

# TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

NEO

PROJE ADI

Antimikrobiyal Direncin Azaltılmasına Yönelik Kolistin Temelli  
Hibrit Nano Yapıların Sentezlenmesi

BAŞVURU ID

366806

## İçindekiler

|   |    |
|---|----|
| 1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....  | 2  |
| 2. Problem/Sorun .....  | 3  |
| 3. Çözüm .....  | 4  |
| 4. Yöntem.....  | 4  |
| 4.1. Kolistin-Ag NP'lerin Sentezi: .....  | 4  |
| 4.2. Kolistin-Ag Hibrit Nano Yapıların Sentezi: .....   | 5  |
| 4.3. Sentezlenecek Kolistin-Ag NP ve Kolistin-Ag+ HNY Karakterizasyonu: .....   | 5  |
| 4.4. Serbest Kolistin, Kolistin-Ag NP ve Kolistin-Ag <sup>+</sup> HNY'lerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Test Edilmesi: ..... | 5  |
| 4.4.1. Disk Difüzyon Testi .....  | 5  |
| 4.4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi:.....   | 7  |
| 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü .....  | 7  |
| 6. Uygulanabilirlik .....   | 8  |
| 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....   | 9  |
| 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) .....  | 10 |
| 9. Riskler .....  | 11 |
| 10. Kaynaklar .....   | 12 |

### 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Şiddetli enfeksiyonlar günümüzde en çok mücadele ettiğimiz patolojik durumlardan biridir. Mikroorganizmalara karşı kullandığımız çeşitli antimikrobiyal ajanlar olan antibiyotik tedavilerine karşı geliştirilen direnç mekanizmaları onlara karşı verdiğimiz savaşı daha da zorlaştırmaktadır. Ortaya çıkan bu durum karşısında uyguladığımız tedavinin başarılı olması için patojenlerin halihazırda savunma mekanizması oluşturmadığı antibiyotiklerin kullanılması veya mevcut antibiyotiklerin yüksek dozlarda kullanılması önerilen çözümler arasındadır. Antimikrobiyal direnç gelişimi açısından yüksek risk altında bulunan ülkemizde özellikle gram negatif bakterilerde görülen kolistin (polimiksin E) direnciyle yoğun bakım hastalarında sıklıkla karşılaşılmaktadır. Tedavinin en üst basamağında bulunan kolistin ve karbapenem antibiyotiklerine dahi direnç gelişiminin ileri derecede artması ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bu sebeple mikrobiyal kontaminasyon ve enfeksiyon gelişiminden korunmak maksadı ile alternatif çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle etkin antimikrobiyal tedavinin sağlanamaması gibi sorunların önüne geçebilmek için yenilikçi ilaç tasarımı ve taşıyıcı sistemlerinin gelişimine ihtiyaç vardır.

Önerilen proje dahilinde bu sorunların önüne geçebilmek amacıyla nanoteknolojik çözüm niteliğinde kolistin temelli nanomalzemelerin antimikrobiyal karakteristiklerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda yapılacak çalışmalarda yoğun bakım hastalarında ciddi

oranda seyreden kolistin direnci sebebiyle kolistin antibiyotiği kullanılması planlanmaktadır. Temelde iki ayrı yöntemle kolistinden metalik Ag nanopartiküllerin ve hibrit nano yapıların sentezi gerçekleştirilecektir. İlerleyen aşamalarda ise üretilen bu hibrit nano yapıların antimikrobiyal etkinliği, klinikte en yüksek sıklıkta kolistin direnci gösteren üç ayrı gram negatif bakteri türü kullanılarak test edilecektir. Kolistin direnci gösteren *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* üzerine olan etkileri minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi ile ortaya konacaktır. Proje konusunu kapsayan bu çalışmalarla kolistinden sentezlenen hibrit nano yapıların ve nanopartiküllerin kullanılması ile oldukça inovatif bir yaklaşımla antimikrobiyal dirence çözüm getirileceği öngörülmektedir. Hedeflenen çalışmalardan olumlu sonuçlar alınması halinde elde edilen verilerin antibiyotiklere alternatif olarak önerilecek faydalı model ve patentlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## 2. Problem/Sorun

Çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalar (MDR) günümüzde insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen önemli tehdit unsurlarından biridir. Yapılan çalışmalarda hekim bilgisi dahilinde olmayan ilaç kullanımı, hastanede uzun süre kalma ve hastaya ait etkenler mikroorganizmaların direnç mekanizmaları geliştirmesinde ana faktörler olarak değerlendirilmektedir. Aynı zamanda bu çalışmalar dirençli organizmaların hastane dışında gelişim oranında da son 20 yıl içinde ciddi bir yükseliş olduğunu göstermektedir. Gram negatif bakterilerinin antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç mekanizmasının güçlenmesi, çoklu ilaç direncinin gelişimindeki en ciddi örneklerden biridir. Tüm bunların yanında ilaç sanayisinde yeni ilaç geliştirilmesi ve üretimi konusunda ciddi bir yetersizlik olduğunu da göz ardı etmemek gerekmektedir. Bu durum, mikroorganizmaların direnç gelişimini tetiklemekte tedavi anlamında klinikte ciddi problemler doğurmaktadır (1). Beta laktam grubu taşıyan antibiyotiklerden tigesiklin, karbapenem ve aminoglikozid direncine sahip gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin (polimiksin E) iyi bir alternatif tedavi olarak kullanılmaktadır (2). Bununla birlikte kolistin direnci de hızlı bir şekilde görülmeye başlamıştır ve dünya genelinde giderek artmaktadır. Nonfermenter mikroorganizmaların polimiksinlere karşı oluşturdukları direnç mekanizması gün geçtikçe artmaktadır. Bu mikroorganizmalardan biri olan *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) kolistine karşı dayanıklı ilk izolat olarak 1999 yılında Çek Cumhuriyeti tarafından bildirilmiştir (3). 2012’de Chang ve ark. tarafından yapılan çalışmada yalnızca kan örnekleri ile sıvı mikrodilüsyon metoduna göre çalışılan izolatların Tayvan’da %10,4’ü (4) ve 2014’te Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise Güney Kore’de %100’ünün (5) dayanıklı olduğu saptanmıştır. Vourli ve ark.’nın 2015 yılı boyunca izole ettiği 117 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatlarına kolistin duyarlılığı için yöntem değerlendirmesi yaptığı çalışmasında; kolistine direnç oranları, otomatize sistemler olan Phoenix 100’e göre %15,4, Vitek 2’ye göre %16,2, konvensiyonel yöntemlerden agar dilüsyona göre %35,9 ve sıvı mikrodilüsyona göre ise %25 olarak belirtilmiştir (6). Çalışma sonucunda otomatize sistem kullanan laboratuvarların mutlaka sıvı mikrodilüsyon ile doğrulama yapması gerekliliğini vurgulanmıştır. ABD’de balgam, burun sürüntüsü, kan, idrar gibi çeşitli örneklerle yapılan çalışmada *A. baumannii* izolatların “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE) ve multilokus sekans tiplendirmesi (MLST)

ile gen profilleri belirlenmiş ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 20 tanesi (%100) dirençli olarak saptanmıştır (7). Kolistin direnci gösteren *A. baumannii* izolatları için dünyanın farklı yerlerinden bildirilen farklı sonuçlar bulunmaktadır.

### 3. Çözüm

Günümüzde hızla artan bulaşıcı hastalıklar, ticari olarak ulaşabileceğimiz antibiyotiklerin kullanımını ciddi oranda artırmıştır. Bu durum mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı bir direnç oluşturmalarını sağlamış ve bu da önümüze yeni bir engel çıkarmıştır. Bu sebeple, bakterilerin tanımadığı yeni etki mekanizmalarını içinde barındıran ve bakterilerin daha az direnç gösterebileceği antimikrobiyal ilaçlar geliştirmek için çalışmalar son hızda devam etmektedir (8). Önerilen projede bu soruna çözüm olabilecek nitelikte dirençli mikroorganizmaların mevcut antibiyotiklerle tedavi edilememesine bağlı olarak antibiyotiklerden farklı morfolojilere sahip nanosistemler geliştirilmesi hedeflenmektedir.

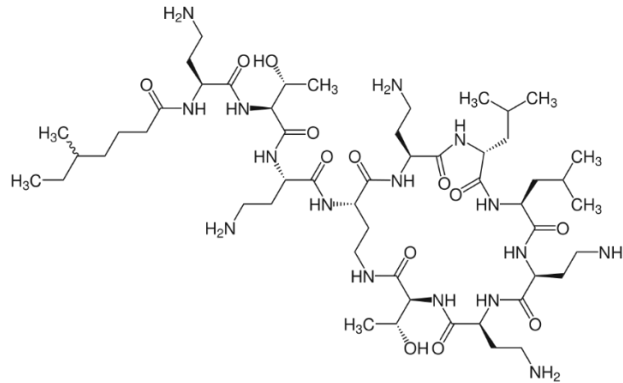
Projede tedavinin en üst basamağında olmasına rağmen ona dahi direnç geliştiren bakterilerin olduğu kolistin antibiyotiği üzerine çalışılacaktır. Önerilen proje, kolistinden Ag temelli hibrit nano yapılar (HNY) ve metalik Ag kullanılmasıyla nanopartiküller (NP) sentezlenmesiyle antimikrobiyal dirence karşı artan etkinliğin incelenmesi üzerinedir. Proje kapsamında serbest kolistin, kolistin-Ag nanopartikül (NP) ve kolistin-Ag<sup>+</sup> hibrit nano yapılarının (HNY) antimikrobiyal etkinliği sistematik olarak incelenecektir. Böylece kolistine karşı gösterilen antimikrobiyal dirence karşı sentezlenen yapıların dirençli bakterilerde dahi etkinliği olup olmadığı araştırılacaktır.

Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın özeti; kolistin antimikrobiyal direnç gösteren suşlarda etkinliğinin sistematik olarak incelenmesi dışında Ag NP'lerin tek başlarına gösterdikleri antimikrobiyal etkinlikten yola çıkılarak Kolistin-Ag NP'lerin ve Kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY'lerin sentezlenmesidir. Bu amaçla serbest kolistine dirençli mikroorganizmaların karşı artmış antimikrobiyal aktivite görüleceği düşünülmektedir.

### 4. Yöntem

#### 4.1. Kolistin-Ag NP'lerin Sentezi:

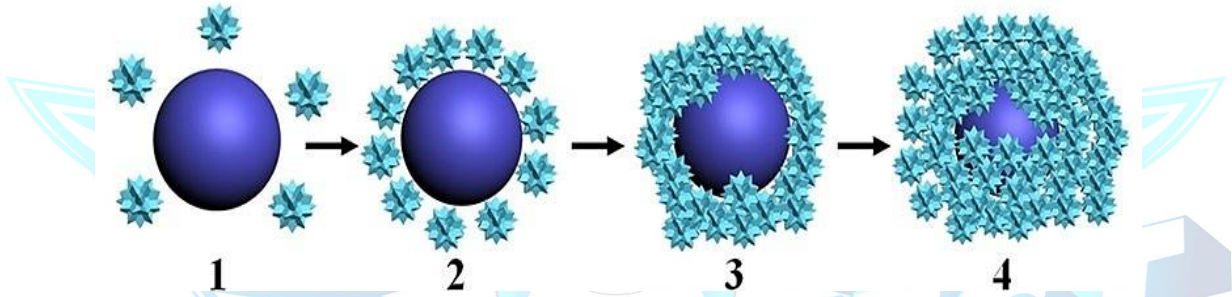
AgNP sentezi için 90 mL 3 M AgNO<sub>3</sub> çözeltisine 10 mL çeşitli konsantrasyonlarda kolistin eklenerek karanlık ortamda 24 saat boyunca karıştırılacaktır. Ardından 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilecek ve çökelti 70 °C'de bir gece kurutulacaktır.



Şekil 1. Kolistinin moleküler yapısı

#### 4.2. Kolistin-Ag Hibrit Nano Yapıların Sentezi:

Öncelikle  $\text{AgNO}_3$  stok çözeltisi saf su içerisinde hazırlanır. 0.02 mg/mL konsantrasyonunda kolistin içeren fosfat tamponuna (10 mM, pH: 7.4) belirlenen miktarda  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi eklenir ve karışım hızla vorteks edilir. Daha sonra karışım başka bir işleme tabi tutulmadan  $+4^\circ\text{C}$ 'de 3 gün inkübasyona bırakılır. 3 günün sonunda elde edilen mavi renkli çökelek (HNY) etüvde kurutulularak karakterize edilir. HNY'lerin sentezi Şekil 2'de gösterildiği gibi; ilk olarak gümüş ve fosfat bir araya gelerek nanokristaller oluşur. Bu aşamada protein molekülleri çoğunlukla  $\text{Ag}^+$  iyonları ile özellikle proteinin yapısındaki amin gruplarının koordinasyon bağı ile bağlanmasıyla agregatlar oluştururlar. Nanokristallerinin çekirdeklenme alanlarının oluşmasını bu agregatlar sağlar. Sonrasında ise protein molekülleri ve primer kristaller iri topaklar meydana getirirler. Nano boyutta oluşan yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve anizotropik büyüme ile çiçek benzeri şekillere sahip yapılar oluştururlar (20). Projede kolistin ile  $\text{Ag}^+$  oluşturacağı HNY incelenip oluşum mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır.



Şekil 2. Kolistin- $\text{Ag}^+$  hibrit nano yapıların sırası ile 1 günlük, 2 günlük ve 3 günlük inkübasyonları sonucu morfolojileri yer almaktadır.

#### 4.3. Sentezlenecek Kolistin-Ag NP ve Kolistin-Ag+ HNY Karakterizasyonu:

Kolistin-Ag NP ve Kolistin- $\text{Ag}^+$  HNY'lerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ile karakterize edilecektir. X-ışını kırınım (XRD) ile kristal yapıları ve FTIR ile kimyasal yapıları anlaşılırken, dinamik ışık saçılımı (DLS) ile etkin yarıçapları ve Zeta potansiyel ile yüzey yüklerin türü ve şiddeti ölçülecektir (23).

#### 4.4. Serbest Kolistin, Kolistin-Ag NP ve Kolistin- $\text{Ag}^+$ HNY'lerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Test Edilmesi:

##### 4.4.1. Disk Difüzyon Testi

Bu yöntemde, incelenecek olan mikroorganizma trypticase soy buyyonda 2 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir. Önerilen projede gram negatif bakteri ailesinde sıklıkla kolistin direnciyle karşılaşılan *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* kullanılacaktır. Bulanıklık oluştuktan sonra McFarland 0.5 ( $10^8$  mikroorganizma/ml)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulur. (McFarland standartları, bir sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. McFarland'ın baryum klorür ve sülfirik asit kullanarak geliştirdiği standart bulanıklık tüpleri, sıvı bir besiyerine ekilen bakterinin miktarına eşdeğer

bulanıklık derecelerini içerir). Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Takiben farklı konsantrasyonlarda Serbest kolistin, kolistin-Ag NP ve kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmelidir. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilir ve oluşan inhibisyon zonları ölçülür. Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir ve bu isimlerle de anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin/maddenin, duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; önerilen proje kapsamında belli miktarlarda Serbest kolistin, kolistin-Ag NP ve kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra NP ve HNY'lerin inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir.

