

Tigesiklin ve Vankomisin Normal ve Kistik Fibrozlu Akciğerin Bronş Epiteline Girişleri Arasındaki Farkın Belirlenmesi

Determination of the Differences in Penetration of Tigecycline and Vancomycin Into Bronchial Epithelium of Normal and Cystic Fibrosis Lung

Necati Günay¹, Ferda Akar², Cengiz Gökbulut³, Serhan Sakarya⁴

¹Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ankara, Türkiye

²Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

³Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

⁴Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmada normal ve kistik fibrozlu bronş epitelinde tigesiklin ve vankomisin ulaşabileceği etkin hücre içi konsantrasyonların, doz ve zaman parametrelerine bağlı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Tigesiklin ve vankomisin arasındaki doz ve zamana bağlı hücre içi konsantrasyonları yönünden farklılıklar, hücre kültürü ve yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle belirlenmiştir.

Bulgular: Tigesiklinin kistik fibrozlu bronş epiteline girişiyle normal hücreye girişi arasındaki farkın, anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Hücre içine giren miktar, uygulanan dozlarla karşılaştırıldığında, hücre içine optimal girişin olduğu doz 30 µg/ml, zaman ise 8 saat olarak tespit edilmiştir. Vankomisin hücre içine minimal miktarda girebilmesi için, kılavuzlarda belirtilen minimum inhibitör konsantrasyonun çok üstündeki dozlarda vermek gerektiği tespit edilmiştir.

Sonuçlar: Tigesiklinin kistik fibrozlu bronş epiteline girişi normal bronş epiteline oranla daha yüksek bulunmuştur. Vankomisin kistik fibrozlu ve normal bronş epiteline girişinin ise yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, tigesiklinin kistik fibrozlu hastaların akciğer infeksiyonlarında yüksek bir terapötik potansiyeli olduğu düşünülmüştür.

Klimik Dergisi 2018; 31(2): 139-43.

Abstract

Objective: We aimed to investigate the dose and time course of tigecycline and vancomycin for effective intracellular concentration in bronchial epithelium of normal and cystic fibrosis lung.

Methods: Differences between vancomycin and tigecycline in terms of their dose- and time-dependent intracellular concentrations were determined with in vitro cell culture and the high performance liquid chromatography techniques.

Results: The penetration of tigecycline was found significantly higher in cystic fibrosis cells compared to normal bronchial cells. The optimal dose for tigecycline was 30 µg/mL and the optimal time was 8 h in comparison to given dose and penetrating amount into the cells. Vancomycin dose needed to be given for minimal penetration into the cell was extremely higher than the minimum inhibitor concentration described in the guidelines.

Conclusions: Penetration of tigecycline into cells of cystic fibrosis lung was found higher than normal lung cells, whereas cell penetration of vancomycin into both normal and cystic fibrosis cells was limited. These data suggest that tigecycline has a high therapeutic potential in lung infections of patients with cystic fibrosis.

Klimik Dergisi 2018; 31(2): 139-43.

Anahtar Sözcükler: Kistik fibroz, vankomisin, tigesiklin.

Key Words: Cystic fibrosis, vancomycin, tigecycline.

Giriş

Solunum sistemi anatomik olarak dış ortama açık olmasına karşın mükemmel bir koruyucu yapıya sahip

olup bunlardan en önemlisi mukosilyer yapıdır. Bu yapı mikroorganizmaların solunum sistemine ulaşmasını engellediği gibi diğer partikülleri de uzaklaştırır (1,2). Mu-

Cite this article as: Günay N, Akar F, Gökbulut C, Sakarya S. [Determination of the differences in penetration of tigecycline and vancomycin into bronchial epithelium of normal and cystic fibrosis lung]. *Klimik Derg.* 2018; 31(2): 139-43. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Serhan Sakarya, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

E-posta/E-mail: serhansakarya@yahoo.com

(Geliş / Received: 1 Kasım / November 2017; Kabul / Accepted: 1 Şubat / February 2018)

DOI: 10.5152/kd.2018.33



kosiliyer savunmayı belirleyen de tüm solunum sistemini örten sıvının hacmi ve kompozisyonudur. Bu örtü, inhale edilen partikülleri tutan viskoz mukus ve epitelle mukusu birbirinden ayıran perisiliyer sıvıdan oluşur. Perisiliyer sıvı, düşük viskoziteyle bir yandan siliyer darbeleri kolaylaştırırken diğer yandan mukusun temizleme işlevini artırmaktadır (3,4).

