

ZİNNET YILMAZ

İSTANBUL ÜNİ. SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ
2012

İSTANBUL- İSTANBUL-2012

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ
ANTİBİYOTİKLERİN "QUORUM SENSİNG"E VE
VİRULANS FAKTÖRLERİ ÜRETİMİNE İNHİBİTÖR
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ZİNNET YILMAZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. ŞENGÜL DERBENTLİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

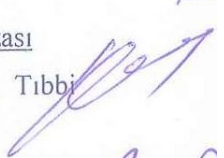
TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Zinnet Yılmaz tarafından hazırlanan "KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN "QUORUM SENSİNG"E VE VİRULANS FAKTÖRLERİ ÜRETİMİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

30 / 05 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

- 1.Prof.Dr.Bülent Gürler (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 2.Prof.Dr.Şengül Derbentli (Tez Danışmanı) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 3.Prof.Dr.Dilek Yaylalı (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı 
- 4.Prof.Dr.Yıldız Yeğenoğlu (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 5.Doç.Dr.Özden Boral (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde; çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ZİNNET YILMAZ

İTHAF

Aileme ve Turgay Kılıç' a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerinden faydalanma imkanı bulduğum, hayata yaklaşımıyla da bana örnek olan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen ve her seferinde danışmanım olduğu için minnettar olacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli' ye,

Eğitimim boyunca engin bilgilerinden yararlandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gürler ve değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya, Sayın Prof. Dr. Selim Badur, Sayın Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Sayın Prof. Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen, Sayın Prof. Dr. M. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Y. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan, Sayın Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral ve Sayın Doç. Dr. Zerrin Aktaş'a,

İstatistiksel değerlendirmelerin yapılmasında değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Y.Doç. Dr. Penbe Çağatay' a,

En meşgul anlarında bile bana vakit ayırıp, bilgileriyle destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Dr.Yaşar Nakipoğlu' na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, çok sevdiğim Dr. Sabiha Güner' e,

Yoğun iş temposuna rağmen en sıkışık anlarında bile, bize yardımlarıyla destek olan, eksiklerimiz varsa tamamlayan besiyeri laboratuvarımızın vazgeçilmezi Mukaddes Ünsal' a,

Aynı alanda çalıştığımız, beraber vakit geçirdiğimiz tüm doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Yıllardır her türlü kahrımı çeken, acı tatlı her anımda yanımda olan dostlarım Seher Şanslı ve Kasım Karşıl' a, aramızda mesafeler olmasına rağmen bana destek olmaya çalışan canım arkadaşım Serpil Kapusuz' a, yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü fotokopi, çıktı, kalem, defter vs. sponsorum biricik kuzenim Metin Dalkılıç' a,

Eğitim hayatım boyunca benden yardımlarını, desteğini, sabrını hiç esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve inanan, her türlü sevincimi, üzüntümü paylaştığım, sıkıntıları beraber göğüslediğim ve her zaman hayatımda yer alacak olan Turgay Kılıç' a,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, desteklerini hiç üstümden eksik etmeyen babam Rahmi Yılmaz ve annem Havva Yılmaz' a, şu an çok uzaklarda olup tezimin bitmesiyle beraber onun gelmesine de gün saydığım canım kardeşim Fatih Yılmaz' a, “Abla doğduğum günden beri okuyorsun” deyip beni her seferinde güldüren ve maçlarına gidip stres attığım yakışıklı kardeşim Oğuz Yılmaz' a, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 16706

