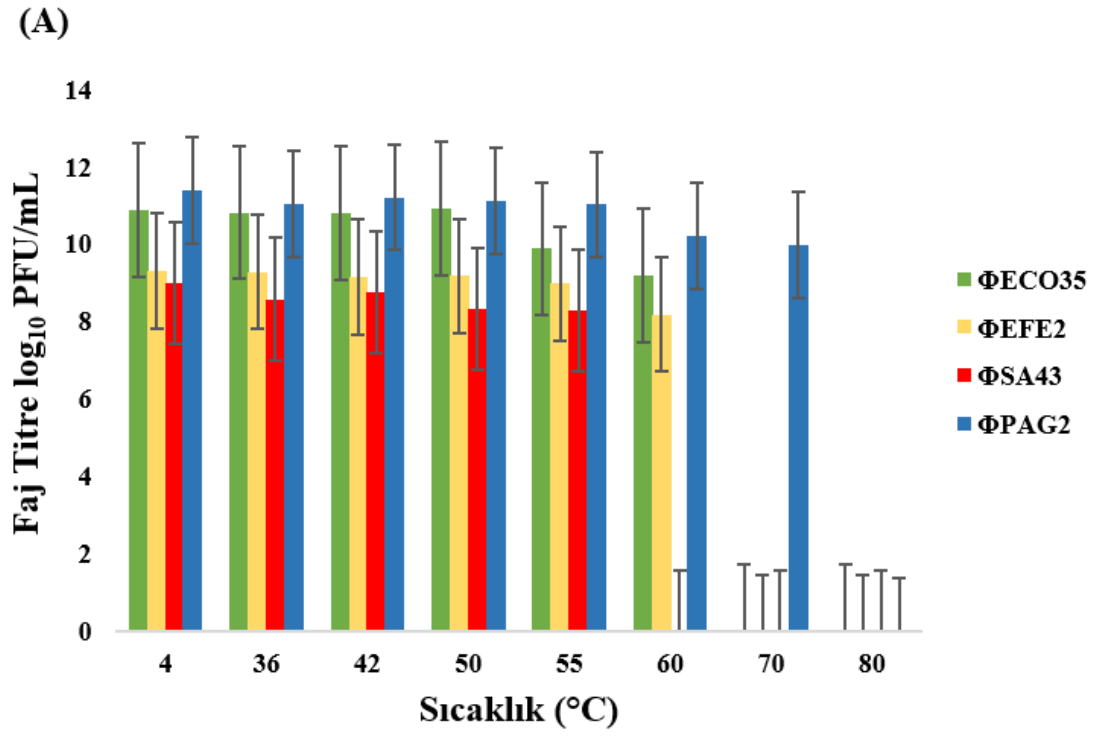


Şekil 8. Fajlarının elektron mikroskop görüntüleri. A; Φ ECO 35, B; Φ EFE 2, C; Φ SA 43, D; Φ PAG 2.

4.6. Fajların Farklı Sıcaklık ve pH Koşullarına Karşı Stabiliteleri

ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajları, geniş sıcaklık aralıklarında (4°C ile 80°C) ve pH (2-13) değerlerinde stabilite yönünden test edildi (Şekil 9). Dört fajın da 4-50°C aralığında yüksek stabilite gösterdiği gözlemlendi. ΦPAG 2 dışındaki fajlarda 55°C sıcaklığa kadar anlamlı bir azalma olmamakla birlikte, 60°C'de özellikle ΦEFE 2 ve ΦSA 43'ün titrelerinde düşüşler kaydedildi. 70°C ve 80°C'de ise ΦECO 35, ΦEFE 2 ve ΦSA 43 fajlarının infektivitesini tamamen kaybettiği yalnızca ΦPAG 2 fajının 10⁹ PFU/mL civarında aktivitesini koruyabildiği belirlendi. Bu sonuçlar, ΦPAG 2'nin yüksek sıcaklıklara karşı daha dayanıklı bir faj olduğunu, diğer üç fajın ise 60°C üzerindeki sıcaklıklarda yapısal bozulmaya uğradığını gösterdi.

Fajların farklı pH koşullarındaki stabiliteleri ise, pH 6.0 ile 8.0 aralığında tüm fajlar yüksek stabilite gösterdi. Özellikle en yüksek stabiliteyi gösteren faj ΦPAG 2 oldu. pH 5.0 ve 9.0'da da fajlar kısmen stabil kalmayı sürdürdü; ancak ΦEFE 2 fajının duyarlılığı düşük olarak gözlemlendi. pH 3.0 ve 10.0 değerlerinde faj titrelerinde belirgin azalmalar gözlemlendi. Özellikle ΦEFE 2 ve ΦECO 35 fajları daha belirgin bir azalma gösterdi. pH 2.0 ve pH 12.0-13.0 gibi ekstrem değerlerde ise tüm fajların inaktiviteye uğradığı ve titrelerinin sıfıra yakınlığı görüldü. Bu sonuçlar, fajların hafif asidik ve nötr ortamlarda daha stabil olduğunu, aşırı asidik ve bazik ortamlarda ise yapısal bozulmalara bağlı olarak infektivite kaybı yaşadıklarını ortaya koymaktadır.



Şekil 9. Fajların farklı sıcaklık (A) ve pH (B) koşullarına karşı stabiliteleri.

4.7. Fajların Optimal Enfeksiyon Koşullarının Belirlenmesi

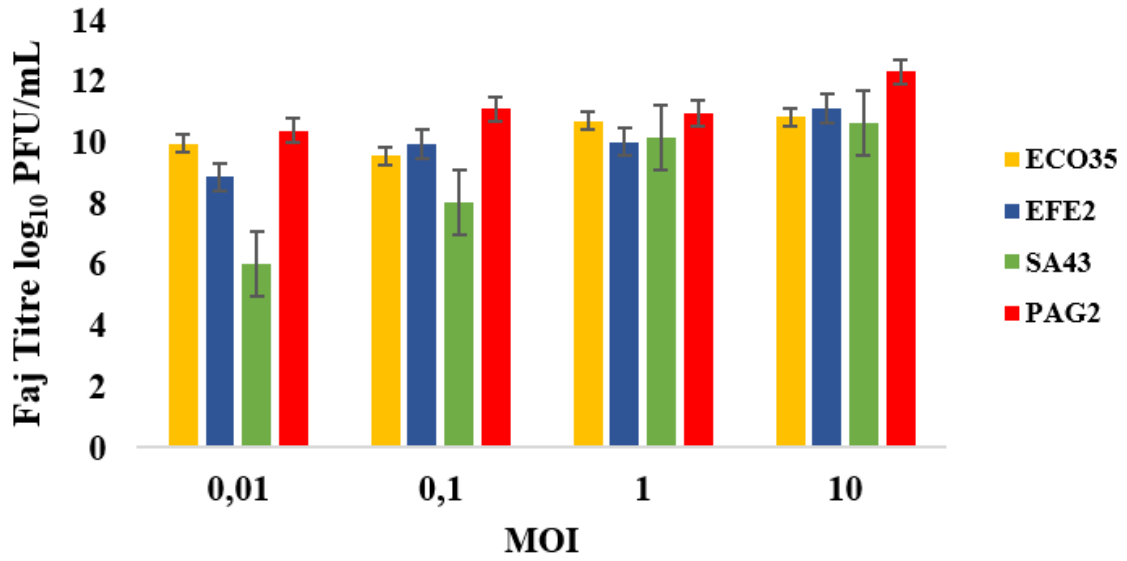
ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajları, optimum enfektifime değerlerinin belirlenmesi için konak bakterileri farklı MOI değerleriyle enfekte edildi ve 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, çift agar yöntemi kullanılarak faj titreleri belirlendi (Şekil 10).

ΦECO 35 fajı için MOI 0.01'de ortalama faj titresi 9.96 ± 0.22 log PFU/mL, MOI 0.1'de 9.54 ± 0.66 log PFU/mL, MOI 1'de 10.70 ± 0.57 log PFU/mL ve MOI 10'da ise 10.82 ± 0.45 log PFU/mL olarak bulundu. En yüksek faj titresi 10.82 ± 0.45 log PFU/mL olarak 10 MOI'de elde edildi.

ΦEFE 2 fajı için MOI 0.01'de ortalama faj titresi 8.87 ± 0.62 log PFU/mL, MOI 0.1'de 9.93 ± 0.04 log PFU/mL, MOI 1'de 10.00 ± 0.10 log PFU/mL ve MOI 10'da 11.10 ± 0.14 log PFU/mL olarak bulundu. En yüksek faj titresi 11.10 ± 0.14 log PFU/mL olarak 10 MOI'de elde edildi.

ΦSA 43 fajı için, MOI 0.01'de ortalama faj titresi 6.03 ± 0.11 log PFU/mL, MOI 0.1'de 8.00 ± 0.35 log PFU/mL, MOI 1'de 10.15 ± 0.21 log PFU/mL ve MOI 10'da 10.65 ± 0.07 log PFU/mL olarak bulundu. En yüksek faj titresi 10.65 ± 0.07 log PFU/mL olarak 10 MOI'de elde edildi.

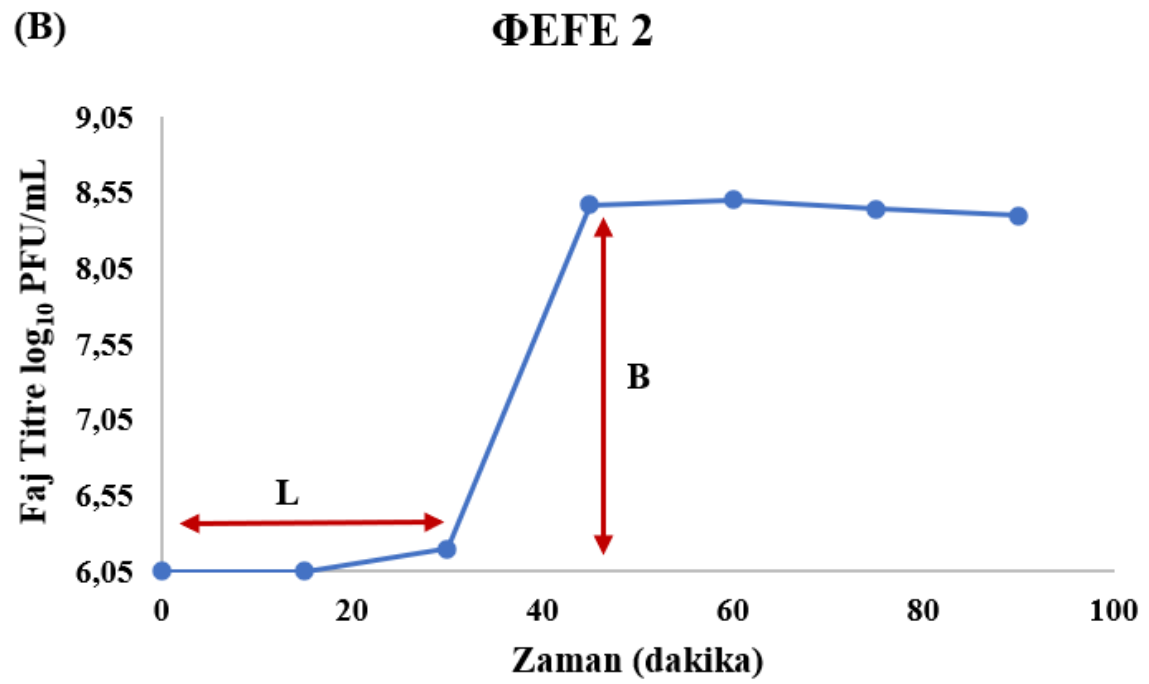
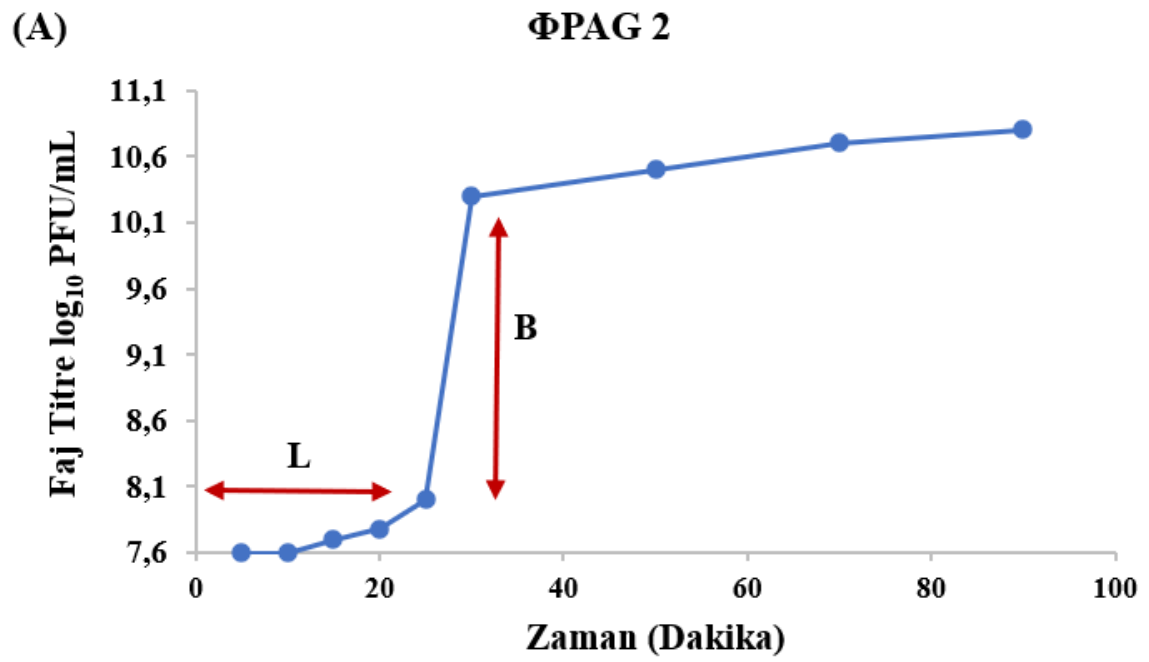
ΦPAG 2 fajı için, MOI 0.01'de ortalama faj titresi 10.38 ± 0.44 log PFU/mL, MOI 0.1'de 11.09 ± 0.12 log PFU/mL, MOI 1'de 10.95 ± 0.98 log PFU/mL ve MOI 10'da 12.30 ± 0.13 log PFU/mL olarak bulundu. En yüksek faj titresi 12.30 ± 0.13 log PFU/mL olarak 10 MOI'de elde edildi.