Kistik fibroz (KF), mortalite oranı yüksek, çoğunlukla beyaz ırkta görülen genetik bir hastalıktır. Epitel hücrelerinin apikal membranında klor kanalı olarak görev yapan kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) olarak adlandırılan proteini kodlayan ve yedinci kromozomun uzun kolunda yer alan gendeki mutasyonlara bağlı bir tek gen hastalığıdır. Bu otozomal resesif hastalık, birçok sistemi ilgilendirir ve üst solunum yolları, akciğer, pankreas, karaciğer, safra kanalları, ter bezleri ve ürogenital sistemi etkileyebilir (5-7).

KF'li hastalarda ölümün en büyük nedeni, tekrarlayan pulmoner infeksiyonlardır. KF hastalarında çocukluk dönemindeki akciğer infeksiyonlarının en sık etkeni *Staphylococcus aureus* olup, bu hastaların ileri yaşlara gelmeleriyle birlikte en yaygın pulmoner patojenler, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleksi olur (8).

KF'li hastalarda CFTR kodlayan gende oluşan mutasyon nedeniyle epitelde siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı iyon geçişinin bozulması sonucu perisiliyer sıvının hacminde azalma olmaktadır. Bu bozulma sonucunda siliyumlar yeterli kadar uzayamamakta ve mukusu akciğerden temizleyememektedir (3,9). Mukustaki dehidratasyon aynı zamanda glikokaliks yapıya sıkıca yapışmasına da neden olmaktadır (10). Tüm bu değişiklikler solunum sisteminde *P. aeruginosa* gibi bakterilerin kolonizasyonu için elverişli bir ortamın oluşmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada, belirli dozlardaki vankomisin ve tigesiklinin hem hücre içi madde transferinde sorun olduğu bilinen KF'li bronş epiteline hem de normal akciğer bronş epiteline optimal girişi için, hücre kültürü ortamında doz ve zaman yanıtı çalışması yapılması ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile her iki antibiyotik için hücre içi konsantrasyonları arasındaki doz ve zamana bağlı farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler

Araştırmada American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen normal insan bronşiyal epitel hücresi BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) ve KF'li bronşiyal epitel hücresi IB3-1 (ATCC® CRL-2777™) kullanıldı. IB3-1 hücrelerinin kültürü, ticari LCH-8 Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)'da yapıldı. BEAS hücreleri ise %10 oranında fetal sıgır serumu (FBS)'yla zenginleştirilmiş ve 75 ml'lik flasklara konulmuş DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Biological Industries, Beit HaEmek, İsrail)'da 37°C'de %5 CO₂'li ortamda üretildi.

Doz ve zaman çalışmalarında Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (11) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (12) tarafından vankomisin ve tigesiklin için bildirilen sırasıyla 2 µg/ml ve 0.5 µg/ml minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri referans olarak alındı.

Doz Yanıtı Çalışması: Tigesiklin ve vankomisin deneylerde kullanılacak 0, 3, 10, 30, 100 ve 300 µg/ml dozlarının 10 katı konsantrasyonlardaki stok antibiyotik solüsyonları ha-