#### 1. Test ve kontrol kültürleri ile inokulum hazırlanması:

**a.** Yalnızca saf kültür kullanılır.

**b.** Üç ila beş benzer koloni seçilir ve inokülasyon iğnesi veya öze kullanarak 4 – 5 mL'lik triptik soy broth gibi uygun bir sıvı ortamına (broth) (veya güç üreyen organizmalar için Mueller Hinton Broth) aktarılır.

**c.** Gerekirse 0,5 McFarland'lık türbidite standardını (yaklaşık olarak, 1 ila 2 x 10<sup>8</sup> CFU / mL) elde etmek için sıvı ortamdaki kültürler 35 °C'de 2-6 saat süreyle inkübe edilebilir.

**d.** 0,5 McFarland'lık türbidite standardına eşdeğer bir türbidite değeri elde etmek için gerekirse seyreltilir. Seyreltim sıvısı olarak steril sıvı besiyeri veya tuz çözeltisi kullanılabilir. Alternatif olarak; inokulum fotometrik olarak standartlaştırılır.

#### 2. İnokülasyon:

**a)** 15 dakika içinde, steril bir eküvyon uygun bir şekilde ayarlanmış inoküluma daldırılır ve fazla sıvının akması için eküvyon tüpün iç üst duvarına bastırılarak birkaç kez döndürülür.

**b)** Mueller Hinton Agar (veya uygun başka bir agar) plağının yüzeyi, tamamı üç kez çizilerek ekim yapılır. Eşit bir inokülasyon elde etmek için her çizimden sonra plak 60° döndürülür.

**c)** İlaç aşılınmış diskler uygulanmadan önce varsa yüzey neminin emilmesi için kapak 3–5 dakikalığına aralık bırakılabilir.

#### 3. Uygun diskler seçilir.

**4.** Diskler dispanser veya penset aracılığıyla, aseptik önlemlere dikkat edilerek uygulanır.

Diskler, merkezleri arasında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirilir.

Disklerin agar üzerinde yüzeyle teması sağlamak için steril bir iğne veya forsepsle disklere bastırılabilir.

5. Plaklar 15 dakika içinde, agar yüzeyi yukarı bakacak şekilde  $35 \pm 2$  °C'lik inkübatöre yerleştirilir.

6. 16-18 saat inkübasyondan sonra plakları incelenir.

Sık görülen aerobların testi için tahmini değerleri gösteren Zon Çapı Yorumlama Tablosuna (CLSI) bakılır.

#### 4.4.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi:

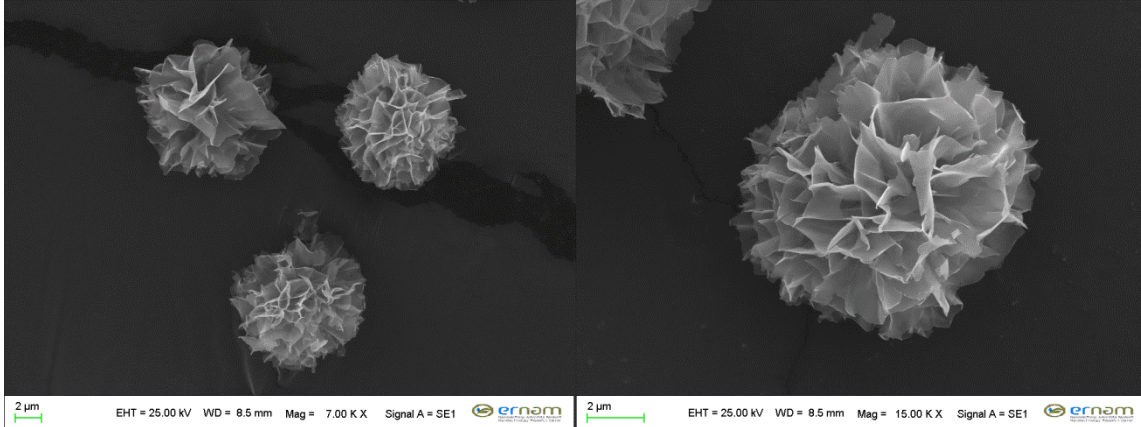
- Sıvı mikrodilüsyon yönteminde MHB kullanılır.
- Test 96-kuyucuklu U-tabanlı mikroplaklarda uygulanır.
- Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki serbest kolistin, kolistin-Ag NP ve kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY aynı sıra ile mikroplaklara dağıtılır.
- Serbest kolistin, kolistin-Ag NP ve kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY konsantrasyonları bu şekilde hazırlandığı gibi iki kat dilüsyon ile de hazırlanabilir.