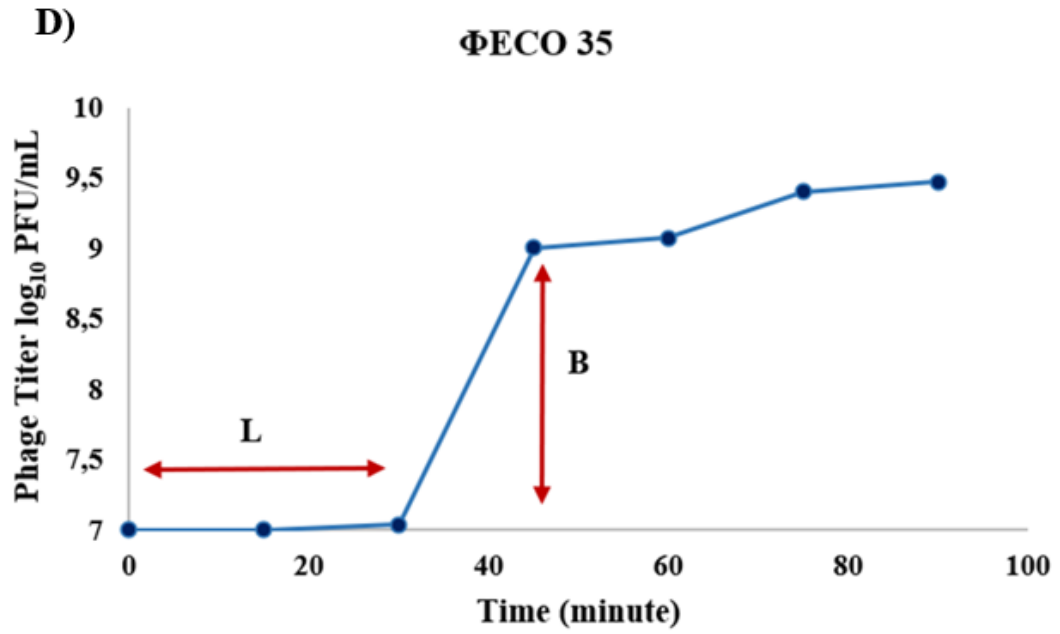
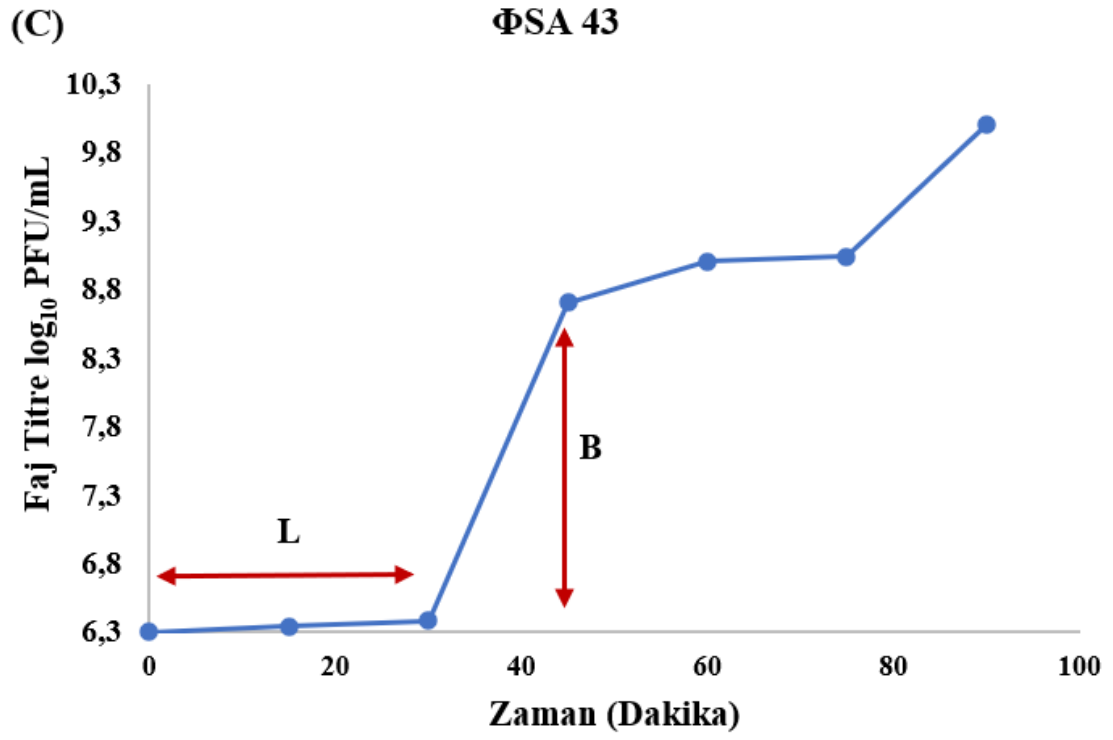


Şekil 10. Fajların optimum enfeksiyon çokluğu (MOI) değerleri.

4.8. Fajların Tek Aşamalı Gelişme Grafiklerinin Belirlenmesi

Fajların tek aşamalı gelişme eğrileri, yaşam döngüsü ve adsorpsiyon yeteneklerini karakterize etmek amacıyla incelendi. Bu deneylerde, serbest faj sayılarının latent dönem ve patlama büyüklüğü hesaplandı (Şekil 11). Φ ECO 35, Φ EFE 2, Φ SA 43 ve Φ PAG 2 fajlarının latent süreleri sırasıyla 30, 30, 30 ve 25 dakika olarak belirlendi. Enfekte her bir bakteri için patlama büyüklükleri ise sırasıyla her enfekte hücre başına yaklaşık 100, 187, 208 ve 200 faj olarak tespit edildi.

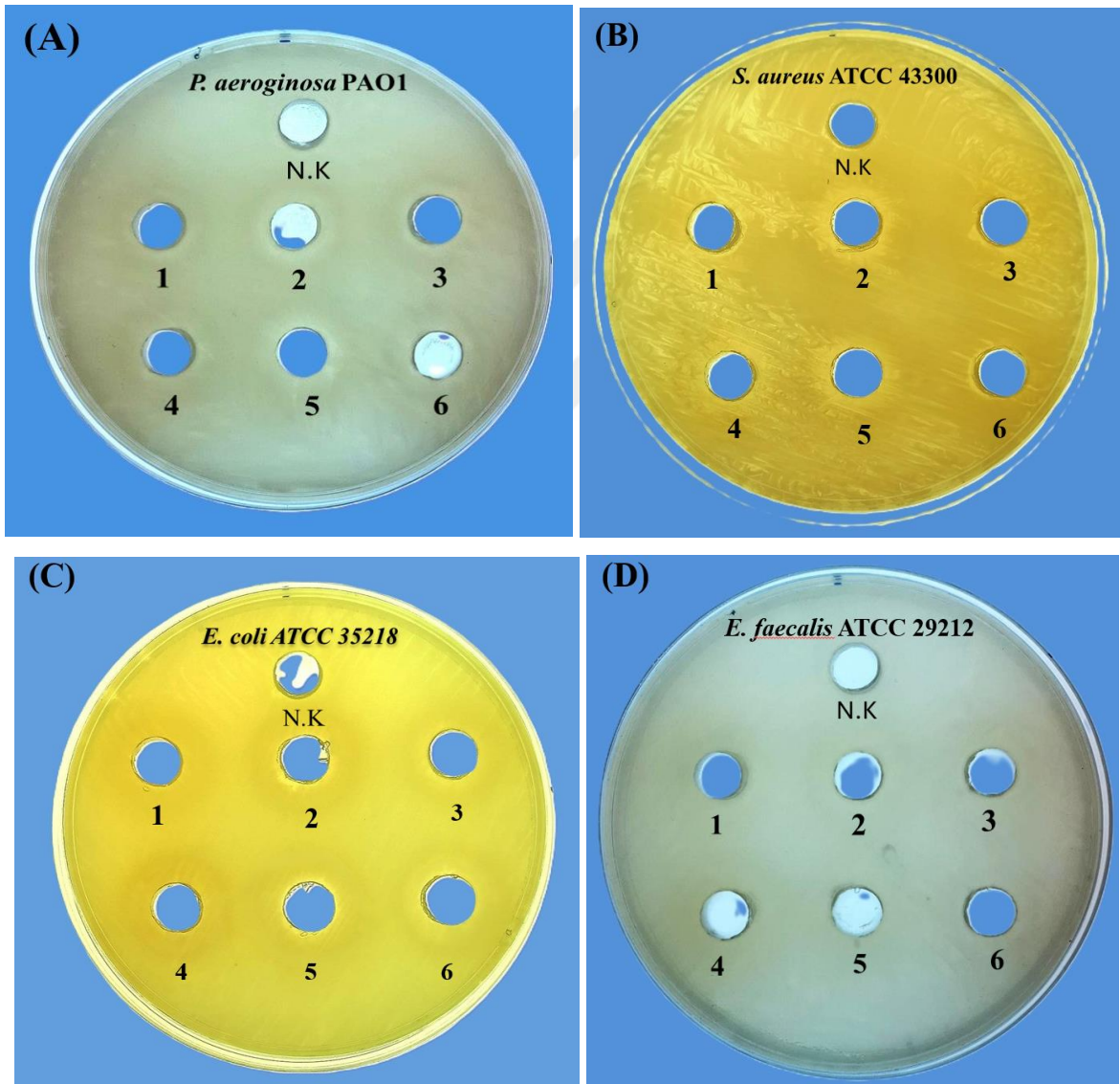




Şekil 11. Fajların tek aşamalı gelişme grafikleri. A; Φ PAG 2, B; Φ EFE 2, C; Φ SA 43, D; Φ ECO 35.

4.9. Laktik Asit hücresiz kültür sıvılarının antibakteriyel etkisinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılacak laktik asit hücresiz kültür sıvılarının antibakteriyel etkilerini tahmin etmek için agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanıldı. Hücresiz kültür sıvıları kuyucuklara eklendi. Negatif kontrol olarak MRS Broth kullanıldı. 15 LAB bakteri hücresiz kültür sıvısı test edildi. Çalışmaya etkili olduğu düşünülen 2 tane LAB hücresiz kültür sıvısı ile devam edildi. Hücresiz kültür sıvılarının bakterilere karşı oluşturdukları antimikrobiyal etkilerini belirten zon çapları Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. LAB hücresiz kültür sıvılarının mikroorganizmalar üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları. 1; *L. reuteri* 21, 2; *L. reuteri* 1, 3; *L. johnsoni* 8, 4; *P. acidilactici* 6, 5; *L. reuteri*, 6; *P. acidilactici* 16. N. K; negatif kontrol.

4.10. Laktik Asit Hücresiz kültür sıvılarının Faj-Konak Enfeksiyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, laktik asit hücresiz kültür sıvılarının (CFE) tek başına ve faj ile kombinasyon halinde uygulanmasının bakteriyel canlılık üzerindeki etkisi incelendi. Her iki deneyde de bakteriyel canlılık CFU/mL cinsinden 2 saatlik olarak ölçüldü. Veriler, üç bağımsız deneyin ortalaması ve standart sapması (ortalama $\pm$ SD) olarak sunuldu (Tablo 8-11).

Tablo 8. *Lactobacillus reuteri* 1 hücresiz kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak *E. coli* üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart sapma).

Zaman (Saat)	<i>E. coli</i> + Φ ECO 35 + CFE	<i>E. coli</i> + Φ ECO 35	<i>E. coli</i> + CFE	Kontrol (<i>E. coli</i> +PBS)
0	8.33 $\pm$ 0.36	8,59 $\pm$ 0.4	8.34 $\pm$ 0.34	8.84 $\pm$ 0.16
1	7.47 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.5	7.32 $\pm$ 0.67	8.78 $\pm$ 0.29
2	6.8 $\pm$ 0.8	6.72 $\pm$ 0.58	7.1 $\pm$ 0.8	8.75 $\pm$ 0.32

Tablo 9. *Lactobacillus reuteri* 1 hücresiz kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak *P. aeruginosa* üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart sapma).

Zaman (Saat)	<i>P. aeruginosa</i> + Φ PAG 2 + CFE (n=2)	<i>P. aeruginosa</i> + Φ PAG 2 (n=2)	<i>P. aeruginosa</i> + CFE (n=2)	Kontrol (<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> + PBS) (n=2)
0	9.04 $\pm$ 0.03	8.99 $\pm$ 0.21	8.5 $\pm$ 0.39	8.95 $\pm$ 0.05
1	6.68 $\pm$ 0.22	7.54 $\pm$ 0.31	7.8 $\pm$ 0.16	9.45 $\pm$ 0.25
2	4.39 $\pm$ 0.39	5.54 $\pm$ 0.16	7.34 $\pm$ 0.08	9.2 $\pm$ 0.3

Tablo 10. *Lactobacillus reuteri* 1 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak *S. aureus* ATCC 43300 üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart sapma).

Zaman (saat)	<i>S. aureus</i> + Φ SA 43 + CFE (n=2)	<i>S. aureus</i> + Φ SA 43 (n=2)	<i>S. aureus</i> + CFE (n=2)	Kontrol (<i>S. aureus</i> + PBS) (n=2)
0	8.17 $\pm$ 0.17	8.52 $\pm$ 0.08	8.54 $\pm$ 0.27	8.38 $\pm$ 0.38
1	5.15 $\pm$ 0.15	5.48 $\pm$ 0.09	6.15 $\pm$ 0.11	8.46 $\pm$ 0.04
2	3.62 $\pm$ 0.15	4.17 $\pm$ 0.33	5.12 $\pm$ 0.17	8.32 $\pm$ 0.12

Tablo 11. *Lactobacillus planterum* 16 hücreli kültür sıvısının tek başına ve faj ile kombinasyon olarak *E. faecalis* üzerine etkisi (ortalama $\pm$ standart sapma).

Zaman (saat)	<i>E. faecalis</i> + Φ EFE 2 + CFE (n=2)	<i>E. faecalis</i> + Φ EFE 2 (n=2)	<i>E. faecalis</i> + CFE (n=2)	Kontrol (<i>E. faecalis</i> + PBS) (n=2)
0	8.46 $\pm$ 0.35	8.54 $\pm$ 0.14	8.51 $\pm$ 0.28	8.42 $\pm$ 0.42
1	5.72 $\pm$ 0.31	5.82 $\pm$ 0.19	7.2 $\pm$ 0.19	8.24 $\pm$ 0.04
2	5.38 $\pm$ 0.21	5.4 $\pm$ 0.23	5.63 $\pm$ 0.06	8.22 $\pm$ 0.12

4.11. Patogen Bakterilerin *G. mellonella* Larvaları için Öldürücü Enfeksiyon Dozlarının Belirlenmesi

Galleria mellonella larvaları için her bir patojen bakteri suşunun (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) öldürücü enfektif dozları belirlendi. Ölüm oranları 96 saatlik gözlem süresi sonunda değerlendirildi. 10^6 ve 10^7 CFU dozları çoğu bakteri için 72. saatten itibaren %100 ölüm gerçekleşti. 10^5 CFU dozunda ölüm genellikle daha yavaş ilerledi ve *S. aureus* ve *E. faecalis* için 96. Saat sonunda %60 ölüm ile sonuçlandı (Tablo 12).