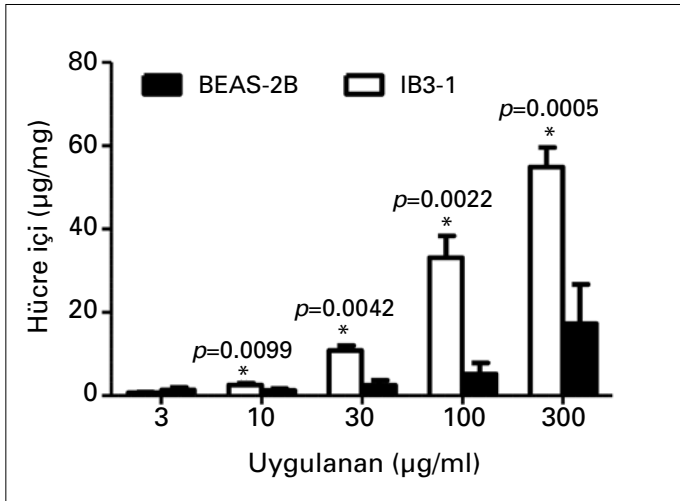
zırlandı. Flask yüzeyini %70-80 oranında kaplamış hücreler üç kez fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'yla yıkandı. Flasklara 4.5 ml besiyeri eklendi. Besiyeri içeren flasklara doza karşılık gelen dilüsyonun 10 katı olacak şekilde 0.5 ml antibiyotik eklendi. Flasklar, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücreler üç kez PBS ile yıkandı. Üzerine 2 ml PBS eklenerek kazıyıcıyla hücreler yüzeyden kazındı. Yüzeyden kalkmış hücreler 15 ml'lik Falcon™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) konik santrifüj tüplerine aktarıldı. +4°C'de 1900 devir/dakika'da 10 dakika santrifüje edildi. Santrifügasyon sonrası süpernatant atıldı ve çökeltiliye 200 µl PBS eklenerek süspansiyon hazırlandı. Hücre süspansiyonu 1.5 ml'lik tüplerde -196°C'de tutularak donana kadar bekletildi. Hızla çözölen donmuş hücrelere ultrasonik banyoda 10 dakika sonikasyon uygulandı. Bu işlem hücreler mikroskop altında incelenerek patlayana kadar tekrarlandı. +4°C'de 10 000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüje edildi ve süpernatant 1.5 ml'lik bir tüpe aktararak HPLC çalışması için -20°C'ye kaldırıldı.

Zaman Yanıtı Çalışması: Flask yüzeyini %70-80 oranında kaplamış hücreler, 0, 1, 2, 4, 8, 16 ve 24. saatlerde üç kez PBS ile yıkandıktan sonra, flasklara, tigesiklin ve vankomisin doz yanıtı çalışmasında elde edilen optimal dozlarından 5 ml eklendi. Belirlenen zamanlardaki inkübasyonların sonunda hücreler yukarıda belirtildiği şekilde patlatma işlemi yapılarak 1.5 ml'lik poliüretan tüplere aktarılıp bir kısmı HPLC çalışması için -20°C'de saklandı; bir kısmında ise standard miktarda çalışmak için protein tayini yapıldı. Protein tayini, bikinkonik asid yöntemiyle Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak yapıldı. Yöntem, kitte belirtilen protokol çerçevesinde mikropipler kullanılarak uygulandı.

İlaç Analizleri: Vankomisin (AppliChem, Darmstadt, Almanya) ve tigesiklin (AppliChem, Darmstadt, Almanya) standardı kullanılarak stok standard solüsyonları (100 µg/ml) hazırlandı. Bunlar son konsantrasyonları 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml olacak şekilde PBS/asetonitril (ACN) (1:1) solüsyonuyla sulandırılıp standard eğri oluşturularak doğrulukları belirlendi. Burada kullanılan PBS/ACN solüsyonu hazırlanırken 3 gr potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄) + 3 gr sodyum di-hidrojen fosfat (Na₂PO₄) 1 lt ultra saf suda çözöldü. 0.6 gr 1-oktansülfonik asid eklenip pH değeri trifloroasetik asid (TFA) ile 3'e ayarlandı.

Hücre süspansiyondaki proteinleri çöktürmek için 150 µl hücre süspansiyonundan 1.5 ml alınarak poliüretan tüpe kondu ve üzerine 150 µl ACN eklendi. Vorteksenerek iyice karışması sağlandı. 13 000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüje edildi. Süpernatant bir flakona aktarıldı (13).