#### Hazırlanan mikroplaklara bakteri inokülasyonu:

- McFarland 0.5 standart bulanıklığında hazırlanan inokulum 1:10 dilüe edildikten sonra sterilite kuyucuğu hariç diğer tüm kuyucuklara 5 µl olarak ekilir.
- İnokulum standardize edildikten sonra 15 dk içinde mikroplaklara ekim yapılır.
- İnokulum miktarı kuyucuktaki hacmin %10'undan fazla olmamalıdır.
- İnokulumun saflık kontrolü selektif olmayan agar plağına ekim yapılarak belirlenir.

#### Ön Çalışmalar:

Ön çalışma kapsamında antibiyotik ile Ag<sup>+</sup> iyonunun fosfat tamponundaki reaksiyonu ile hibrit nano yapının üretilmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. a) Antibiyotik-Ag<sup>+</sup> HNY

b) Petallerin ayrıntılı görünümü

## 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Nanomalzemeler arasında en yaygın olarak üretilen gümüş tabanlı nanoparçacıklar benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip olup çok yönlü mekanizmalar ile güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilerler (15,16).

Bahsedilen çoklu ilaç direnci sorununa yönelik çözüm niteliğindeki öne sürülen proje önerisinde temelde iki farklı metodla nanomalzeme sentezi gerçekleştirilecektir. Sentezlenecek iki farklı yapıdan ilki metalik kolistin-Ag nanopartikül (NP) sentezidir. Yapılan

birçok çalışmada Ag nanopartiküllerin antiviral, antifungal, antiparazitik ve antibakteriyel etkinlikleri kanıtlanmıştır (17,18). Sağlık sektörü, Ag tabanlı nanomalzemeler için en büyük pazarlardan biridir ve bakteriyel kolonizasyonu engellemek için intravenöz kateterler, yara örtüleri ve organ/diş implantları gibi tıbbi cihazlarda kaplama maddesi olarak kullanılmaktadır (19).

Projede kullanılacak olan diğer yöntemle kolistin-Ag<sup>+</sup> hibrit nano yapıların (HNY) sentezi gerçekleştirilecektir. Bu yöntem yakın bir tarihte, Amerika Birleşik Devletleri'nde Stanford Üniversitesi Prof. Zare ve arkadaşları tarafından yeni nesil bir enzim immobilizasyon yaklaşımı şeklinde geliştirilmiştir. Enzimlerin serbest formuna ve konvansiyonel yöntemle immobilize formuna göre hem katalitik aktivitesi hem de kararlılığı dikkate değer ölçüde artmıştır. Çiçek şekilli organik-inorganik hibrit nano yapıların temel üretim mekanizmasında, ilk olarak organik kısım olan proteinler inorganik bileşen olarak Cu (II) iyonunu ile fosfat tamponunda (PBS) etkileşerek, protein-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> kristalleri oluşur ve devamında sistemin protein ile beslenmesi ve inkübe edilmesi ile çiçek şekilli hibrit nano yapılar üretilmiştir (20). Benzer bir konsept ise Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Öğretim üyesi Doç. Dr. İsmail Öçsoy ve araştırma ekibi tarafından protein yerine farklı biyolojik ve organik moleküller kullanılarak çiçek şekilli hibrit nano yapıları üretilmiştir ve enzim dışı yapıların peroksidaz benzeri aktiviteleri ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Önerilen projede kolistin organik bileşen olarak kullanılması sonucu Prof. Zare ekibinin yaptığından farklı olarak inorganik kısım olarak da Ag<sup>+</sup> kullanılmasıyla hibrit nano yapılar sentezlenecektir.

Khaled ve ark. tarafından 2021'de kolistin, imipenem ve Ag NP'ler çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* suşuna karşı test edilmiştir (21). Salman ve ark. tarafından 2019'da yapılan başka bir çalışmada ise polimiksin grubuna ait olan polimiksin B ve Ag NP'ler *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm üzerine sinerjistik etkinin olup olmadığı araştırılmıştır (22). Yapılan bu son çalışmalardan da anlaşılacağı gibi önerilen proje, popüler hale gelen antibiyotiklere alternatif nanoteknolojik yaklaşımlar geliştirme üzerinedir. Projenin temel yenilikçi yönü mevcut çalışmaların aksine doğrudan kolistinden Ag nanomalzemelerin üretilmesi ve bunun iki farklı yöntemle gerçekleştirilmesi üzerinedir. Böylece tek başına kolistin varlığında direnç gösteren bakteriyel suşların kolistin içerikli Ag nanomalzemeler varlığında sinerjistik etki ile direncin üstesinden gelebileceği öngörülmektedir. Ayrıca iki farklı yöntem sonucu elde edilen nanomalzemelerin de karşılaştırması yapılarak daha etkin olan formun belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu bilgilerin ışığında önerilen projede serbest kolistin dışında kolistin metalik Ag ile kombinasyonu ile nanopartikül ve hibrit nano yapılar oluşturulacaktır. Projede yenilikçi bir bakış açısıyla Ag<sup>+</sup> iyonlarının varlığıyla desteklenmiş bir iki farklı nanomalzeme sentezlenerek kolistin serbest formuna göre antibakteriyel etkinliğindeki değişiklik incelenecektir.