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa'</i> nın Genel Özellikleri	3
2.2. Laboratuvar Tanısı.....	3
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa'</i> nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	4
2.4. Virulans Faktörleri.....	5
2.4.1. Bakteri Yüzeyi İle İlişkili Virulans Faktörleri.....	5
2.4.1.1. Kirpik.....	5
2.4.1.2. Pili (Fimbriya).....	7
2.4.2. Hücre Dışına Salgılanan Virulans Faktörleri.....	7
2.4.2.1. Proteaz.....	7
2.4.2.2. Biyofilm.....	8
3. "QUORUM SENSING" (ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA).....	9
3.1. "Quorum Sensing" Sisteminde Yer Alan Sinyal Molekülleri.....	10
3.2. "Quorum Sensing" Sistemleri.....	12
3.2.1. LasI / LasR Sistemi.....	12
3.2.2. RhlI / RhlR Sistemi.....	12
3.2.3. <i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyal (PQS) Sistemi.....	13
3.3. "Quorum Sensing" İnhibisyonu.....	14
3.3.1. "Quorum Sensing" Sinyal Molekülünün Üretiminin Engellenmesi.....	15

3.3.2. "Quorum Sensing" Sinyal Molekülünün Yıkılması veya İnhibisyonu.....	15
3.3.3. "Quorum Sensing" Sinyal Molekülünün Alınmasının Önlenmesi.....	15
3.4. "Quorum Sensing" Mekanizmasını Engellleyen Doğal Bileşikler.....	16
4. <i>P.AERUGINOSA</i> SUŞLARINDA ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ.....	17
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
5.1. Gereçler.....	20
5.1.1. Bakteri Suşları.....	20
5.1.2. Besiyerleri.....	22
5.1.2.1. Luria Bertani (LB) Agar.....	22
5.1.2.2. Açıl Homoserin Lakton (AHL) Besiyeri.....	22
5.1.2.3 Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon-Skim Milk Agar (BHISMA).....	23
5.1.2.4. Kongo Red Agar.....	23
5.1.2.5. "Swimming" (Yüzme) Besiyeri.....	24
5.1.2.6. "Swarming" (Kayma) Besiyeri	24
5.1.2.7. "Twitching" (Titreme) Besiyeri	25
5.2. Yöntemler.....	25
5.2.1. Suşların Toplanması, Tanımlanması ve Muhafaza Edilmesi.....	25
5.2.2. AHL (Açıl Homoserin Lakton) Moleküllerinin Saptanması.....	25
5.2.3. Proteaz Enziminin Üretiminin Belirlenmesi.....	26
5.2.4. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi.....	26
5.2.5. "Swimming" (Yüzme) Testi.....	26
5.2.6. "Swarming" (Kayma) Testi.....	27
5.2.7. "Twitching" (Titreme) Testi.....	27
5.2.8. Antibiyotiklerin "Quorum Sensing" ve Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Aktivitesinin İncelenmesi.....	27
5.2.8.1. Kolistin ve Sefepimin İncelenen Suşlar İçin MİK ve SubMİK' lerinin Belirlenmesi.....	28
5.2.8.2. Kolistinin İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması.....	28
5.2.8.3. Sefepimin İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması.....	28
5.2.9. İstatistiksel Analiz.....	28
6. BULGULAR.....	30
6.1. Kolistin ve Sefepimin AHL Molekülleri ve Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Etkisinin Araştırılması.....	32