HPLC Şartları: Tigesiklin hareketli faz olarak PBS/ACN (80/20) ile 1100 serisinden bir pompa (Agilent, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak, mobil faz akış hızı dakikada 1.3 ml olacak şekilde pompalandı ve her bir analiz 7 dakikada tamamlandı (14). Vankomisin hareketli faz olarak PBS/ACN (%15 TFA içeren ultra saf su) (95/5) ile 1100 serisinden bir pompa (Agilent, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak, mobil faz akış hızı dakikada 1 ml olacak şekilde pompalandı ve her bir analiz 12 dakikada tamamlandı. Her iki antibiyotik molekülünün analizi için Luna® (Phenomenex, Cheshire, Birleşik Krallık) kolonunun C18 (150 mm x 4.6 mm, 3µm) modeli kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı. Analizler, dalga boyu ti-



Şekil 1. Farklı dozlarda tigesiklinin IB3-1 ve BEAS-2B hücrelerinin içine giriş oranları.

gesiklin için 244 nm'ye, vankomisin için 240 nm'ye ayarlanmış fotodiyod dizi dedektörü (1200 Series Fluorescence Detector, Agilent, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Cihaza hem standarddan hem de örneklerden, tigesiklin analizi için 50 µl, vankomisin analizi için ise 25 µl injekte edildi.

Özgüllük için vankomisin ve tigesiklin eklenmeyen, hücre üzerine sadece besiyeri konulmuş sıfır doz kullanılarak kromatogramda vankomisin ve tigesiklin alıkonma zamanlarında piklerin girişim yapıp yapmadığı incelendi. Standardlar, vankomisin için stok solüsyonların 2, 5, 25 ve 50 µg/ml'lik; tigesiklin için ise 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dilüsyonları şeklinde günlük olarak hazırlandı ve pik alanları tayin edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi ve korelasyon katsayıları hesaplandı. Duyarlılık için hazırlanan vankomisin ve tigesiklin standartları, boş hücre örnekleriyle yüklendi. Kromatogram üzerinde sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olan konsantrasyon, "limit of detection" (LOD); 6 olan konsantrasyon, "limit of quantification" (LOQ) olarak tespit edildi.

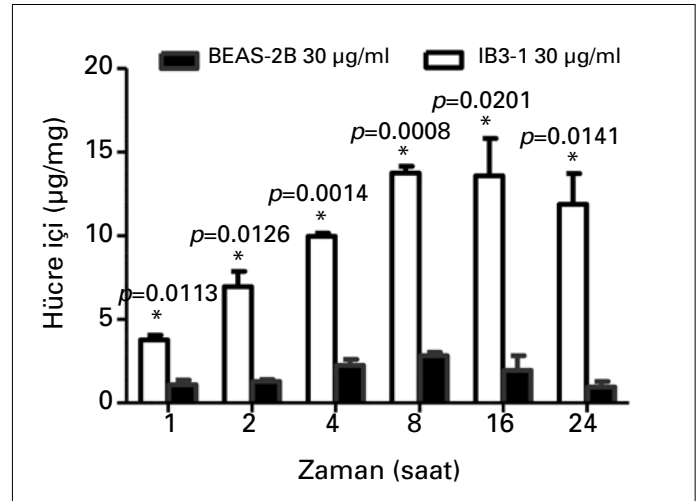
İstatistiksel Yöntemler: Farklı hücrelerdeki doz ve zaman farkları Graphpad Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) programı kullanılarak *t*-test yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular

HPLC analizi sonucunda hem tigesiklinin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi ve hesaplanan korelasyon katsayısı, hem de vankomisinin 2, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi ve hesaplanan korelasyon katsayısı belirlendi. Hücre üzerine sadece besiyeri konularak sıfır doz kullanıldığında kromatogramda pik gözlenmedi.

BEAS-2B ve IB3-1 hücrelerine uygulanmış tigesiklin ve vankomisin dozlarına ait kromatogramlarda elde edilen değerlerle hücre içindeki ilaç birikimi belirlendi.