## 6. Uygulanabilirlik

Bu çalışma sonucunda kolistin direnci gösteren 3 ayrı bakteri suşuna karşı etkili kolistin-Ag NP ve kolistin-Ag<sup>+</sup> HNY sentezlenecektir. Bu sayede antibiyotik tabanlı Ag nanomalzemeler sentezlenerek gümüş ile model antibiyotiğin sinerjik aktivitesinden yararlanılarak düşük



dozda antibiyotik ile yüksek antimikrobiyal etki görülmesi ve direncin üstesinden gelinmesi hedeflenmektedir. Böylece ciddi bir sorun haline gelen antimikrobiyal direncin önlenmesi ve kolistin direnci kaynaklı hastanede kalış süresinin kısalması beklenmektedir. Patojenlerdeki kolistin direncinin neden olduğu enfeksiyonlar ve antibiyotik tedavisi başarısızlığı oranları arttığından, bu enfeksiyonları tedavi etmek ve önlemek için alternatif stratejilerin bulunması gerekmektedir. Antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak için mevcut antibiyotikleri nanoteknolojik akıllıca planlanmış stratejilerle etkili hale getirmek bu soruna çözüm olabilecek niteliktedir. Ag nanomalzemelerin etkili şekilde patojenlerin eradikasyonunda kullanıldığı yapılan çalışmalarla desteklenmiş olup önerilen projede gram negatif bakteri direnci denilince akla ilk gelen kolistin antibiyotiği Ag NP ve Ag<sup>+</sup> HNY sentezlemeyi ve antimikrobiyal aktivitesini incelemeyi hedeflemekteyiz. Böylece normalde kolistinle dahi tedavi edilemeyen direnç gösterdiği saptanan yoğun bakımda sıklıkla karşılaşılan patojenler için alternatif tedavi yokken antibiyotiğin Ag nanomalzeme formülasyonunda uygulanması tedavi yolunda umut verici olacağı öngörülmektedir. Sentezlediğimiz nanopartiküllerden istediğimiz olumlu sonuçları aldığımız takdirde nanopartiküllerin klinik suşlar üzerindeki etkisini de incelemeyi planlamaktayız. Bu şekilde elde edilen veriler uluslararası satış yapan ilgili firmalara lisanslanabilir. Eğer projemiz yurt içi proje desteklerine hak kazanırsa tamamen milli üretim olarak uygun farmasötik dozaj şekline getirilebilir ve milli bir marka ile diğer ülkelere pazarlanabilir.

#### 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

| İP No | İP Adı/Tanımı  | AYLAR |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |
|-------|--|-------|---|---|---|---|----|------|----|---|---|---|---|--|
|       |  | 2022  |   |   |   |   |    | 2023 |    |   |   |   |   |  |
|       |  | 5     | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11   | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 |  |
| 1     | Kolistin-Ag NP'lerin sentez şartlarının standardizasyonu ve sentezinin gerçekleştirilmesi                            |       |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |
| 2     | Kolistin-Ag <sup>+</sup> HNY sentezi   |       |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |
| 3     | Kolistin-Ag NP'lerin ve kolistin-Ag <sup>+</sup> HNY'lerin karakterizasyonu  |       |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |
| 4     | Kolistin-Ag NP'lerin ve kolistin-Ag <sup>+</sup> HNY'lerin dirençli suşlarda antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi |       |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |
| 5     | Verilerin düzenlenmesi ve sonuç raporu   |       |   |   |   |   |    |      |    |   |   |   |   |  |

**Tablo 1.** İş-zaman planı

Projede kullanılacak malzemelerin listesi ve miktarları Tablo 2’de sunulmuştur. Alınan proformalarla yaklaşık 21.000 TL’lik bütçenin yeterli olduğu öngörülmüştür. Projede gerekli olan kimyasal malzeme ve sarf malzemelerin kısmen araştırma laboratuvarında bulunması durumunda bütçe daha da aşağıya çekilmektedir. Harcamaların büyük kısmı proje başlangıcında gerekli olduğu görülüp temin edilmiştir.