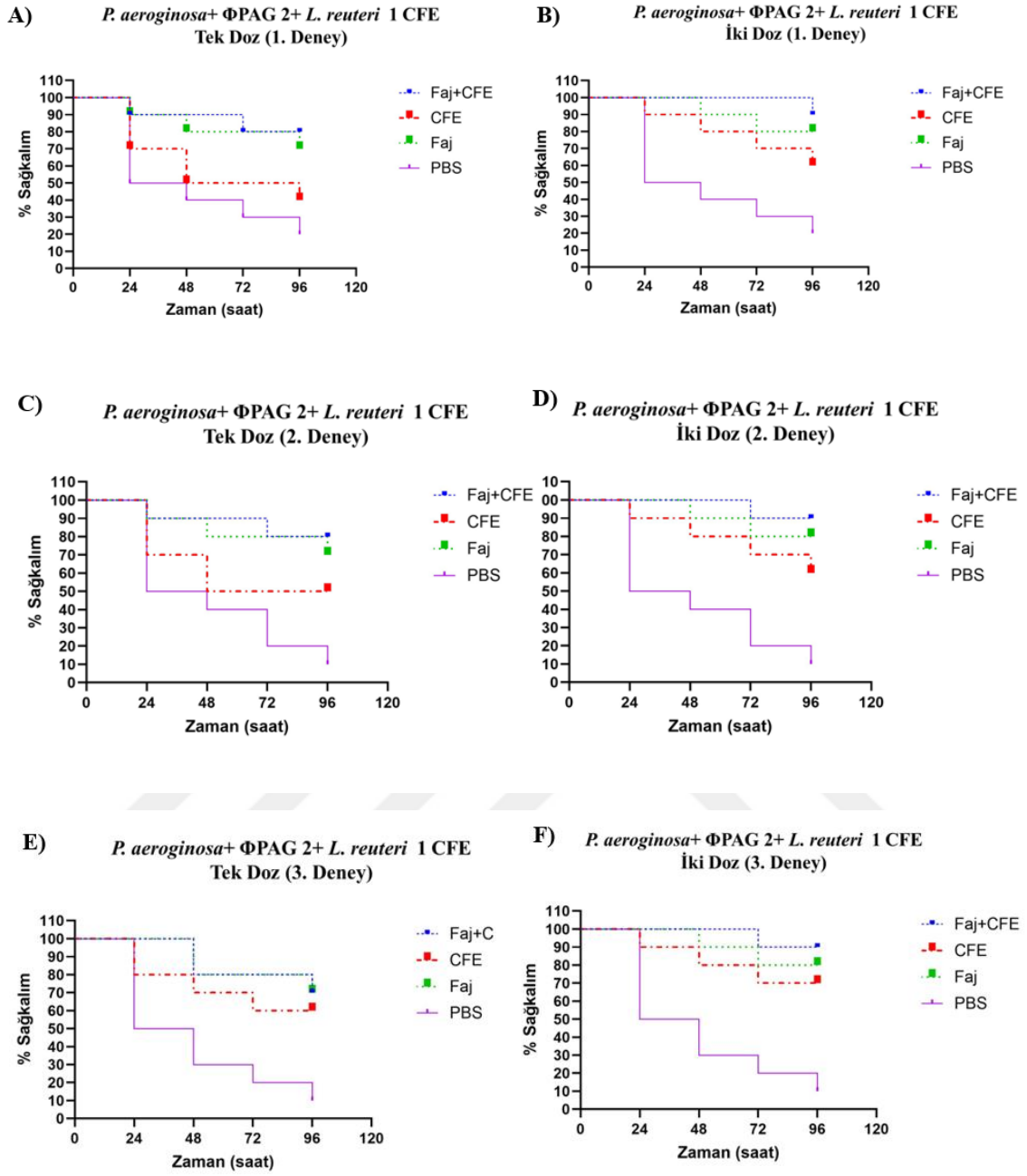
Tablo 12. *Galleria mellonella* larvaları için patojen bakteri suşları ile öldürücü enfektif dozların belirlenmesi

Patojen Bakteri	Uygulanan Doz (CFU/10 µL)	Gözlem süresi ve larva ölüm oranı (Saat/%)			
		24	48	72	96
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	10 ⁵	20	20	60	80
	10 ⁶	50	50	60	100
	10 ⁷	70	80	100	100
<i>E. coli</i> ATCC 35218	10 ⁵	10	30	40	60
	10 ⁶	40	50	70	100
	10 ⁷	60	80	100	100
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	10 ⁵	10	30	60	60
	10 ⁶	60	60	70	80
	10 ⁷	70	80	90	100
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ⁵	20	20	30	40
	10 ⁶	40	60	60	100
	10 ⁷	60	70	90	100

4.12. *Galleria mellonella* Yanık Yara Enfeksiyon Modelinin Oluşturulması, Faj ve LAB Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Uygulanması

Galleria mellonella larvalarında yanık ve enfeksiyon modeli oluşturuldu, faj ve LAB hücresiz kültür sıvılarının kombine tedavi etkinliği tek doz ve takip eden 6 saat sonra ikinci tedavi dozu uygulaması şeklinde test edildi.

Pseudomonas aeruginosa PAO1 ile oluşturulan *Galleria mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj PAG 2 ve *L. reuteri* 1 hücresiz kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği, tek ve iki doz uygulamaları şeklinde 96 saat boyunca değerlendirildi (Şekil 13, Tablo 13).

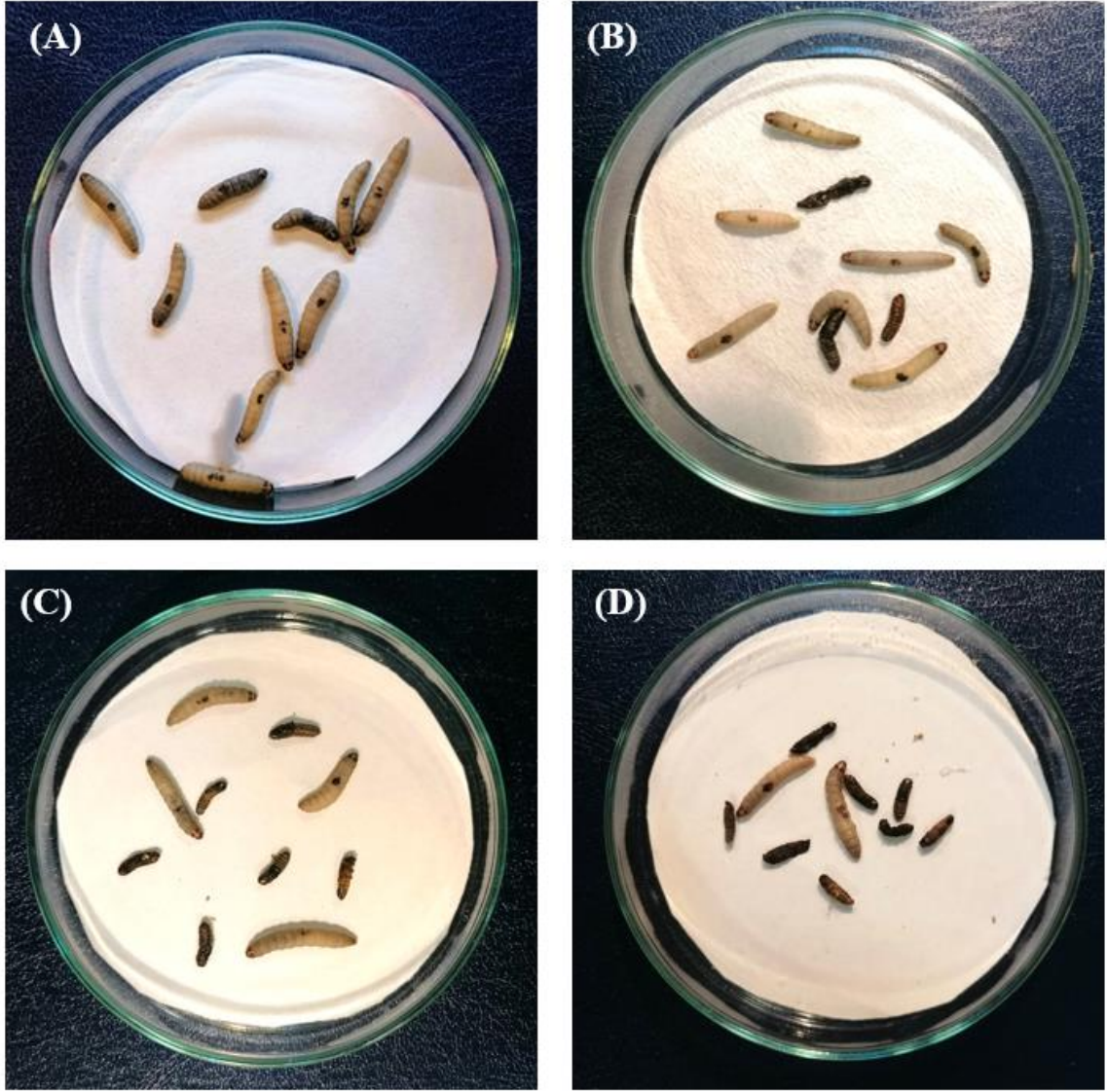


Şekil 13. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj PAG 2 ve *L. reuteri* 1 CFE kombine tedavi etkinliğini gösteren sağkalım grafikleri. A, C, E; tek doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney, B, D, F; iki doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney. Sağkalım oranları GraphPad Prism (v10.5.0, Dotmatics) ile gösterilmiştir.

Üç bağımsız deneyde hem tek doz hem de iki doz uygulamalarında Faj+CFE kombine tedavisi, tek başına uygulanan faj veya CFE gruplarına kıyasla sağkalım oranlarını belirgin şekilde artırdı. İlk deneyde (Şekil 13A, B) kombine tedavi grubu tek doz uygulamasında, 96. saat sonunda sağkalım oranları sırasıyla birinci deneyde %80, ikinci deneyde %80 ve üçüncü deneyde %70 olarak gözlemlendi. Aynı kombinasyonun iki doz uygulamasında ise sağkalım oranları tüm deneylerde %90 olarak korundu. Sadece faj uygulanan grupta, tek dozda sağkalım birinci, ikinci ve üçüncü deneylerde %70 olarak ölçülürken, ikidozda ise her üç deneyde de %80 sağkalım elde edildi. CFE'nin tek başına uygulandığı gruplarda, 96. saat sağkalımları tek dozda sırasıyla %40, %50 ve %60; iki dozda ise %60, %60 ve %70 olarak kaydedildi. Kontrol grubunda ise sağkalım, tüm deneylerde 96. saat sonunda %10-20 sağkalım gözlemlendi.

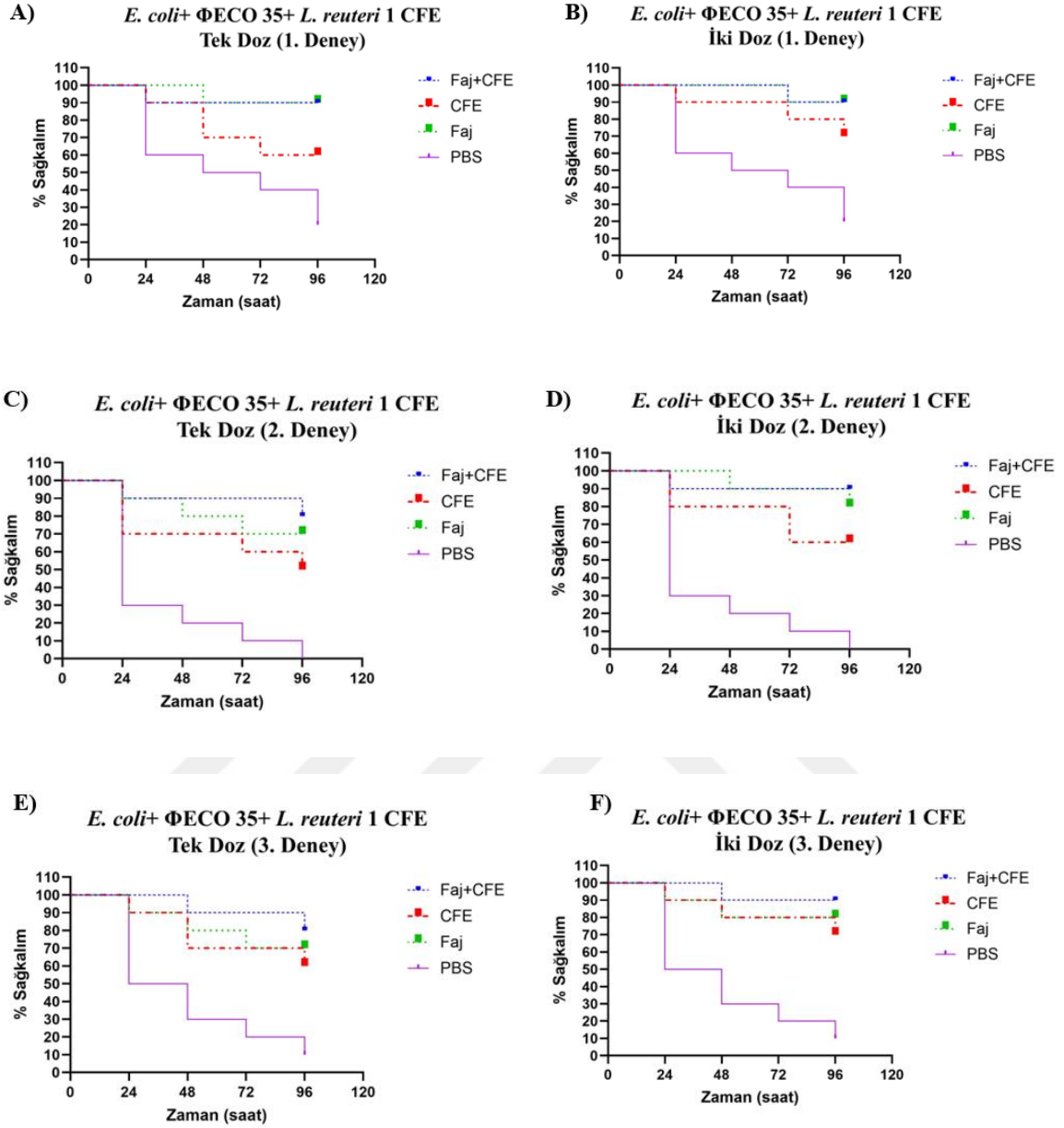
Tablo 13. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları (%). (96. Saat Ortalama $\pm$ SD alınmıştır).