Tigesiklinin 10, 30, 100 ve 300 µg/ml dozlarında IB3-1 hücrelerine girişi, normal BEAS-2B hücrelerinden anlamlı oranda yüksek bulundu. Antibiyotiklerin hücre içine giren mik-



Şekil 2. 30 µg/ml tigesiklinin IB3-1 ve BEAS-2B hücrelerinin içine farklı zamanlardaki giriş oranları.

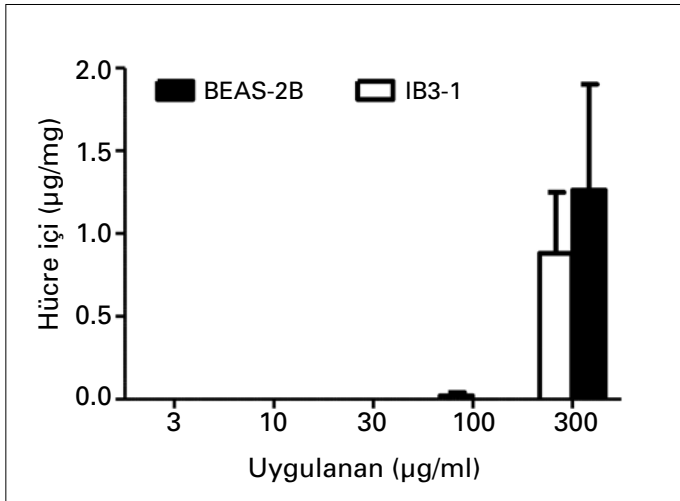
tarları, çalışmada kullanılan hücrelerin protein miktarlarının HPLC'de elde edilen konsantrasyonlarıyla 1 mg protein başına düşen miktarının oranlanmasıyla hesaplandı. Hücre içine giriş oranları ise uygulanan miktar, hücre içindeki miktara oranlanarak hesaplandı. Tigesiklinin KF hücreleri içine girişi 3 µg/ml için %22.43, 10 µg/ml için %25.79, 30 µg/ml için %36.20, 100 µg/ml için %33.09 ve 300 µg/ml için %18.30 iken; normal bronş epiteli içine girişi 3 µg/ml için %24.62, 10 µg/ml için %8.28, 30 µg/ml için %4.57, 100 µg/ml için %2.65 ve 300 µg/ml için %2.71 olarak bulundu. Buna göre 30 µg/ml'lik doz, MİK değerlerine yakın ve hücre içine optimal girişin olduğu doz olarak belirlendi (Şekil 1).

IB3-1 ve BEAS-2B hücreleri için yapılan doz çalışması sonucunda 30 µg/ml tigesiklinin IB3-1 hücrelerine 1, 2, 4, 8, 16 ve 24. saatteki girişinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. 30 µg/ml tigesiklin dozunun hücre içine giriş oranları, IB3-1 hücreleri için 1. saat için %12.57, 2. saat için %23.20, 4. saat için %33.23, 8. saat için %45.85, 16. saat için %45.29 ve 24. saat için %39.60 iken; BEAS-2B hücreleri için 1. saat için %3.64, 2. saat için %4.33, 4. saat için %7.51, 8. saat için %9.43, 16. saat için %6.55 ve 24. saat için %4.30 bulundu. IB3-1 hücrelerine en iyi giriş oranı 8. saatte tespit edildi (Şekil 2).

Vankomisinle yapılan doz çalışmalarında, CLSI (11) ve EUCAST (12) tarafından belirtilen MİK değerlerinin hücre içine girebilen miktarın çok üstünde olduğu ve vankomisin sadece 300 µg/ml verildiği zaman IB3-1 ve BEAS-2B hücrelerine girdiği; IB3-1 için %0.88, BEAS-2B için %1.26 gibi çok düşük oranda olduğu tespit edildi. Bu bulgularla vankomisin her iki hücreye girişinin yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiş olup zaman yanıt çalışması yapılmadı (Şekil 3).