| Malzemenin Cinsi  | Miktar | Birim | Birim Fiyat | K.D.V | K.D.V. Dahil Toplam Fiyat |
|---|--------|-------|-------------|-------|---------------------------|
| Pipet Ucu 0-10µl  | 5      | PAKET | 179,00 TL   | 18    | 1.056,10 TL               |
| Pipet Ucu 5-100 µl  | 5      | PAKET | 39,00 TL    | 18    | 230,10 TL                 |
| Pipet Ucu 1000 µl   | 10     | PAKET | 79,00 TL    | 18    | 932,20 TL                 |
| Pipet Ucu 0-5000µl  | 10     | PAKET | 159,00 TL   | 18    | 1.876,20 TL               |
| Millex-HV Siringa Ucu Filtre  | 5      | PAKET | 661,00 TL   | 18    | 3899,75 TL                |
| Millex-HV Siringa ucu filtre nonsteril                                | 2      | PAKET | 295,00 TL   | 18    | 696,20 TL                 |
| Cam Test Tüpü   | 5      | PAKET | 195,00 TL   | 18    | 1150,5 TL                 |
| Vial 1,5ml  | 2      | PAKET | 246,00 TL   | 18    | 580,56 TL                 |
| ENJEKTÖR 10ML [100AD/PKT]   | 10     | PAKET | 95,00 TL    | 18    | 1121 TL                   |
| ENJEKTÖR 20ML [100AD/PKT]   | 10     | PAKET | 140,00 TL   | 18    | 1.652,00 TL               |
| ENJEKTÖR 5ML [100AD/PKT]  | 10     | PAKET | 89,00 TL    | 18    | 1050 TL                   |
| Petri Kutusu [26Ad/Pkt]   | 10     | PAKET | 38,00 TL    | 18    | 380 TL                    |
| Eküvyon Çubuğu [100AD/PKT]  | 100    | PAKET | 19,00 TL    | 18    | 2.242,00 TL               |
| Öze 10 µl [20X5 Paket]  | 20     | PAKET | 49,00 TL    | 18    | 1156,4 TL                 |
| 96 WELL PLATE, Düz Tabanlı, GAMA Steril [50Ad/Pkt]                    | 2      | PAKET | 1.390,00 TL | 18    | 1312,6 TL                 |
| Cam Beher, Kısa Form, 25 ml   | 10     | ADET  | 14,00 TL    | 18    | 165,20 TL                 |
| Cam Beher, Kısa Form, 50 ml   | 10     | ADET  | 18,00 TL    | 18    | 212,40 TL                 |
| Cam Beher, Kısa Form, 100 ml  | 10     | ADET  | 21,00 TL    | 18    | 247,80 TL                 |
| Cam Beher, Kısa Form, 250 ml  | 5      | ADET  | 25,00 TL    | 18    | 147,50 TL                 |
| Cam Beher, Kısa Form, 1000 ml   | 5      | ADET  | 55,00 TL    | 18    | 324,50 TL                 |
| Şişe, 100 ML, Borosilikat Cam, Mavi Vidalı Kapaklı - G145, Taksimatlı | 10     | ADET  | 35,00 TL    | 18    | 413,00 TL                 |
| Şişe, 250 ML, Borosilikat Cam, Mavi Vidalı Kapaklı - G145, Taksimatlı | 10     | ADET  | 40,00 TL    | 18    | 472,00 TL                 |
| Spektrofotometre Küveti, PS, Köpük Rakta, 0,5-2 ml Mikro [100Ad/Kutu] | 1      | KUTU  | 68,00 TL    | 18    | 80,24 TL                  |

**Tablo 2.** Malzeme listesi

## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Ülkemiz MDR mikroorganizmaların yaygınlığı konusunda diğer ülkelere göre çok daha yüksek oranlara sahiptir. Bu mikroorganizmalara karşı verilen mücadele, gerekli sağlık politikalarıyla desteklenmeli ve toplumsal savaş devam ettirilmelidir. Mikroorganizmalara karşı verdiğimiz bu mücadelede tanı, tedavi ve koruma gibi her adım çok önemli yer tutmaktadır. MDR mikroorganizmaların doğru, hızlı ve maliyet etkin tespiti ve tedavisi direnç döngüsünün aşılmasında en çok özen gösterilmesi gereken noktaların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı 2019 yılı Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Sürveyans (CAESAR) raporuna göre ülkemizde kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde MDR %40'lara, *Acinetobacter spp.* kökenlerinde %79 yükseldiğini görebiliriz. Aynı raporda ülkemizde metisiline karşı dayanıklı *Staphylococcus aureus* (MRSA) %30'larda vankomisin dirençli Enterekok (VRE) oranlarının

%15'lerde olduğu bildirilmiştir (9). Bahsedilen bu antimikrobiyal direnç sorununa karşı etkili tedaviyi sağlayacak antibiyotiklerin mevcut geliştirilme hızı çok yavaştır. Büyük ilaç şirketlerinin çoğu, bu yüksek riskli yatırımlar için devlet teşviklerinin olmaması nedeniyle yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesini finansal olarak desteklemekten vazgeçmiştir (10-13). Bunun sonucunda yeni antibiyotik gelişimine olan ciddi boyutlardaki ihtiyaca çözüm niteliğinde nanoteknolojik çözüm süreçlerinin etkili olduğu kabul edilmiştir (14). Bu veriler ışığında projemiz oldukça geniş bir hedef kitleye sahiptir. Antimikrobiyal direnç ile mücadele eden hastalar ve bu hastalara tedavi hizmeti sunacak sağlık çalışanları projemizin kısaca hedef kitesidir.