Deney Grubu	Doz	Zaman (saat)	1. Deney	2. Deney	3. Deney	Ortalama $\pm$ SD
<i>P. aeruginosa</i> + Faj + CFE	Tek	24	90	90	100	76.6 $\pm$ 5.7
		48	90	90	80	
		72	80	80	80	
		96	80	80	70	
	İki	24	100	100	100	90.0 $\pm$ 0.0
		48	100	100	100	
		72	100	90	90	
		96	90	90	90	
<i>P. aeruginosa</i> + Faj	Tek	24	90	90	100	70.0 $\pm$ 0.0
		48	80	80	80	
		72	80	80	80	
		96	70	70	70	
	İki	24	100	100	100	80.0 $\pm$ 0.0
		48	90	90	90	
		72	80	80	80	
		96	80	80	80	
<i>P. aeruginosa</i> + CFE	Tek	24	70	70	80	50.0 $\pm$ 10.0
		48	50	50	70	
		72	50	50	60	
		96	40	50	60	
	İki	24	90	90	90	63.3 $\pm$ 5.7
		48	80	80	80	
		72	70	70	70	
		96	60	60	70	
Kontrol (<i>P. aeruginosa</i> + PBS)	Tek	24	50	50	50	13.3 $\pm$ 5.7
		48	40	40	30	
		72	30	20	20	
		96	20	10	10	



Şekil 14. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları. Kombine tedavi grubunda (A) %80 sağkalım oranı gözlenirken, yalnızca faj (B) ve yalnızca CFE uygulanan gruplarda (C) sağkalım oranları sırasıyla %70 ve %40 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda (D) ise %20 sağkalım oranı gözlenmiştir.

Escherichia coli ATCC 35218 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj ECO 35 ve *L. reuteri* 1 hücresiz kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği, tek ve iki doz uygulamaları şeklinde 96 saat boyunca değerlendirildi (Şekil 15, Tablo 14).

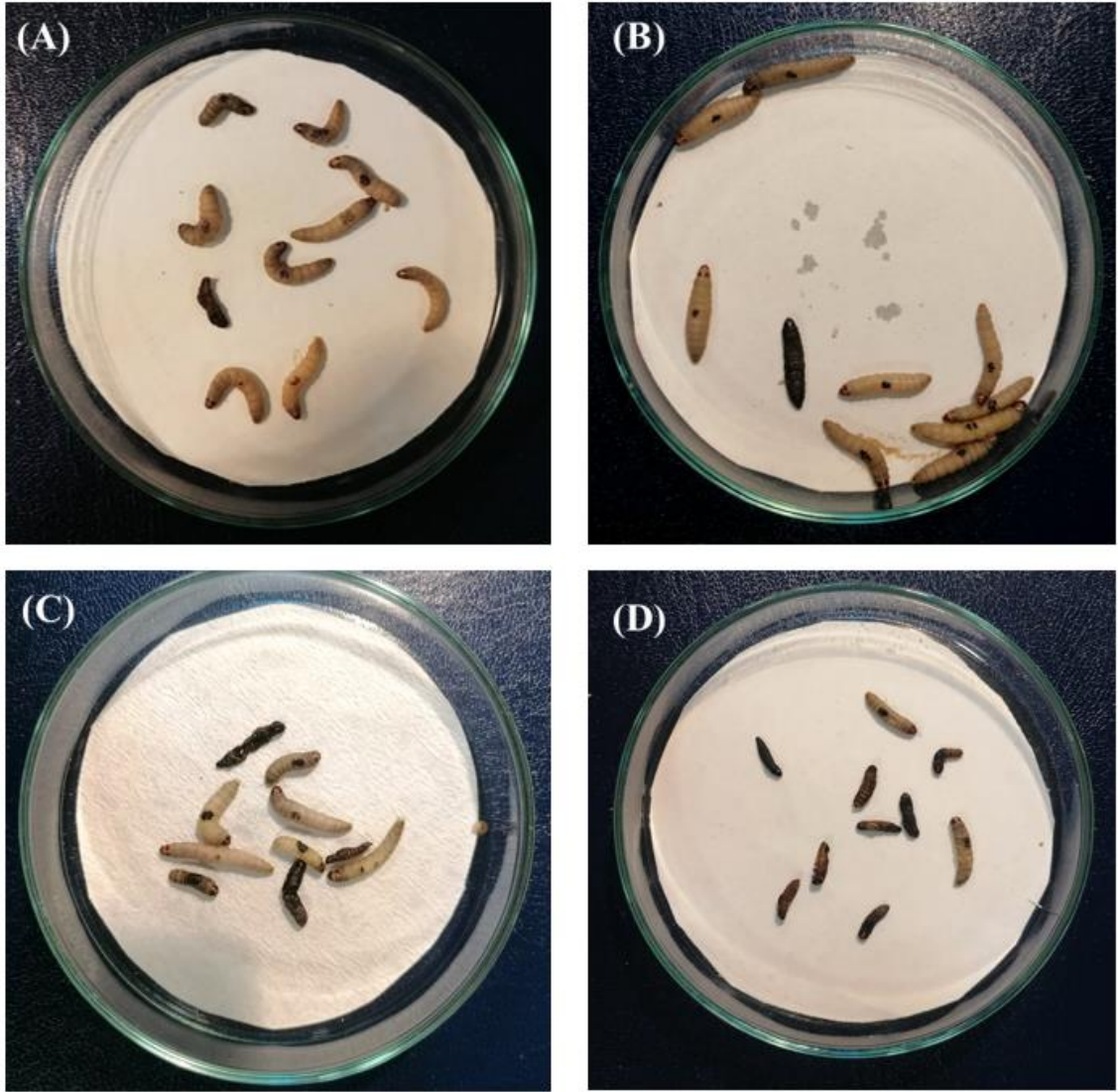


Şekil 15. *Escherichia coli* ATCC 35218 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj ECO 35 ve *L. reuteri* 1 CFE kombine tedavi etkinliği. A, C, E; tek doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney, B, D, F; iki doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney. Sağkalım oranları GraphPad Prism (v10.5.0, Dotmatics) ile gösterilmiştir.

Üç bağımsız deneyde hem tek doz hem de iki doz uygulamalarında Faj+CFE kombine tedavisi, tek başına faj veya CFE gruplarına göre larvalarda sağkalımı artırdı. Faj+CFE kombinasyonunun tek doz uygulamasında, 96. saat sonunda sağkalım oranları birinci deneyde %90, ikinci deneyde %80 ve üçüncü deneyde %80 olarak gözlemlendi. İki doz uygulamasında ise sağkalım oranları tüm deneylerde %90 olarak korundu. Sadece faj uygulanan grupta, 96. saat sağkalımı tek dozda %90, %70 ve %70; iki dozda ise %90, %80 ve %80 olarak kaydedildi. CFE'nin tek başına uygulandığı gruplarda sağkalım oranları, tek doz uygulamasında 96. saatte %60, %50 ve %60; iki dozda ise %70, %60 ve %70 olarak ölçüldü. Kontrol grubunda ise sağkalım 96. saatte %10-20 oranda kaldı.

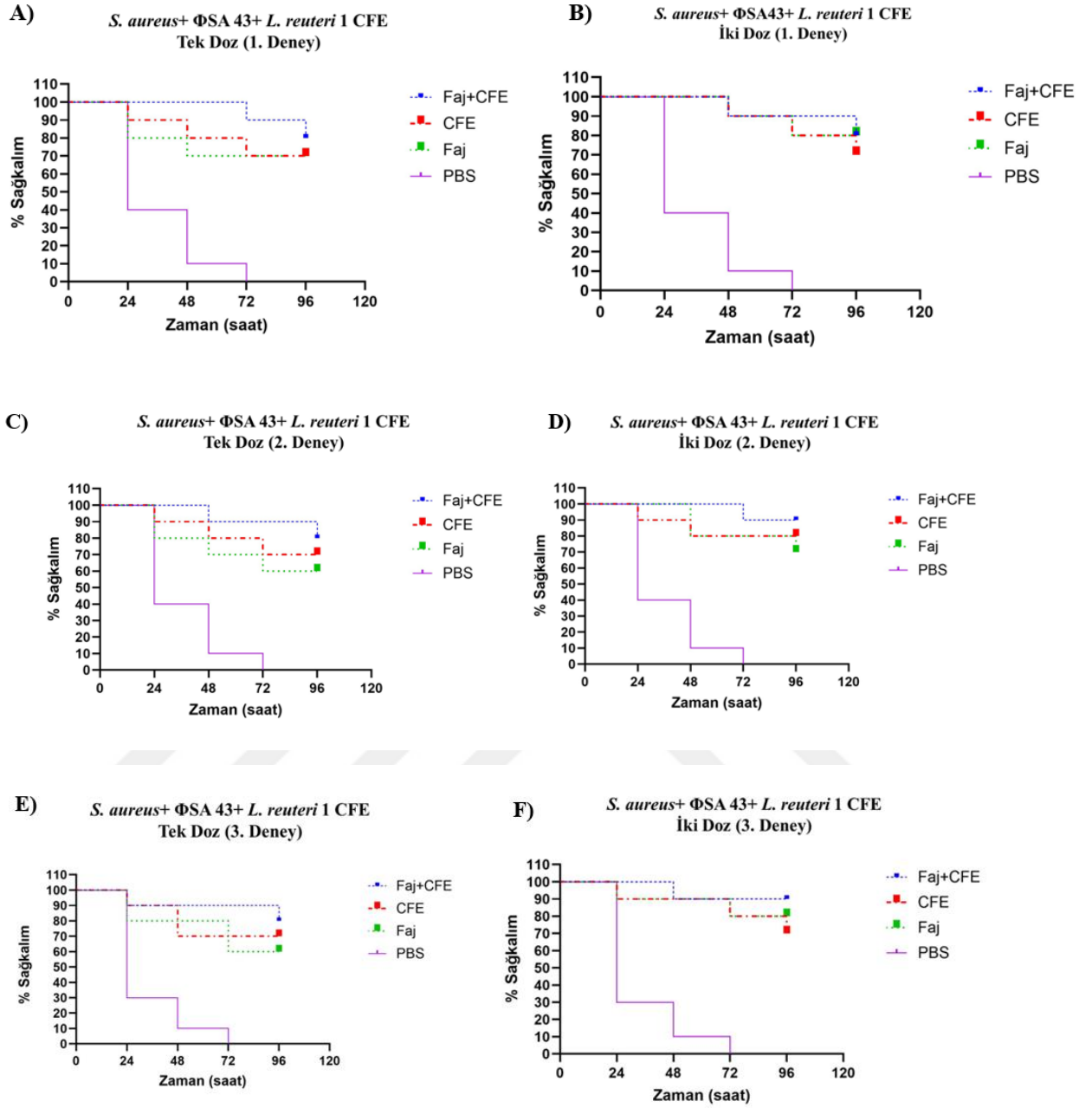
Tablo 14. *Escherichia coli* ATCC 35218 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları (%). (96. saat Ortalama $\pm$ SD alınmıştır).

Deney Grubu	Doz	Zaman (saat)	1. Deney	2. Deney	3. Deney	Ortalama $\pm$ SD
<i>E. coli</i> + Faj + CFE	Tek	24	90	90	100	83.3 $\pm$ 5.7
		48	90	90	90	
		72	90	90	90	
		96	90	80	80	
	İki	24	100	90	100	90.0 $\pm$ 0.0
		48	100	90	90	
		72	90	90	90	
		96	90	90	90	
<i>E. coli</i> + Faj	Tek	24	100	90	90	76.0 $\pm$ 11.54
		48	90	80	80	
		72	90	70	70	
		96	90	70	70	
	İki	24	100	100	90	83.3 $\pm$ 5.7
		48	100	90	80	
		72	90	90	80	
		96	90	80	80	
<i>E. coli</i> + CFE	Tek	24	90	70	90	56.6 $\pm$ 5.7
		48	70	70	70	
		72	60	60	70	
		96	60	50	60	
	İki	24	90	80	90	66.6 $\pm$ 5.7
		48	90	80	80	
		72	80	60	80	
		96	70	60	70	
Kontrol (<i>E. coli</i> + PBS)	Tek	24	60	30	50	10.0 $\pm$ 10.0
		48	50	20	30	
		72	40	10	20	
		96	20	0	10	



Şekil 16. *Escherichia coli* ATCC 35218 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları. Kombine tedavi grubunda (A) %90 sağkalım oranı, yalnızca faj (B) ve yalnızca CFE uygulanan gruplarda (C) sağkalım oranları sırasıyla %90 ve %60 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda (D) ise %20 sağkalım oranı gözlemlendi.

Staphylococcus aureus ATCC 43300 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj SA 43 ve *L. reuteri* 1 kültür süpernatantının tek ve iki doz uygulamalarındaki tedavi etkinliği 96 saat boyunca incelendi (Şekil 17, Tablo 15).