İrdeleme

Sonuç olarak çalışmamızda tigesiklinin tüm dozlarla yapılan deneyler sonucunda 10, 30, 100 ve 300 µg/ml dozlarında KF hücrelerine girişi, normal hücreye girişinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Antibiyotik hücre içindeki miktarları uygulanan miktarlarla karşılaştırıldığında, KF hücreleri için 30 µg/ml, MİK değerlerine yakın ve hücre içine optimal girişin olduğu doz olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Farklı dozlarda vankomisinin IB3-1 ve BEAS-2B hücrelerinin içine giriş oranları.

IB3-1 ve BEAS hücresi için 30 µg/ml tigesiklin zaman yanıt çalışması sonucunda, IB3-1 hücresine en iyi giriş zamanı 8. saat olarak tespit edilmiştir. Bu doz önerilen MİK değerlerinin çok üstünde olmasına karşın, MİK değerlerine yakın 3 µg/ml dozunda da (%22.43) etkin hücre içi miktarı sağlanabilmektedir.

Vankomisinle yapılan doz çalışmalarında, CLSI (11) ve EUCAST (12) tarafından belirtilen MİK değerlerinin hücre içine girebilen miktarın çok üstünde olduğu ve hücre içine giren antibiyotiklerin çok düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Tedavide önemli bir konu da antibiyotiklerin doku içindeki konsantrasyonudur. O dokuda gelişen infeksiyonun etkeni olan mikroorganizma için MİK değerlerindeki antibiyotik uzun süreli maruz kalması da tedavinin başarısında önemli bir faktördür. Tigesiklinin ve vankomisinin akciğer dokusundaki birikme miktarları yönünden, tigesiklinin (36 saat) yarılanma ömrü vankomisininkinden (4-6 saat) uzundur (15,16).

KF'li hastalarda tedavilerin yetersiz olması ve alevlenmelerin sık olması nedeniyle sık kullanılan antibiyotiklerin farmakokinetikleri yoğun olarak araştırılmıştır (17). KF'li hastalarda antibiyotiklerin dokuda etkin MİK değerlerine ulaşması için sağlıklı insanlara kullanılan dozlardan daha yüksek dozda kullanılması gerektiği düşünülebilir. Ancak çeşitli antibiyotiklerle yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. KF'li hastalarda siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, seftazidim ve aminoglikozidlerin farmakokinetikleri değişkenlik gösterirken, imipenemin ve vankomisinin farmakokinetiklerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir (17,18). Burada KF epitelinin değişen yüzey yapısıyla antibiyotik kimyasal yapısı arasındaki ilişkinin bir rolü olabilir.

Tigesiklin şimdiki kadar KF'li popülasyonda araştırılmamıştır. Tigesiklinin, göreceli olarak düşük serum konsantrasyonuna karşılık, dağılım hacminin yüksek olması, dokulara nispeten yüksek bir penetrasyon göstermesini sağlar. Akciğerde plazmadakinin %300-400 katı konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (19). Bronkoskopik olarak yapılan farmakokinetik çalışmaları, tigesiklinin 6. saatteki epitel orten sıvıdaki konsantrasyonunun 0.37 + 0.36 mg/lit, alveoler hücre konsantrasyonunun ise 10.7 + 7.1 mg/lit olduğunu göstermiştir (18,20).

KF hastalarındaki akciğer infeksiyonlarında etkenin biyofilm oluşturma özelliğinin yüksek olmasından dolayı, antibiyotik direncinin katlanarak artması tedavide en önemli başarısızlık nedeni olarak değerlendirilmektedir (21,22). Biyofilm infeksiyonlarında tigesiklinin biyofilm eradikasyonu ve biyofilm altındaki mikroorganizmaların öldürülmesinde vankomisine oranla daha üstün olduğu gösterilmiştir (23). Tigesiklinin, KF'li hastalarda tanımladığımız bu etkinlikle birlikte biyofilm eradike edici etkinliği, tigesiklini dölal etkinliğe sahip ve KF'li hastalarda seçilmesi gereken bir antibiyotik konumuna taşımaktadır.