## 9. Riskler

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (B Planı) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla Tablo 3'teki Risk Yönetimi Tablosu'nda ifade edilmiştir.

|   | En Önemli Riskler  | Risk Yönetimi (B Planı)  |
|---|--|--|
| 1 | Ag HNY'lerin sentezinde kullanılan kolistinin daha önceden hedef konulan konsantrasyonunda istenilen şekilde Ag NP oluşmaması. | Farklı konsantrasyon ve ortam şartlarında sentez koşulları oluşturmak ve karakterizasyona o şekilde devam etmek. |

**Tablo 3.** Risk Yönetim Tablosu

“Ag HNY'lerin sentezinde kullanılan kolistinin daha önceden hedef konulan konsantrasyonunda istenilen şekilde Ag NP oluşmaması.” riskinin olasılığı düşüktür fakat projeye etkisi orta derecededir. Tablo 4'teki Olasılık ve Etki Matrisi' ne göre düşük risk olarak değerlendirilebilir. Bu durumda risk  $1 \times 5 = 5$  düşük risk olarak tanımlanabilir. Bahsedilen risklerle karşılaşıldığı durumlarda B planını uygulamaya geçilecektir. Risk yönetim tablomuzdan da anlaşıldığı gibi tolere edilemez bir riskimiz bulunmamaktadır.

| Olasılık | Düşük          | Orta        | Yüksek          | Etki |
|----------|----------------|-------------|-----------------|------|
| Yüksek   | Orta Risk      | Yüksek Risk | Çok Yüksek Risk |      |
| Orta     | Düşük Risk     | Orta Risk   | Yüksek Risk     |      |
| Düşük    | Çok Düşük Risk | Düşük Risk  | Orta Risk       |      |

**Tablo 4.** Olasılık ve Etki Matrisi

## 10. Kaynaklar

1. Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards Jr, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., & Bartlett, J. G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 42(5), 657-668.
2. Özger, H. S., Karaşahin, Ö., Telli, G., & Dizbay, M. (2012). Nozokomiyal Klebsiella türleri arasında karbapenem direnç sıklığı ve fenotipik yöntemlerle direncin değerlendirilmesi. *Flora Dergisi*, 17, 103-10.
3. Hejnar, P., Kolář, M., & Hájek, V. (1999). Characteristics of Acinetobacter strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of ss-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Biomedical Papers*.
4. Chang, K. C., Lin, M. F., Lin, N. T., Wu, W. J., Kuo, H. Y., Lin, T. Y., ... & Liou, M. L. (2012). Clonal spread of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in eastern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(1), 37-42.
5. Lee, S. Y., Shin, J. H., Park, K. H., Kim, J. H., Shin, M. G., Suh, S. P., ... & Kim, S. H. (2014). Identification, genotypic relation, and clinical features of colistin-resistant isolates of Acinetobacter genomic species 13BJ/14TU from bloodstreams of patients in a university hospital. *Journal of clinical microbiology*, 52(3), 931-939.
6. Vourli, S., Dafopoulou, K., Vrioni, G., Tsakris, A., & Pournaras, S. (2017). Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(9), 2528-2530.
7. Qureshi, Z. A., Hittle, L. E., O'Hara, J. A., Rivera, J. I., Syed, A., Shields, R. K., ... & Doi, Y. (2015). Colistin-resistant Acinetobacter baumannii: beyond carbapenem resistance. *Clinical infectious diseases*, 60(9), 1295-1303.
8. Tasiemski A., Salzet M., U.S. Patent No. 20,120,251,625. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, issued October 4; 2012. Use of extract of leeches as antibacterial agent. WO 2011/045427 A1, (2011).
9. "Prevalence maps". World Healthy Organization. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/surveillance/prevalence-maps>, Son erişim tarihi: 14 Aralık 2021.
10. Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, PMC-S14459.
11. Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*, 2, 145.
12. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
13. Zheng, W., Sun, W., & Simeonov, A. (2018). Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British journal of pharmacology*, 175(2), 181-191.

14. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., and Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3, 243–250.
15. Silva, G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical neurology*, 61(3), 216-220.
16. Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282.
17. Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of applied microbiology*, 112(5), 841-852.
18. Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., & Xing, M. M. (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International journal of nanomedicine*, 9, 2399.
19. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
20. Ge, J., Lei, J., & Zare, R. N. (2012). Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature nanotechnology*, 7(7), 428-432.
21. Khaled, J. M., Alharbi, N. S., Siddiqi, M. Z., Alobaidi, A. S., Nauman, K., Alahmedi, S., ... & Al Jurayyan, A. N. (2021). A synergic action of colistin, imipenem, and silver nanoparticles against pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from patients. *Journal of infection and public health*, 14(11), 1679-1685.
22. Salman, M., Rizwana, R., Khan, H., Munir, I., Hamayun, M., Iqbal, A., ... & Amin, F. U. (2019). Synergistic effect of silver nanoparticles and polymyxin B against biofilm produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates of pus samples in vitro. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 2465-2472.
23. Gurunathan, S., Choi, Y. J., & Kim, J. H. (2018). Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1210.