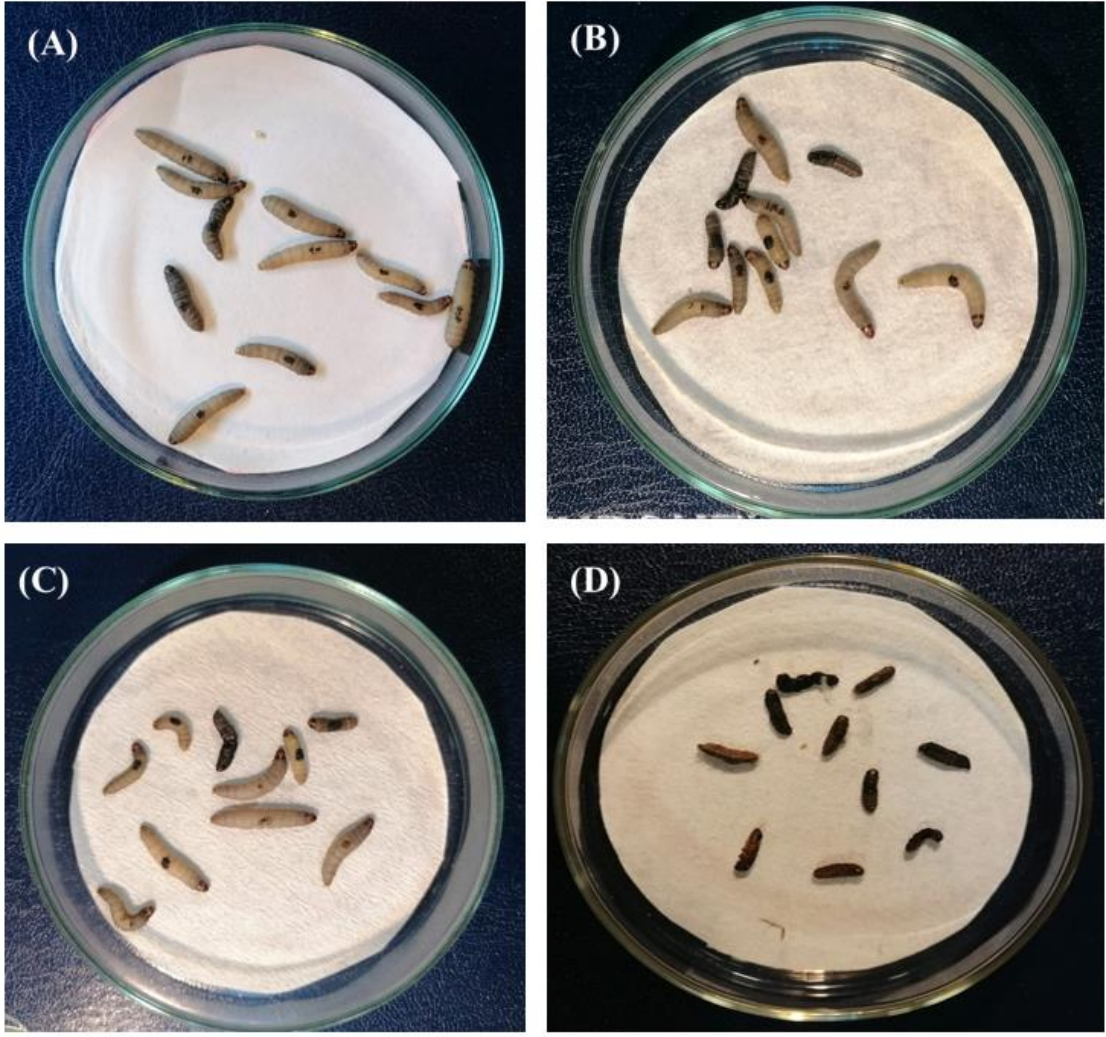
Şekil 17. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj SA 43 ve *L. reuteri* 1 hüresiz kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği. A, C, E; tek doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney, B, D, F; iki doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney. Sağkalım oranları GraphPad Prism (v10.5.0, Dotmatics) ile gösterilmiştir.

Üç bağımsız deneyde hem tek doz hem de iki doz uygulamalarında Faj+CFE kombine tedavisi, tek başına uygulanan faj veya CFE gruplarına kıyasla larvalarda sağkalımı belirgin şekilde artırdı. Faj+CFE kombinasyonunun tek doz uygulamasında 96. saatte sağkalım birinci, ikinci ve üçüncü deneyde de %80 olarak gözlemlendi; iki doz uygulamasında ise sağkalım oranları sırasıyla %80, %90 ve %90 olarak kaydedildi. Sadece faj uygulanan grupta 96. saat sağkalımı tek dozda %70, %60 ve %60; iki dozda ise %80, %70 ve %80 olarak gözlemlendi. CFE uygulanan gruplarda, tek dozda sağkalım %70 olarak sabit kaldı; iki dozda ise %70, %80 ve %70 oldu. Kontrol grubunda ise sağkalım 96. saatte tüm deneylerde sağkalım %0 olarak kaydedildi.



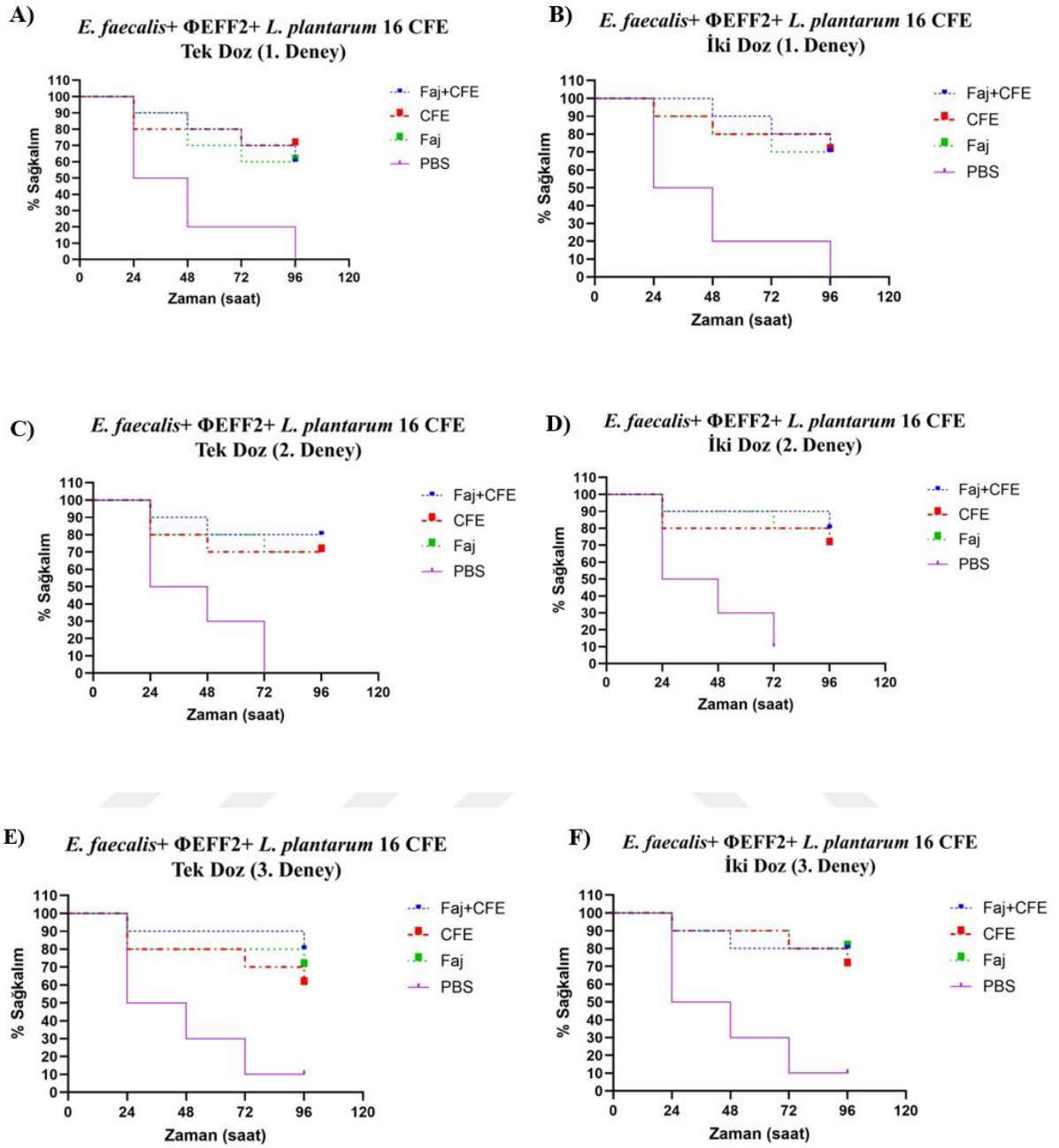
Tablo 15. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları (%). (96. Saat Ortalama $\pm$ SD alınmıştır).

Deney grubu	Doz	Zaman (Saat)	1. Deney	2. Deney	3. Deney	Ortalama $\pm$ SD
<i>S. aureus</i> + Faj + CFE	Tek	24	100	100	90	80.0 $\pm$ 0.0
		48	100	90	90	
		72	90	90	90	
		96	80	80	80	
	İki	24	100	100	100	86.6 $\pm$ 5.7
		48	90	100	90	
		72	90	90	90	
		96	80	90	90	
<i>S. aureus</i> + Faj	Tek	24	80	80	80	63.3 $\pm$ 5.7
		48	70	70	80	
		72	70	60	60	
		96	70	60	60	
	İki	24	100	100	90	76.6 $\pm$ 5.7
		48	90	80	90	
		72	80	80	80	
		96	80	70	80	
<i>S. aureus</i> + CFE	Tek	24	90	90	90	70.0 $\pm$ 0.0
		48	80	80	70	
		72	70	70	70	
		96	70	70	70	
	İki	24	100	90	90	76.6 $\pm$ 5.7
		48	90	80	90	
		72	80	80	80	
		96	70	80	70	
Kontrol (<i>S. aureus</i> + PBS)	Tek	24	40	40	30	0
		48	10	10	10	
		72	0	0	0	
		96	0	0	0	



Şekil 18. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları. Kombine tedavi grubunda (A) %80 sağkalım oranı, yalnızca faj (B) ve CFE uygulanan gruplarda (C) sağkalım oranları sırasıyla %70 ve %70 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda (D) ise sağkalım gözlemlenmedi.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj EFE 2 ve *L. plantarum* 16 CFE hücresiz kültür süpernatantının tek ve iki doz uygulamalardaki tedavi etkinliği 96 saat boyunca incelendi (Şekil 19, Tablo 16).



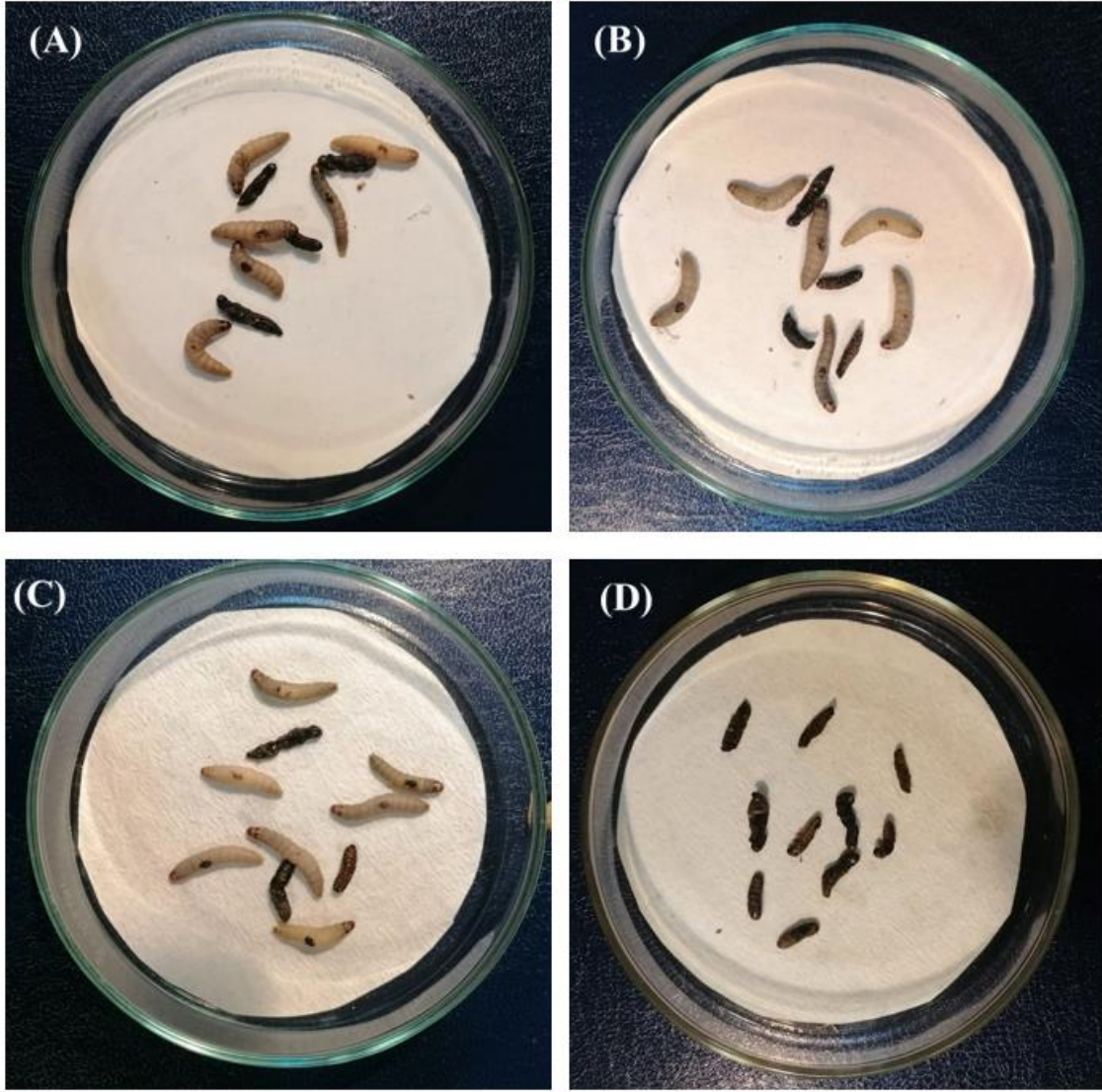
Şekil 19. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile oluşturulan *G. mellonella* yanık yara enfeksiyon modelinde faj EFE 2 ve *L. plantarum* 16 hücreli kültür süpernatantının kombine tedavi etkinliği. A, C, E; tek doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney, B, D, F; iki doz tedavi uygulanan 3 bağımsız deney. Sağkalım oranları GraphPad Prism (v10.5.0, Dotmatics) ile gösterilmiştir.

Üç bağımsız deneyde hem tek doz hem de iki doz uygulamalarında Faj+CFE kombine tedavisi, yalnızca faj veya yalnızca CFE uygulamalarına kıyasla larvaların sağkalım oranlarını artırdı. Faj+CFE kombinasyonunun tek doz uygulamasında 3 deney sonucunda 96. saatte sağkalım %60-80 arasında değişirken, iki doz uygulamasında %70-80 oranında korundu. Sadece faj uygulanan grupta sağkalım tek dozda %60-70, iki dozda %70-80 arasında gözlemlendi. CFE grubunda ise sağkalım tek dozda birinci ve ikinci deneyde %70, üçüncü deneyde %60; iki dozda %70 oranında sağkalım gösterdi. Kontrol grubunda ise sağkalım 96. saatte %0-10 arasında düşük seviyelerde kaldı.



Tablo 16. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında farklı tedavi gruplarında tek ve iki doz tedavi uygulamalarının zamana bağlı sağkalım oranları (%). (96. saat Ortalama $\pm$ SD alınmıştır).