6.1.1. Antibiyotiklerin <i>P.aeruginosa</i> Suşları İçin Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenen MİK ve SubMİK Değerleri.....	32
6.1.2. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarında Kolistin ve Sefepimin Proteaz Enzimi Üretimine Etkisi.....	34
6.1.3. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarında Kolistin ve Sefepimin "Swimming" (Yüzme) Hareketine Etkisi.....	37
6.1.4. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarında Kolistin ve Sefepimin "Swarming" (Kayma) Hareketine Etkisi.....	39
6.1.5. <i>P.aeruginosa</i> Suşlarında Kolistin ve Sefepimin "Twitching" (Titreme) Hareketine Etkisi.....	41
7. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	54
ETİK KURUL KARARI	65
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>P.aeruginosa</i> ’nın oluşturduğu enfeksiyonlar.....	4
Tablo 2-2: <i>P.aeruginosa</i> ’da bulunabilen virulans faktörleri.....	6
Tablo 5-1: Çalışma kapsamına alınan <i>P.aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği klinik örnekler.....	21
Tablo 6-1: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında (n:120) incelenen AHL ve beş ayrı virulans faktörü yönünden pozitif bulunan suş sayı ve oranları.....	30
Tablo 6-2: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında (n:120) AHL moleküllerinin varlığı ile incelenen virulans faktörlerinin varlığı arasındaki ilişki.....	31
Tablo 6-3: İncelenen <i>P.aeruginosa</i> suşları (n:42) için kolistin MİK değerleri.....	33
Tablo 6-4: İncelenen <i>P.aeruginosa</i> suşları (n:42) için sefepimin MİK değerleri.....	33
Tablo 6-5: İncelenen <i>P.aeruginosa</i> suşlarında (n:120) proteaz üretimi ve proteoliz oranı sonuçları.....	35
Tablo 6-6: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında kolistin ve sefepimin proteolitik aktivite üzerine etkisi.....	36
Tablo 6-7: <i>P.aeruginosa</i> suşlarının üç farklı ortamda belirlenen proteoliz oranlarının Kruskal-Wallis Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	37
Tablo 6-8: “Swimming” (yüzme) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.....	38
Tablo 6-9: “Swarming” (kayma) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.....	40
Tablo 6-10: <i>P.aeruginosa</i> suşlarındaki “twitching” (titreme) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>P.aeruginosa</i> 'da bulunabilen virulans faktörleri.....	5
Şekil 2-2: Biyofilm oluşumu.....	8
Şekil 3-1: <i>P.aeruginosa</i> ' da bulunan sinyal molekülleri (A. C12-HSL, B. C4-HSL, C. PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon)).....	11
Şekil 3-2: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında bulunan Las ve Rhl QS sistemi mekanizmaları.....	13
Şekil 3-3: PQS sinyal molekülü ve 4-kinolonların temel yapısı.....	14
Şekil 3-4: QS sistemlerine karşı sinyal engelleme mekanizmalarına örnekler.....	16
Şekil 6-1: AHL molekülleri varlığı araştırılan <i>P.aeruginosa</i> suşlarında negatif ve pozitif deney sonuçları (Soldaki kültür negatif, sağdaki kültür pozitif).....	31
Şekil 6-2: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında biyofilm üretimi (117 numaralı kültür pozitif; 118, 119 ve 120 numaralı kültürler negatif).....	32
Şekil 6-3: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında proteaz aktivitesinin belirlenme sonuçları (6 ve 15 numaralı kültürler proteaz pozitif, 4 numaralı kültür proteaz negatif).....	34
Şekil 6-4: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında “swimming” (yüzme) hareketi (2 ve 70 numaralı kültürler pozitif, 50 numaralı kültür negatif).....	38
Şekil 6-5: <i>P.aeruginosa</i> suşlarından “swimming” (yüzme) hareketi ve antibiyotiklerle inhibisyonu (86 numaralı kültür antibiyotiksiz ortamda-pozitif, 79 numaralı kültür sefepimli ortamda-negatif, 115 numaralı kültür kolistinli ortamda-pozitif).....	39
Şekil 6-6: <i>P.aeruginosa</i> suşlarında “swarming” (kayma) hareketi (19 ve 98 numaralı kültürler pozitif, 96 numaralı kültür negatif).....	39
Şekil 6-7: İncelenen <i>P.aeruginosa</i> suşlarından 31 numaralı kültür. Soldan sağa: Antibiyotiksiz ortamda “swarming” (kayma) hareketi, sefepim varlığında kayma hareketinin inhibisyonu, kolistin varlığında kayma hareketinde inhibisyon yok.....	40

Şekil 6-8: *P.aeruginosa* suşlarında “twitching” (titreme) hareketi (23 ve 46 numaralı kültürler pozitif, 109 numaralı kültür negatif).....41

Şekil 6-9: İncelenen *P.aeruginosa* suşlarından 109 numaralı kültür. Soldan sağa: Antibiyotiksiz ortamda “twitching” (titreme) hareketi, sefepim varlığında ve kolistin varlığında “twitching” (titreme) hareketinin inhibisyonu.....42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