Çalışmamızda, tigesiklinin KF ve normal akciğer epiteline penetrasyonu vankomisine oranla daha yüksek bulunmuştur. KF hastalarında *S. aureus* gibi Gram-pozitif bakterilerin akciğer epitel hücrelerine adezyonu ve kolonizasyonunu önlemek için tigesiklinin vankomisine oranla daha başarılı olacağı öngörülebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, tigesiklinin KF hastalarının hayat kalitesini düşüren ve ölüme sebep olabilen infeksiyonların tedavisinde etkin ve başarılı olabileceğini düşündürmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

- Guggino WB. Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. *Nat Med.* 2001; 7(8): 888-9. [CrossRef]
- Verkman AS. Lung disease in cystic fibrosis: is airway surface liquid composition abnormal? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281(2): L306-8. [CrossRef]
- Matsui H, Grubb BR, Tarran R, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell.* 1998; 95(7): 1005-15. [CrossRef]
- Puchelle E, de Bentzmann S, Zahm JM. Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches. *Respiration.* 1995; 62(Suppl. 1): 2-12. [CrossRef]
- Accurso FJ, Sontag MK. Gene modifiers in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 2008; 118(3): 839-41. [CrossRef]
- Kristidis P, Bozon D, Corey M, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet.* 1992; 50(6): 1178-84.
- Savant AP, McColley SA. Cystic fibrosis year in review 2016. *Pediatr Pulmonol.* 2017; 52(8): 1092-102. [CrossRef]
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 194-222. [CrossRef]
- Tarran R, Grubb BR, Parsons D, et al. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell.* 2001; 8(1): 149-58. [CrossRef]
- Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest.* 1998; 102(6): 1125-31. [CrossRef]
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement.* CLSI Document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 6.0, Valid From 2016-01-01 [Internet]. Basel, Switzerland: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [erişim 1 Ocak 2018]. <http://www.eu>

- cast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.xls
13. Kitzman D, Cheng KJ, Fleckenstein L. HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 30(3): 801-13. [\[CrossRef\]](#)
 14. Li C, Sutherland CA, Nightingale CH, Nicolau DP. Quantitation of tigecycline, a novel glycylicycline [corrected] by liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 811(2): 225-9. [\[CrossRef\]](#)
 15. Estes KS, Derendorf H. Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin, and daptomycin. *Eur J Med Res.* 2010; 15(12): 533-43. [\[CrossRef\]](#)
 16. Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(6): 1221-9. [\[CrossRef\]](#)
 17. de Groot R, Smith AL. Antibiotic pharmacokinetics in cystic fibrosis. Differences and clinical significance. *Clin Pharmacokinet.* 1987; 13(4): 228-53. [\[CrossRef\]](#)
 18. Pleasants RA, Michalets EL, Williams DM, Samuelson WM, Rehm JR, Knowles MR. Pharmacokinetics of vancomycin in adult cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(1): 186-90. [\[CrossRef\]](#)
 19. Meagher AK, Ambrose PG, Grasela TH, Ellis-Grosse EJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline—a new glycylicycline antimicrobial agent. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 52(3): 165-71. [\[CrossRef\]](#)
 20. Parkins MD, Elborn JS. Newer antibacterial agents and their potential role in cystic fibrosis pulmonary exacerbation management. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(9): 1853-61. [\[CrossRef\]](#)
 21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-22. [\[CrossRef\]](#)
 22. Kirov SM, Webb JS, O'May CY, *et al.* Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology.* 2007; 153(Pt 10): 3264-74. [\[CrossRef\]](#)
 23. Ozturk B, Gunay N, Ertugrul BM, Sakarya S. Effects of vancomycin, daptomycin, and tigecycline on coagulase-negative staphylococcus biofilm and bacterial viability within biofilm: an in vitro biofilm model. *Can J Microbiol.* 2016; 62(9): 735-43 [\[CrossRef\]](#)