Deney Grubu	Doz	Zaman (saat)	1. Deney	2. Deney	3. Deney	Ortalama $\pm$ SD
<i>E. faecalis</i> + Faj + CFE	Tek	24	90	90	90	73.3 $\pm$ 11.5
		48	80	80	90	
		72	70	80	90	
		96	60	80	80	
	İki	24	100	90	90	76.6 $\pm$ 5.7
		48	90	90	80	
		72	80	90	80	
		96	70	80	80	
<i>E. faecalis</i> + Faj	Tek	24	90	80	80	66.6 $\pm$ 5.7
		48	70	80	80	
		72	60	70	80	
		96	60	70	70	
	İki	24	90	90	90	73.3 $\pm$ 5.7
		48	80	90	90	
		72	70	80	80	
		96	70	70	80	
<i>E. faecalis</i> + CFE	Tek	24	80	80	80	66.6 $\pm$ 5.7
		48	80	70	80	
		72	70	70	70	
		96	70	70	60	
	İki	24	90	80	90	70.0 $\pm$ 0.0
		48	80	80	90	
		72	80	80	80	
		96	70	70	70	
Kontrol (<i>E. faecalis</i> + PBS)	Tek	24	50	50	50	3.33 $\pm$ 5.7
		48	20	30	30	
		72	20	0	10	
		96	0	0	10	



Şekil 20. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile enfekte edilen *G. mellonella* larvalarında tedavi gruplarının 96. saat sonuçları. Kombine tedavi grubunda (A) %60 sağkalım oranı, yalnızca faj (B) ve CFE uygulanan gruplarda (C) sağkalım oranları sırasıyla %60 ve %70 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda (D) ise sağkalım gözlemlenmedi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yanık yaralanmaları, küresel ölçekte önemli bir halk sağlığı sorunudur ve bu tür yaralanmalar sonucu gelişen enfeksiyonla, artan antimikrobiyal direnç sebebi ile en sık karşılaşılan ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Antimikrobiyal direnç dünya genelinde halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorun haline gelmiştir (30). Geleneksel antibiyotiklerin azalan etkinliği, alternatif tedavi stratejilerine olan ihtiyacı artırmıştır. Fajlar, spesifik bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bu özellikleri sayesinde, özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı etkili ajanlardır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada faj terapisinin çoklu ilaç dirençli enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğunu göstermektedir (121). Laktik asit bakterilerinden üretilen AMP'ler, geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olup, patojenik bakterilere karşı etkileri büyüktür. Fajların ve Laktik asit bakteri hücresiz süpernatantları yanık yara enfeksiyonu tedavisinde ayrı ayrı kullanımlarına yönelik çalışmalar mevcuttur. Ancak fajların ve laktik asit bakteri hücresiz süpernatantların kombine kullanımına yönelik çalışmalar literatürde mevcut değildir.

Bu çalışmada, yanık yara enfeksiyonlarında yaygın olarak karşılaşılan patojen mikroorganizmalar (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*) ile *Galleria mellonella* larvalarında yanık yara enfeksiyonu oluşturuldu. Bu oluşturulan enfeksiyon modelinde, laktik asit bakterilerinin hücre içermeyen kültür sıvıları ile patojenlere karşı etkili litik fajların kombinasyon halinde ve tek/iki doz uygulanmalarının tedavi açısından etkisi araştırıldı.

Bu tez kapsamında tedavide kullanılacak olan fajlar (ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2), laboratuvar koleksiyonundaki fajlar zenginleştirilmesiyle elde edilmiştir. Ardından, fajların klinik izolatlar kullanılarak konak aralıkları belirlenmiş ve geniş konak aralığına sahip olan fajlar ile deneylere devam edilmiştir. Literatürde, geniş konak aralığına sahip fajların, özellikle çoklu antibiyotik direncine sahip bakterilere karşı etkili olduğu belirtilmektedir ve faj terapisinde önemli bir avantaj sunmaktadır. Bu tür fajlar, farklı bakteri türlerini hedef alarak tedavi etkinliğini artırabilir ve bakteriyel direnç gelişimini azaltabilir. Ayrıca, geniş konak aralığı, fajların farklı klinik izolatlara karşı etkinliğini artırarak tedavi başarısını olumlu yönde etkileyebilir. Bu konuda Ross ve ark. (122), birden fazla konak bakteri suşu kullanarak izole edilen fajların, tek bir konak suşu kullanılarak izole edilenlere kıyasla daha geniş konak aralığına sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajlarının farklı pH ve sıcaklık stabilitelerine bakılmıştır. Bu fajların farklı pH değerlerindeki stabiliteleri bakıldığında, pH 7–8 aralığında yüksek stabilite gösterdiği ve pH 4 (aşırı asidik) ve altı ile pH 10 (aşırı bazik) üzeri değerlerde aktivitesinde kaybı yaşadığı gözlemlendi. Bu bulgular, literatürdeki verilerle uyumludur. Pradeep ve ark. (123) yaptığı bir çalışmada, bir fajın pH 7 ve 8'de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde aktivite gösterdiğini, ancak pH 6'da fajın aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Fajların farklı sıcaklıklardaki stabilite değerleri ise, 4-50°C aralığında yaklaşık olarak stabil kaldığı, 40-55°C aralığında fajların aktivitesinin azaltığı ve bazı fajlarda (ΦECO 35, ΦEFE 2 ve ΦSA 43) 60°C üzerindeki sıcaklıklarda aktivite göstermediği belirlendi. Bu sonuçlar da literatürdeki verilerle paralellik göstermektedir. Sae-Ueng ve ark. (124) yaptığı bir çalışmada, RSJ2 diye adlandırılan bu fajın 24-40°C aralığında yapısal ve fonksiyonel olarak stabil olduğu, ancak 40°C'de 5 saatlik inkübasyon sonrasında faj titerinde %68 azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmada, Bagińska ve ark. (125), Abp9 diye adlandırılan fajın 20-50°C aralığında stabil olduğu, ancak 60°C'de 15 dakikalık inkübasyon sonrasında titrerinde azalma yaşandığı bildirilmiştir. Fajların optimum sıcaklık ve pH koşullarında aktivitelerinin kayıp olması, formülasyon ve saklama koşulları konusunda iyi optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, fajların terapötik olarak uygulanmalarında bu parametrelerin detaylı bir şekilde değerlendirilmesi ve uygun formülasyon stratejilerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajlarının enfeksiyon etkinliğini değerlendirmek amacıyla 0.01, 0.1, 1 ve 10 MOI (enfeksiyon çokluğu) değerlerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, MOI değeri arttıkça faj titrelerinin de artış gösterdiğini ve yüksek MOI (MOI 10) değerlerinde fajların daha etkili çoğaldığını ve litik aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ortaya koymuştur. Ancak, tüm MOI verileri birlikte değerlendirildiğinde fajların genel etkinlik düzeylerinin birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Bu durum, çalışmada kullanılan fajların klinik uygulamalarda esnek dozaj imkânı sunabileceğini ve farklı enfeksiyon yüklerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde ise, farklı fajların optimal MOI değerlerinin değişkenlik gösterdiği bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Chen ve ark. (126), ΦK2044 fajı için optimal MOI değeri 0.001 olarak belirlenmiş, başka izole edilen faj olan ΦKR1 ve ΦKR8 fajları için optimal MOI değeri 1 olarak saptanmıştır. Ayrıca, bir başka çalışmada, Lertsittikul ve ark. (127), *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan VL1

fajının, faj tedavisi için farklı MOI (0.1, 1 ve 10) uygulandığında bakteri büyümesinde anlamlı bir fark bulunmamış ve geniş MOI enfeksiyonu aralığına sahip fajlar olduğunu bildirmişlerdir. Bu tür analizler, fajların optimal enfeksiyon koşullarını belirlemek ve terapötik potansiyellerini değerlendirmek için önemlidir.

Bu çalışmada kullanılan ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajlarının tek aşamalı büyüme eğrileri incelenerek latent dönemleri ve patlama büyüklükleri belirlendi. Latent dönem, bir fajın konak hücreye adsorpsiyonundan itibaren yeni faj partiküllerinin salınmasına kadar geçen süredir. ΦECO 35, ΦEFE 2, ΦSA 43 ve ΦPAG 2 fajlarının latent dönemleri yaklaşık 25-30 dakikadır. Patlama büyüklüğü ise, enfekte bir hücreden salınan yeni faj partiküllerinin sayısını ifade eder. Bu fajların patlama büyüklükleri yaklaşık 100-208 faj/hücre'dir. Literatürde bildirilen değerlerle karşılaştırıldığında, bu fajların hızlı replikasyon yeteneklerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellikler, fajların bakteriyel enfeksiyonlarda etkili ajanlar olabileceğini düşündürmektedir.

Laktik asit bakterileri CFE hakkında son yıllarda, özellikle yanıklarda yaygın olarak görülen patojenlere karşı umut verici tedavi seçenekleri arasında yer aldığı görülmektedir. Bu çalışmada 15 farklı LAB hücresiz kültür sıvısının (CFE) antibakteriyel etkinliğit test edildi ve etkili olan *L. reuteri* ve *L. plantarum* ile deneylere devam edildi. *L. reuteri* ve *L. plantarum* suşlarının *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 43300 ve *E. faecalis* ATCC 29212 karşı etkinliği *in vitro* çalışmalarda belirlendi. *L. reuteri* 1 CFE'nin *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 43300'e, *L. plantarum* 16 CFE'nin *E. faecalis* ATCC 29212 karşı etkili olduğu ve bakteriyel yükü düşürdüğü gözlemlendi. Literatürde, yapılan bir çalışmada, Abootaleb ve ark. (128), *L. plantarum* CFE'nin, özellikle çoklu ilaç dirençli (MDR) *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu ve ikinci derece yanık yaralarında inflamasyonu azaltarak yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir.

CFE'ların antibakteriyel etkinliği, içerdiği organik asitler, bakteriyosinler ve diğer antimikrobiyal bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler, patojenlerin hücre duvarlarını ve membranlarını hedef alarak bakterisidal etki göstermektedir. Bu çalışmada hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde CFE'ların gram pozitif (*S. aureus* ATCC 43300 ve *E. faecalis* ATCC 29212) bakterilere karşı daha etkili olduğu gözlemlendi. Bu durum, gram-pozitif bakterilerin kalın bir peptidoglikan tabakasına sahip olması, gram-negatif bakterilerin

lipopolisakkaritlerden oluşan dış membranları nedeniyle antimikrobiyal bileşiklerin hücre içine girişini engellemesiyle açıklanmaktadır (129).

Bu çalışmada, yanık yara enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif yaklaşımlarından biri olarak LAB CFE+faj kombine ve sadece faj ve CFE olacak şekilde uygulamalarının potansiyelini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak değerlendirildi. *In vitro* deneylerde, tek başına faj uygulaması, tek başına LAB CFE uygulaması ve ikisinin kombinasyonunun patojenlere karşı etkinliğini analiz etmek amacıyla iki saatlik bir inkübasyon süresi boyunca bakteriyel yük değerlendirildi. *Escherichia coli* suşunda, iki saatlik inkübasyon sonunda kombine tedavi grubu (ΦECO 35 + CFE) bakteriyel yükü $6.8 \pm 0.8 \log_{10}$ CFU/mL düzeyine düşürürken, bu değer tek başına faj uygulamasında (ΦECO 35) $6.72 \pm 0.58 \log_{10}$ CFU/mL olarak yakın bir azalma göstermiştir. Her iki grup da tek başına CFE uygulamasına ve kontrol grubuna ($8.75 \pm 0.32 \log_{10}$ CFU/mL) göre belirgin bir azalma sağlamıştır. Bu durum, *E. coli* enfeksiyonlarında hem fajların hem de kombinasyon tedavisinin etkili olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, *P. aeruginosa* için, kombine tedavi grubu (ΦPAG 2 + CFE) bakteriyel yükü $4.39 \pm 0.39 \log_{10}$ CFU/mL düzeyine düşürerek kontrol grubuna göre ($9.2 \pm 0.38 \log_{10}$ CFU/mL) anlamlı bir azalma sağladı. *Staphylococcus aureus* suşunda ise, kombine tedavi grubu (ΦSA 43+CFE) bakteriyel yükü $3.26 \pm 0.15 \log_{10}$ CFU/mL düzeyine düşürerek kontrol grubuna ($8.32 \pm 0.12 \log_{10}$ CFU/mL) kıyasla belirgin bir düşüş gösterdi. *Enterococcus faecalis* suşunda da kombine tedavi grubu (ΦEFE 2+ CFE) bakteriyel yükü $5.38 \pm 0.21 \log_{10}$ CFU/mL seviyesine indirerek kontrol grubuna ($8.22 \pm 0.12 \log_{10}$ CFU/mL) göre anlamlı bir etki gösterdi.

In vivo deneylerde, *Galleria mellonella* yanık yara modelinde, faj ve CFE kombinasyonunun enfeksiyonlara karşı sağkalım üzerindeki etkisi *in vivo* olarak değerlendirildi ve deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirildi. *P. aeruginosa* enfeksiyonunda kombinasyon tedavisiyle sağkalım tek dozda %70–80, iki dozda %90; *E. coli* enfeksiyonunda ise tek dozda %80-90, iki dozda %90 sağkalım sağlandı. *S. aureus* enfeksiyonunda sağkalım tek dozda %80, iki dozda %80-90 arasında kalmış; *E. faecalis* enfeksiyonunda ise sağkalım tek dozda %60–80, iki dozda %70-80 arasında gözlemlendi. Kontrol gruplarında tüm patojenlerde 96. saatte sağkalım %0-20 arasında düşük seviyelerde kaldı. Bu sonuçlar, *in vitro* bulguları destekler nitelikte ve kombine tedavinin bakteriyel yükü azaltmada sadece faj ve CFE tedavilere göre daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Kombine tedavilerin önemi, tek başına faj uygulamalarında bakterilerin direnç geliştirme olasılığı ve biyofilm oluşturarak enfeksiyonun kronikleşme riskini artırmasıyla ilişkilidir. Bu bağlamda, faj ve LAB CFE gibi farklı etki mekanizmalarına sahip tedavi seçeneklerinin birlikte kullanılması, patojen yükünü daha etkili azaltabilir ve enfeksiyonun biyofilm tabakası gibi koruyucu bariyerlerini aşarak tedavinin etkinliğini artırabilir (130, 131).

Mevcut çalışmalar, bakteriyofajların ve antibiyotiklerin birlikte kullanımının, bakterileri etkili bir şekilde kontrol edip öldürebileceğini ve faj-antibiyotik sinerjisi (PAS) nedeniyle dirençli bakterilerin gelişimini ve yayılmasını azaltabileceğini göstermektedir. Luo ve ark. (48) tarafından yapılan bir çalışmada, çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarına karşı bakteriyofaj-antibiyotik kombinasyonunun etkinliğini araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, kombinasyon tedavisi, faj-antibiyotik kombinasyonlarının MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde umut verici bir strateji olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmada elde edilen bulgular, LAB CFE ve faj kombinasyonlarının yanık yara enfeksiyonlarında alternatif ve etkili bir tedavi stratejisi olabileceğini ortaya koymuştur.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma, yanık yara enfeksiyonlarının tedavisinde laktik asit bakterisi hücresiz kültür sıvıları (CFE) ve fajların kombine kullanımının potansiyelini ortaya koymuştur. Ancak, elde edilen bulguların daha geniş bir perspektifte değerlendirilebilmesi için bazı konuların ileri araştırmalarda ele alınması önem arz etmektedir.