QS	Quorum Sensing
AI	Otoindükleyici
QSSM	Quorum Sensing Sinyal Molekülü
AHL	Açıl Homoserin Lakton
HSL	Homoserin Lakton
3-oxo-C12-HSL	N-3-oksododekanol-homoserin lakton
C4-HSL	N-bütiril-homoserin lakton
PQS	Pseudomonas kinolon Sinyal
SAM	S-adenozil metiyonin
TSA	Triptik Soy Agar
LB	Luria Bertani
µg	mikrogram
ml	mililitre
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid
BHIB	Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon
BHISMA	Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon-Skim Milk Agar
Rp	Proteoliz oranı
Dzc	Berrak zon çapı
Dc	Bakteri koloni çapı
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
SubMİK	Subinhibitör Konsantrasyon
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Swi	Swimming
Swa	Swarming
Twı	Twitching
TCP	Tissue Culture Method
TM	Tüp Metodu
CRA	Kongo Red Agar

ÖZET

Yılmaz, Z. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Çeşitli Antibiyotiklerin "Quorum Sensing"e Ve Virulans Faktörleri Üretimine İnhibitör Etkisinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2012.

Prokaryot organizmalar birbirleriyle sözcükler yerine kimyasal bir dil kullanarak iletişim kurmaktadır. Sinyal moleküllerinin kullanılması ile mikroorganizmalar çeşitli fonksiyonlarını popülasyon yoğunluklarına göre düzenleyebilmektedir. Bu olay "Quorum Sensing (QS)" olarak adlandırılır.

Günümüzdeki biyoteknolojik araştırmalar QS sistemlerinde iletişimi sağlayan ve patogenezin düzenlenmesinde rol oynayan moleküllerin tanımlanmasına odaklanmaktadır. Gelecekte tasarlanacak antibakteriyel tedavi yöntemlerinde, etkinliği kanıtlanmış QS inhibitörü maddelerin tek başına ya da antimikrobiyal maddelerle kombine edilerek kullanılması ve bu yolla bir taraftan enfeksiyon etkeni bakteriler üzerinde bakteriyostatik veya bakterisit etki yaratılırken, diğer taraftan etken bakterinin sahip olduğu virulans faktörleri üretimi inhibe edilerek tedavi başarı oranının artırılması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada; çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında QS sisteminde sinyal molekülleri olarak rol oynayan Açıl Homoserin Lakton (AHL) üretimi ve bazı virulans faktörlerinin (biyofilm, proteaz, swimming, swarming ve twitching hareketleri) üretimi araştırıldıktan sonra sefepim ve kolistin QS' e ve virulans faktörleri üretimine inhibitör etki oluşturup oluşturmadığı fenotipik olarak araştırılmıştır. İncelenen *P.aeruginosa* suşlarının (n:120) % 75' inin AHL, % 1,6' sının biyofilm, % 63,3' ünün proteaz ürettiği belirlenmiştir. Aynı suşlarda "swimming" "swarming" ve "twitching" hareketi pozitiflik oranları sırasıyla % 97,5, % 68,3, % 55 olarak saptanmıştır.

Kolistin ve sefepimin proteaz üretimini antibiyotiksiz besiyerine göre; sefepimin proteaz inhibitör etkisinin kolistine göre daha yüksek ve aradaki farkın istatistiksel yönden ileri derecede anlamlı ($p<0,001$) olduğu saptanmıştır. "Swimming" ve "twitching" hareketine inhibitör etkinin; sefepimde kolistine göre daha güçlü olduğu (sırasıyla $p<0,040$, $p<0,005$), "swarming" hareketine ise; her iki antibiyotiğin eşit inhibitör etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Sonuçlarımız; özellikle sefepim olmak üzere, denenen her iki antibiyotiğin subinhibitör konsantrasyonlarında çalışmada incelenen virulans faktörlerini atenuë edebildiği ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde bu antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarda bakterisit etkili başka antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing, Virulans faktörleri, Antibiyotikler, Antibiyoterapi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 16706

ABSTRACT

Yılmaz, Z. Determination of the inhibitory efficacy of different antibiotics on Quorum Sensing and production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. Istanbul University, Institute of Health Science, Medical Microbiology Department. Master's Thesis. Istanbul, 2012.