Öncelikle, bu çalışmada kullanılan referans ve sınırlı sayıdaki klinik izolatların yanı sıra, daha geniş ve çeşitlendirilmiş bir klinik izolat paneli üzerinde benzer çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Ayrıca, faj ve CFE kombinasyonunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi detaylı bir şekilde incelenmeli, çünkü biyofilmler yanık yaralarda tedaviyi zorlaştıran önemli bir faktördür.

Tedavi etkinliğinin optimize edilebilmesi için farklı dozajlar, MOI değerleri, CFE konsantrasyonları ve uygulama sıklıklarının karşılaştırılacağı çalışmalar yapılması önerilmektedir. Elde edilen sinerjistik etkinliğin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, kombinasyon tedavisinin etki yollarını anlamak açısından büyük önem taşımaktadır.

Faj mühendisliği ve CRISPR teknolojisi kullanılarak fajların hedef bakterilere karşı özgüllüklerinin artırılması ve antibakteriyel proteinler ile zenginleştirilmiş rekombinant fajların geliştirilmesi önemli bir strateji olarak değerlendirilebilir.

Bunun yanı sıra, CFE ve fajların yanık dokusunda olası toksik etkilerinin ve konak bağışıklık yanıtları üzerindeki etkilerinin ileri in vivo çalışmalarla değerlendirilmesi gereklidir. Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* yanık modeli önemli bir ön model olsa da, sonuçların memeli modellerde (örneğin fare veya tavşan) doğrulanması, klinik uygulamalara yönelik daha güçlü kanıtlar sağlayacaktır.

Sonuçlarda gösterilen pH ve sıcaklık duyarlılıkları dikkate alınarak, daha stabil ve uygulamaya uygun formülasyonların (örneğin hidrojel, yara örtüsü) geliştirilmesi de önem arz etmektedir. Ayrıca, uzun dönemli uygulamalarda bakterilerin fajlara veya CFE'ye karşı direnç geliştirme potansiyelinin araştırılması da ileri çalışmalarda ele alınmalıdır.

Tüm bu ileri araştırmalar, yanık yara enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif ve etkili stratejiler geliştirilmesine, fajların endüstriyel ölçekte üretimi, stabilite testleri ve uygun farmasötik formülasyonlarının (ör. krem, hidrojel, sprey) geliştirilmesi ile klinik onay ve patent süreçlerinin planlanmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Rajha E, El Khuri C, Chebl RB, Mailhac A, Makki M, El Sayed M (2018). Epidemiology of burn patients presenting to a tertiary hospital emergency department in Lebanon. *Burns* 44(1): 218-225.
2. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC, Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society (2016). Infection in burns. *Surg Infect* 17(2): 250-255.
3. Escandón-Vargas K, Tangua AR, Medina P, Zorrilla-Vaca A, Briceño E, Clavijo-Martínez T, Tróchez JP (2020). Healthcare-associated infections in burn patients: timeline and risk factors. *Burns* 46(8): 1775-1786.
4. Alemzadeh E, Moshiri A (2017). Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *J Wound Care* 26(1): 5–19.
5. Li X, Wang X, Wang T, Yu H, Zhou Y, Wang H, Shi X (2021). Multimethod assessing the prognosis affecting factors of hospitalized children with burns in Zunyi, southwest China. *Wien Klin Wochenschr* 133(5-6): 194–201.
6. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA (2007). Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother* 51(6): 1934-1938.
7. Kumari S, Harjai K, Chhibber S (2009). Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Biotechnol* 19(6): 622-8.
8. Molendijk MM, Boekema BKHL, Lattwein KR, Vlig M, Bode LGM, Koopmans MPG, Verbon A, de Graaf M, van Wamel WJB (2024). Bacteriophage therapy reduces *Staphylococcus aureus* in a porcine and human *ex vivo* burn wound infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 4;68(9): e0065024.
9. Asadzadegan R, Haratian N, Sadeghi M, Maroufizadeh S, Mobayen M, Sedigh Ebrahim Saraei H, Hasannejad-Bibalan M (2023). Antibiofilm and antimicrobial activity of *Lactobacillus* cell free supernatant against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. *Int Wound J* 20(10): 4112-4121.
10. Brandi J, Cheri S, Manfredi M, Di Carlo C, Vita Vanella V, Federici F, Bombiero E, Bazaj A, Rizzi E, Manna L, Cornaglia G, Marini U, Valenti MT, Marengo E, Cecconi D

- (2020). Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. *Sci Rep* 14;10(1): 11572.
11. Soleymanzadeh Moghadam S, Momeni M, Mazar Atabaki S, Mousavi Shabestari T, Boustanshenas M, Afshar M, Roham M (2022). Topical Treatment of Second-Degree Burn Wounds with *Lactobacillus plantarum* Supernatant: Phase I Trial. *Iran J Pathol* Fall 17(4): 460-468.
 12. Maslova E, Osman S, McCarthy RR (2023). Using the *Galleria mellonella* burn wound and infection model to identify and characterize potential wound probiotics. *Microbiology (Reading, England)* 169(6): 001350.
 13. Peral MC, Huaman Martinez, MA, Valdez JC (2009). Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *Int Wound J* 6(1): 73-81.
 14. Stanbro J, Park JM, Bond M, Stockelman MG, Simons MP, Watters C (2020). Topical delivery of *lactobacillus* culture supernatant increases survival and wound resolution in traumatic *Acinetobacter baumannii* infections. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12: 809-818.
 15. Rose T, Verbeken G, Vos DD, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Lavigne R, Jennes S, Zizi M, Pirnay JP (2014). Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *Int J Burns Trauma* 4(2): 66–73.
 16. Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(3): 207-217.
 17. Jo H, Brito S, Kwak BM, Park S, Lee MG, Bin BH (2021). Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation. *Int J Mol Sci* 22(5): 2410.
 18. Prost-Squarcioni C, Fraitag S, Heller M, Boehm N (2008). Functional histology of dermis. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* Vol. 135, No. 1 Pt 2, pp. 1S5-20.
 19. Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S (2020). Burn injury. *Nat Rev Dis Primers* 6(1): 11.
 20. Abarca L, Guilabert P, Martin N, Usua G, Barret JP, Colomina MJ (2023). Epidemiology and mortality in patients hospitalized for burns in Catalonia, Spain. *Scientific reports* 13(1): 14364.
 21. Nuhiji E (2024). Trends and innovation in negative pressure wound therapy: a review of burn wound management. *Advances in Wound Care* 13(8): 391-399.
 22. Goh M, Du M, Peng WR, Saw PE, Chen Z (2024). Advancing burn wound treatment: exploring hydrogel as a transdermal drug delivery system. *Drug Delivery* 31(1): 2300945.

23. Bai Q, Zheng C, Chen W, Sun N, Gao Q, Liu J, Lu T (2022). Current challenges and future applications of antibacterial nanomaterials and chitosan hydrogel in burn wound healing. *Mater. Adv*3(17): 6707-6727.
24. Markiewicz-Gospodarek A, Koziół M, Tobiasz M, Baj J, Radzikowska-Büchner E, Przekora A (2022). Burn wound healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: the current state of knowledge for clinical practice. *Int J Environ Res Public Health*, 19(3): 1338.
25. Shariati A, Moradabadi A, Ghaznavi-Rad E, Dadmanesh M, Komijani M, Nojoomi F (2021). Investigation into antibacterial and wound healing properties of platelets lysate against *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* burn wound infections. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 20(1): 40.
26. Greenhalgh DG (2019). Sepsis in the burn patient: A different problem than sepsis in the general population. *Burns Trauma* 7, 23.
27. El Hamzaoui N, Barguigua A, Larouz S, Maouloua M (2020). Epidemiology of burn wound bacterial infections at a Meknes hospital, Morocco. *New Microbes New Infect* 38, 100764.
28. Van Duin D, Strassle PD, DiBiase LM, Lachiewicz AM, Rutala WA, Eitas T, Jones SW (2016). Timeline of health care–associated infections and pathogens after burn injuries. *Am J Infect Control* 44(12): 1511-1516.
29. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC (2016). Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society Infection in Burns. *Surg. Infect.* 17(2): 250-255.
30. Yang Y, Zeng Q, Hu G, Wang Z, Chen Z, Zhou L, Li G (2024). Distribution of Nosocomial Pathogens and Antimicrobial Resistance among Patients with Burn Injuries in China: A Comprehensive Research Synopsis and Meta-Analysis. *Infect Dis Ther* 13(6): 1291-1313.
31. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 39.
32. Rashid Mahmood A, and Mansour Hussein N (2022). Study of antibiotic resistant genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Burns and wounds. *Arch Razi Inst* 77(1): 403-411.

33. Campos-Silva R, Brust FR, Trentin DS, Macedo AJ (2019). Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microb Pathog* 137, 103756.
34. Kaufman AR, Cornelius AJ, Peterson RB (2020). Clinical applications of bacteriophage therapy in the treatment of chronic wound infections. *J Clin Microbiol* 58(1): e01357-19.
35. Loc-Carrillo C, Lavigne R, Peters D (2017). Phage therapy and the management of chronic *P. aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 30(2): 520-535.
36. Hong X, Zhou S, Dai X, Xie D, Cai Y, Zhao G, Li B (2023). Molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from burn wound infections in Fujian, China. *Front Microbiol* 14, 1236497.
37. Molendijk MM, Boekema BK, Lattwein KR, Vlig M, Bode LG, Koopmans MP, van Wamel WJ (2024). Bacteriophage therapy reduces *Staphylococcus aureus* in a porcine and human *ex vivo* burn wound infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 68(9): e00650-24.
38. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Le Floch R, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Bretaudeau L, Gabard J. Efficacy (2019). Tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*, 19(1): 35-45.
39. Pu M, Li Y, Han P, Lin W, Geng R, Qu F, Fan H (2022). Genomic characterization of a new phage BUCT541 against *Klebsiella pneumoniae* K1-ST23 and efficacy assessment in mouse and *Galleria mellonella* larvae. *Front Microbiol* 13, 950737.
40. Kumari S, Harjai K, Chhibber S (2011). Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *J. Med. Microbiol.*, 60(2): 205-210.
41. Chetri S (2025). *Escherichia coli*: An arduous voyage from commensal to Antibiotic-resistance. *Microb Pathog*, 198: 107173.
42. Huang, Xiangjun Meng, Gang Chen. Characterization of an *Escherichia coli* phage Tequatrovirus YZ2 and its application in bacterial wound infection, *Virology*, Volume 597,2024, 110155, ISSN 0042-6822.

43. Dahal, K (2024). Pattern of antibiotic resistance in surgical site infections in a tertiary care hospital of Nepal. *Int J Surg: Global Health*, 7(2):0403
44. Worku S, Abebe T, Alemu A (2023). Bacterial profile of surgical site infection and antimicrobial resistance patterns in Ethiopia: a multicentre prospective cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 22, 96
45. Gaborieau B, Vaysset H, Tesson F (2024). Prediction of strain level phage–host interactions across the *Escherichia* genus using only genomic information. *Nat Microbiol*, 9, 2847–2861
46. Gordon RJ, Lowy FD (2020). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 51(Suppl_2), S177–S182.
47. Bilgin M, Çiftçi AB, Bilgin M (2023). Yanık Merkezindeki Hastaların Yara Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Black Sea J Health Sci*, 6(1): 147-151.
48. Luo J, Xie L, Liu M, Li Q, Wang P, and Luo C (2022). Bactericidal synergism between phage YC# 06 and antibiotics: a combination strategy to target multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiology Spectrum*, 10(4): e00096-22.
49. Markiewicz-Gospodarek A, Koziół M, Tobiasz M, Baj J, Radzikowska-Büchner E, Przekora A (2022). Burn wound healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: the current state of knowledge for clinical practice. *Int J Environ Res Public Health*, 19(3): 1338.
50. Chabi R, and Momtaz H (2019). Virulence factors and antibiotic resistance properties of the *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. *Trop Med Health*, 47, 1-9.
51. Valente LG, Pitton M, Fürholz M, Oberhaensli S, Bruggmann R, Leib SL, Jakob SM, Resch G, Que YA, Cameron DR (2021). Isolation and characterization of bacteriophages from the human skin microbiome that infect *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbes*, 30;2: xtab003.
52. Esmail MAM, Abdulghany HM, Khairy RM (2019). Prevalence of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in hospital-acquired surgical wound infections and bacteremia: concomitant analysis of antimicrobial resistance genes. *Infect Dis*, 12, 1178633719882929.

53. Heidari H, Emameini M, Dabiri H, Jabalameli F (2016). Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of *Enterococcal* strains isolated from burn patients. *Microb Pathog*, 90, 93-97.
54. Ali Z, Abdelkader K, Abdel-Fattah MM, Azmy AF, El-Gendy AO, Dishisha T (2025). Therapeutic potential of a newly isolated bacteriophage against multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* infections: *in vitro* and *in vivo* characterization. *BMC Microbiol*, 25(1): 80.
55. Abed S, Sholeh M, Khazani Asforooshani M, Shafiei M, Hashemi Shahraki A, Nasr S (2024). Insights into the novel *Enterococcus faecalis* phage: A comprehensive genome analysis. *Plos One*, 19(5): e0301292.
56. Abed S, Beig M, Barzi SM, Shafiei M, Hashemi Shahraki A, Sadeghi S, Sohrabi A (2024). Development of phage-containing hydrogel for treating *Enterococcus faecalis*-infected wounds. *Plos One*, 28;19(10): e0312469.
57. Ngiam L, Weynberg KD, Guo J (2022). The presence of plasmids in bacterial hosts alters phage isolation and infectivity. *ISME Commun*, 2(1): 75.
58. Czajkowski R, Jackson RW, and Lindow SE (2019). Environmental bacteriophages: from biological control applications to directed bacterial evolution. *Front Microbiol*, 10, 1830.
59. Bonogafsky HB, Freer KM, Sanderson TB, Yost KA, Pyle AJ, Rowley G, and Gainey MD (2024). Complete annotated genome sequence of *Microbacterium paraoxydans* phage Evcara, a cluster GI podovirus isolated from compost. *MicroPubl Biol*, 10-17912.
60. Kozlova AP, Muntyan VS, Vladimirova ME, Saksaganskaia, AS, Kabilov MR, Gorbunova MK, and Roumiantseva ML (2024). Soil Giant Phage: Genome and Biological Characteristics of *Sinorhizobium Jumbo* Phage. *Int J Mol Sci*, 25(13): 7388.
61. Rao VB, and Black LW (2010). Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virol J*, 7, 1-14
62. Hankin EH (1896). L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du choléra. *Annales de l'Institut Pasteur*, 10, 511–523.
63. d'Hérelle F (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 165, 373–375.