Prokaryotic organisms communicate with each other using chemical language instead of words. According to the population densities, microorganisms can arrange their various functions by using signal molecules. This event is called “quorum sensing (QS)”.

Today, biotechnological researches focus on the description of molecules which play a role in providing communication in QS systems and regulating of the pathogenesis. In the future, when antibacterial treatment methods are designed, it is important to use of QS inhibitor substances proven activity alone or in combination with antimicrobial substances. In this way, aimed to create bacteriostatic or bactericidal effect on the causative agent, on the other hand, inhibiting the production of virulence factors of the bacteria, therefore, an increasing the success rate of the treatment.

In this study, production of acyl homoserine lactone (AHL) which plays as “a signal molecules” in QS system, and production of some virulence factors (such as biofilms, protease, and swimming, swarming, twitching motility) were investigated in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical samples. Followed by the investigation of the inhibitor efficacy of cefepime and colistin phenotypically on QS and production of virulence factors. It was determined that from a total of 120 *P.aeruginosa* strains, 75% were AHL, 1.6% formed biofilms; and 63.3% were produced protease. Swimming, swarming and twitching motility were found to be positive in 97.5%, 68.3%, and 55%, of the strains respectively.

The production of protease in colistin and cefepime-containing media comparing with media free antibiotics were analysed and it was detected that the protease inhibitory effect of cefepime was higher than the colistin and this difference was statistically highly significant ($p<0,001$). The inhibitory effect of cefepime was more stronger than of colistin on swimming and twitching motility ($p<0,040$, and $p<0,005$, respectively). The inhibitory effect of both antibiotics on swarming motility was same. Our results showed that; subinhibitory concentration (subMIC) of both tested antibiotics particularly cefepime, had an attenuate effect on virulence factors, therefore, combining of subMIC of these antibiotics with other bactericidal antibiotics could be useful in the treatment of *P.aeruginosa* related infections.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing, Virulence factors, Antibiotics, Antibiotherapy.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 16706

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteriler kendi çoğunluğunu (nüfusunu) izlemek ve virulans faktörlerini eksprese etmek için kimyasal bir dil geliştirmişlerdir. Bu dile “Quorum Sensing” (QS) ve buna aracılık eden moleküllere de sinyal molekülleri adı verilir.

Birçok gram pozitif ve negatif bakteri birbirleri ile farklı sinyal molekülleri aracılığı ile iletişim kurmaktadır. Bu sinyal moleküllerini üretmekle birlikte, bu moleküllerin konsantrasyonunu algılayarak bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılmakta ve bu sayede ortamda, hücre sayısındaki değişikliğe cevap olarak gen ekspresyonunun kontrolünü sağlamaktadır.

Pseudomonas aeruginosa’nın virulans mekanizmaları da sinyal moleküllerinin üretimi ile QS sistemleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle *P.aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi ile virulans faktörlerinin sentezlenmesi yani patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi genel olarak bakteri üremesinin engellenmesi veya bakterinin öldürülmesine dayanmaktadır. Ancak hızla gelişen antibiyotik direnci bazen bu süreci başarısız kılabilir. Bakteriyel virulansı düzenleyen QS sistemlerinin keşfi, enfeksiyon etkeni bakterinin kontrolü için yeni bir fırsat sağlamaktadır. QS sistemi inhibe edilerek bakterilerin birbirleriyle iletişimi ve virulans faktörlerini üretmesi önlenir. Bu faktörlerin çoğunun bakteriler için özgül olması ve konak organizmada bulunmayışı tedavinin özgüllüğünü sağlayabilecektir. QS’ in engellenmesi yeni antimikrobiyal tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde yararlanılacak bir süreçtir (1).