64. Chanishvili N (2012). Phage therapy history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res*, 83, 3–40
65. Sankaran N (2010). Mutant bacteriophages, Frank Macfarlane Burnet, and the changing nature of “genespeak” in the 1930s. *J Hist Biol*, 43, 571-599
66. Gelderblom HR, Krüger DH (2014). Helmut Ruska (1908–1973): his role in the evolution of electron microscopy in the life sciences, and especially virology. *Adv Imaging Electron Phys*, Vol. 182, pp. 1-94
67. Holmes FO (1948). A classification of viruses based on their morphological characteristics. *J Bacteriol*, 55(5): 673–685.
68. Lwoff A, Horne RW, Tournier P (1962). A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 27, 51–55.
69. Bradley DE (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31(4): 230–314.
70. Ackermann HW (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*, 152(2):227-43
71. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, Adriaenssens EM (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol*, 168(2): 74
72. Chung KM, Liao XL, Tang SS (2023). Bacteriophages and their host range in multidrug-resistant bacterial disease treatment. *Pharmaceuticals*, 16(10): 1467.
73. Fokine A, Rossmann MG (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2): e28281
74. Fokine A, Zhang Z, Kanamaru S, Bowman VD, Aksyuk AA, Arisaka F, Rossmann MG (2013). The molecular architecture of the bacteriophage T4 neck. *J Mol Biol*, 425(10):1731-1744.
75. Xiang Y, Morais MC, Cohen DN, Bowman VD, Anderson DL, Rossmann MG (2008). Crystal and cryoEM structural studies of a cell wall degrading enzyme in the bacteriophage ϕ 29 tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(28): 9552-9557.
76. Bebeacua C, Lai L, Vegge CS, Brøndsted L, van Heel M, Veisler D, Cambillau C (2013). Visualizing a complete *Siphoviridae* member by single-particle electron microscopy: the structure of lactococcal phage TP901-1. *J Virol*, 87(2): 1061-1068.

77. Zhang M, Zhang T, Yu M, Chen YL, Jin M (2022). The life cycle transitions of temperate phages: regulating factors and potential ecological implications. *Viruses*, 14(9): 1904
78. Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, Briers Y (2017). Modeling the architecture of bacteriophage tail structures: Towards understanding virus–host interactions. *Curr Opin Virol*, 24, 124–133.
79. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol Life Sci*, 60(11): 2356–2370.
80. Hyman P, Abedon ST (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*, 70, 217–248
81. Lin J, Du F, Long M, Li P (2022). Limitations of phage therapy and corresponding optimization strategies: a review. *Molecules*, 27(6): 1857
82. Lu J, Guo J (2024). Prophage induction by non-antibiotic compounds promotes transformation of released antibiotic resistance genes from cell lysis. *Water Res*, 263, 122200
83. Kapoor A, Mudaliar SB, Bhat VG, Chakraborty I, Prasad ASB, Mazumder N. (2024). Phage therapy: A novel approach against multidrug-resistant pathogens. *3 Biotech*, 14(10): 256
84. Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, and Alqumber MA (2023). Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *MDPI*, Vol. 11, No. 13, p. 1946
85. Collaborators AR (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325): 629-655.
86. Mohan N, Bosco K, Peter A, Abhitha K, Bhat SG (2024). Bacteriophage entrapment strategies for the treatment of chronic wound infections: a comprehensive review. *Arch Microbiol*, 206(11): 443.
87. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z (2017). Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol*, 74, 277-283.
88. Federici S, Nobs SP, and Elinav E (2021). Phages and their potential to modulate the microbiome and immunity. *Cell Mol Immunol*, 18(4): 889-904.

89. Latz S, Krüttgen, A, Häfner H, Buhl EM, Ritter K, Horz HP (2017). Differential effect of newly isolated phages belonging to PB1-like, phiKZ-like and LUZ24-like viruses against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* under varying growth conditions. *Viruses*, 9(11): 315.
90. Kebriaei R, Lev KL, Shah RM, Stamper KC, Holger DJ, Morrisette T, Rybak MJ. (2022). Eradication of biofilm-mediated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections *in vitro*: Bacteriophage-antibiotic combination. *Microbiol Spectr*, 10(2): e00411-22.
91. Kelly L, Jameson E (2024). Bacteriophage cocktail shows no toxicity and improves the survival of *Galleria mellonella* infected with *Klebsiella* spp. *J Virol*, 98(6): e00272-24.
92. Faudzi H, Faroque H, Chia SL, Rahim RA (2018). *Lactococcus lactis*: LAB model organism for bacteria-mediated therapeutic strategies. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol*, 26(1): 1-10.
93. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, Lebeer, S (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4): 2782-2858.
94. Figueroa RHH, López-Malo A, Mani-López E (2024). Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria—a review. *Sustain Food Technol*, 2(2): 292-306.
95. Peral MC, Huaman Martinez MA, Valdez JC (2009). Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *Int Wound J*, 6(1): 73-81.
96. Stanbro J, Park JM, Bond M, Stockelman MG, Simons MP, Watters C (2020). Topical delivery of *lactobacillus* culture supernatant increases survival and wound resolution in traumatic *Acinetobacter baumannii* infections. *Probiotics Antimicrob. ProteinS*, 12, 809-818.
97. Christensen IB, Vedel C, Clausen ML, Kjærulff S, Agner T, Nielsen DS (2021). Targeted screening of lactic acid bacteria with antibacterial activity toward *Staphylococcus aureus* clonal complex type 1 associated with atopic dermatitis. *Front Microbiol*, 12, 733847.

98. Guarnieri A, Venditti N, Cutuli MA, Brancazio N, Salvatore G, Magnifico I, Pietrangelo L, Falcone M, Vergalito F, Nicolosi D, Scarsella F, Davinelli S, Scapagnini G, Petronio GP, Di Marco R (2024). Human breast milk isolated lactic acid bacteria: Antimicrobial and immunomodulatory activity on the *Galleria mellonella* burn wound model. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 1428525.
99. Giammarino A, Bellucci N, Angiolella L (2024). *Galleria mellonella* as a model for the study of fungal pathogens: advantages and disadvantages. *Pathogens*, 13(3): 233.
100. Kumar G, Khan MS (2018). Study of the life cycle of greater wax moth (*Galleria mellonella*) under storage conditions in relation to different weather conditions. *J Entomol Zool Stud*, 6(3): 444-447.
101. Serrano I, Verdial C, Tavares L, Oliveira M (2023). The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. *Antibiotics*, 12(3): 505.
102. Dinh H, Semenec L, Kumar SS, Short FL, Cain AK (2021). Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. *Pathog Dis*, 79(2): ftab006.
103. Khan A, Ali H, Rehman UU, Belduz AO, Bibi A, Abdurahman MA, Shah AA, Badshah M, Hasan F, Kilic AO, Ullah A, Jahan S, Rehman MMU, Mansoor R, Khan S (2022). Prebiotic potential of enzymatically prepared resistant starch in reshaping gut microbiota and their respond to body physiology. *PLoS One*, 16;17(5): e0267318.
104. Reis A (2017). Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu (Tez No: 502865) Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
105. Tufekci EF, Alkateeb A, Kilinc C, Gurbuz M, Altunoglu YC, Baloglu MC (2021). Investigation of metallo-beta-lactamase pro-duction in carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Kastamonu training and Research Hospital, Turkey. *Malays J Microbiol*. 17(5): 593-600.
106. Gülsoy E. (2024). Kan kültüründen izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenem direnç mekanizmalarının fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması (YÖK Tez No: 872619) [Uzmanlık tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
107. Abdurahman MA. (2018). Recombinant phage endolysins production and investigation of their efficacy against staphylococcal biofilms (Tez No. 607765)

- [Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
108. Khorshidtalab M, Durukan İ, Tufekci EF, Nas SS, Abdurrahman MA, Kiliç AO (2022). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages from Wastewater with Phage Therapy Potentials Against Gram-Negative Bacteria. *Eurasian J Med.* 54(2):157-164.
 109. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ (2010). Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol*, 161(4):308-14.
 110. Jung LS, Ding T, Ahn J (2017). Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 16, 1-9.
 111. Usman SS, Christina E (2024). Characterization and genome-informatic analysis of a novel lytic mendocina phage vB_PmeS_STP12 suitable for phage therapy *pseudomonas* or biocontrol. *Mol Biol Rep.* 2024 Mar 14;51(1):419. Erratum in: *Mol Biol Rep*, 5;51(1):609
 112. Synnott AJ, Kuang Y, Kurimoto M, Yamamichi K, Iwano H, Tanji Y (2009). Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl Environ Microbiol*, 75(13): 4483-449
 113. Khan A, Ali H, Rehman UU, Belduz AO, Bibi A, Abdurrahman MA, Shah AA, Badshah M, Hasan F, Kilic AO, Ullah A, Jahan S, Rehman MMU, Mansoor R, Khan S (2022). Prebiotic potential of enzymatically prepared resistant starch in reshaping gut microbiota and their respond to body physiology. *PLoS One*, 16;17(5):e0267318
 114. Azat R, Liu Y, Li W, Kayir A, Lin DB, Zhou WW, Zheng XD (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University. Science, B*, 17(8): 597.
 115. Zhao M, Li H, Gan D, Wang M, Deng H, Yang QE (2024). Antibacterial effect of phage cocktails and phage-antibiotic synergy against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Msystems*, 9(9): e00607-24.
 116. Loganathan A, Bozdogan B, Manohar P, Nachimuthu R (2024). Phage-antibiotic combinations in various treatment modalities to manage MRSA infections. *Front Pharmacol*, 15, 1356179.

117. Ignasiak K, Maxwell A (2017). *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. BMC Research Notes, 10, 1-8.
118. Maslova E, Osman S, McCarthy RR (2023). Using the *Galleria mellonella* burn wound and infection model to identify and characterize potential wound probiotics. Microbiology (Reading), 169(6):001350.
119. Ménard G, Rouillon A, Ghukasyan G, Emily M, Felden B, Donnio PY (2021). *Galleria mellonella* larvae as an infection model to investigate sRNA-mediated pathogenesis in *Staphylococcus aureus*. Front Cell Infect Microbiol, 11, 631710.
120. Maslova E, Osman S, McCarthy RR (2023). Using the *Galleria mellonella* burn wound and infection model to identify and characterize potential wound probiotics. Microbiology, 169(6): 001350.
121. Sawa T, Moriyama K, Kinoshita M (2024). Current status of bacteriophage therapy for severe bacterial infections. J Intensive Care, 12(1): 44.
122. Ross A, Ward S, Hyman P (2016). More is better: selecting for broad host range bacteriophages. Front Microbiol, 7, 1352.
123. Pradeep AN, Ramasamy S, Veniemilda JK, Kumar CV (2022). Effect of pH & temperature variations on phage stability-a crucial prerequisite for successful phage therapy. Int. J. Pharm. Sci. Res, 13, 5178-5182.
124. Sae-Ueng U, Bunsuwansakul C, Showpanish K, Phironrit N, Thadajarassiri J, Nehls C (2024). Nanomechanical resilience and thermal stability of RSJ2 phage. Scientific Reports, 14(1):19389
125. Bagińska N, Grygiel I, Orwat F, Harhala MA, Jędrusiak A, Gębarowska E, Jończyk-Matysiak E (2024). Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Scientific Reports, 14(1): 4285
126. Chen H, Liu H, Gong Y, Dunstan RA, Ma Z, Zhou C, Zhou T (2024). A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both *in vitro* and *in vivo*. NPJ Biofilms Microbiomes, 10(1): 127
127. Lertsittikul V, Thongdee M, Chaiwattananarungruengpaisan S, Atitthep T, Apiratwarasakul S, Withatanung P, Korbsrisate S (2022). A novel virulent Litonavirus phage possesses therapeutic value against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, 12(1): 21193.

128. Abootaleb M, Mohammadi Bandari N, Arbab Soleimani N (2022). Interference of *Lactiplantibacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* on the Infected Burns in Wistar Rats. J Burn Care Res, 43(4): 951-956
129. Papagianni M, Anastasiadou S (2009). Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. Microb. Cell Fact, 8, 1-16.
130. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE (2019). Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. Cell Host and Microbe, 25(2): 219–232
131. Chandla S, Harjai K, Shukla G (2022). Combinatorial therapeutic strategy of biogenics derived from *Lactobacillus fermentum* PUM and zingerone against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-induced surgical site infection: an experimental study. Probiotics Antimicrob. Proteins, 14(4): 712–726

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mine EĞİN
Uyruğu : T.C
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2025
Lisans	Hitit Üniversitesi	2021
Lise	Gazi Anadolu Lisesi	2017

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1. Laboratuvar Sorumlusu	AYTAÇ AKYUDUM GIDA SAN ve TİC.A.Ş.	2021-2022

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR (Tez yazım kurallarına göre yazılmalıdır)

1. Tekinarslan D, Er K, Eğin M, Dinçer T, & Kiliç AO. (2025). The Effect of Various Irrigants on Mixed Biofilms in Dentinal Tubules: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study. Microscopy Research and Technique.

BİLDİRİLER

1. **EğİN M**, Reis A, Cora M, Buruk CK, Kılıç AO. PHAGE–POSTBIOTIC SYNERGY: A Novel Strategy Against *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Wound Infection in *Galleria mellonella*. 8. Targeting Phage Therapy Kongresi, Berlin, 10-11 Haziran 2025.
2. Karakoc Parlayan HN, **EğİN M**, Reis A, Kilic AO. Source-Dependent Variability in *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Bacteriophage Infection. 8. Targeting Phage Therapy Kongresi, Berlin, 10-11 Haziran 2025.
3. Reis A, **EğİN M**, Karakoc Parlayan HN, Kılıç AO. Isolation and Characterization of a Highly Virulent Phage Against Clinical Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* Isolates. Targeting Phage Therapy Kongresi, Berlin, 10-11 Haziran 2025.

PROJELER

1. *Galleria mellonella* Yanık Yara Enfeksiyon Modelinde Yaygın Patojen Bakterilere Karşı Faj Terapi ve Hücre İçermeyen Laktik Asit Bakteri Kültür Sıvılarının Tedavi Amaçlı Kombine Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi. Yüksek Lisans Tez Projesi, Proje numarası: TYL-2024-1617.
2. Nistatin içeren Oral Film Formülasyonun Geliştirilmesi ve *in vitro* Antikandidal Etkililiğinin Araştırılması. Araştırmacı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi, Araştırmacı. Proje numarası: TSI-2024-15899.
3. *Galleria mellonella* yara yanık enfeksiyonu modelinde bazı arı ürünlerinin *in vivo* terapötik etkilerinin araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi, Araştırmacı. Proje numarası: TSB-2025-16214.
4. Hedefe Özgü Pan-Kanser Terapiler (PAN-TER) projesi, TÜBİTAK 1004 (İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 2021-2025), Bursiyer (2024-2025).

EĞİTİMLER VE KURSLAR

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Hadmek, 2024.
2. Adli Biyoloji Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvar Eğitimi, 2022