Bir yandan gelişen antibiyotik direnci, diğer taraftan yeni geliştirilen antibiyotik sayısındaki azalma tedavide önemli bir sorun oluşturmaktadır. Yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar arasında, QS henüz klinik kullanıma alınmamış olsa da, gelecek için umut vaat etmektedir. “Quorum Sensing” ile ilgili çalışmaların yeni ve önemli bir antibiyoterapi alanı oluşturacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı; seçilmiş olan iki antibiyotiğin (kolistin ve sefepim) *P.aeruginosa* suşlarındaki QS sistemine ve çeşitli virulans faktörlerinin üretimine inhibitör etkisinin bulunup bulunmadığını belirlemek ve virulansı doğrudan hedef alan

antimikrobiyal tedavilerde *P.aeruginosa* suşlarını atenuë etmek üzere kullanılabirliklerini saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın genel özellikleri

Pseudomonadaceae ailesinde yer alan *Pseudomonas* cinsinde; düz veya hafif kıvrımlı, sporsuz, aerop, 0,5 – 1 µm eninde 1,5 – 5,0 µm uzunluğunda gram negatif çomak şeklinde, hareketli bakteriler bulunur. Bu bakteriler toprak, su, bitki ve hayvanlarda bulunduklarından kozmopolittirler. Son oksijen alıcısının oksijen olduğu zorunlu aerop solunuma dayalı bir metabolizmaları vardır. Bu cinste yer alan türlerden biri olan *P.aeruginosa*, klinik örneklerden en sık izole edilen non-fermentatif gram negatif çomaktır. Hareketli bir bakteri olup, bir uçta tek kirpik taşır (2).

Pseudomonas cinsi rRNA homologilerine göre floresan ve non-floresan gruba ayrılır. Floresan grupta yer alan *Pseudomonas*'lar piyoverdin (floresein) olarak isimlendirilen, suda çözünen, sarı-yeşil veya sarı-kahverengi, kısa dalga boylu bir pigment oluştururlar. *P.aeruginosa* suşlarının çoğu, piyoverdine ek olarak mavi bir pigment olan piyosiyenin üretirler. Piyoverdin suda çözünen mavi renkli bir pigment olan piyosiyenin ile birleştiğinde *P.aeruginosa* için karakteristik olan parlak mavi-yeşil rengi oluşturur. Bu tür ayrıca piyorubin (kırmızı) veya piyomelanin (kahverengi-siyah) gibi suda çözünen başka pigmentleri de üretebilir.

2.2. Laboratuvar tanısı

Pseudomonas aeruginosa suşları genellikle besiyerine yayılan pigmentleri ve kokularıyla tanınırlar. Klinik örneklerden izolasyonu için Kanlı agar, Çukulata agar ve MacConkey agar gibi katı besiyerleri kullanılır. Optimal üreme sıcaklığı 37⁰ C' dir. Kanlı agarda hemoliz yaparlar ve genellikle beta hemolitiktirler. MacConkey agarda laktoz negatif kolonilerin oluşması, üreme ortamında mavi-yeşil pigment olması ve ekşi meyve kokusu *Pseudomonas* türlerini düşündüren tipik özelliklerdir.

P.aeruginosa 42⁰C' de üreyebilme özelliği ile klinik önemi olan diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılır. Ayrıca oksidaz ve katalaz özellikleri pozitifdir (2-4).

2.3. *P.aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar

P.aeruginosa fırsatçı bir patojendir. Konak savunması tam olan sağlıklı bireyler ciddi *P.aeruginosa* enfeksiyonları açısından bir risk altında değil iken, kanda bulunan nötrofil sayısı ciddi boyutta düşük olan bireyler invazif enfeksiyonlar açısından risk altındadır (2, 5, 6). Özellikle hastanede yatan ve immun sistemi çeşitli nedenlerle zayıflamış olan hastalarda; pnömoni, bakteriyemi, yanık enfeksiyonları, menenjit, beyin absesi, endokardit, septik artrit, osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi klinik tablolara neden olmaktadır. Ayrıca göz, solunum sistemi, üriner ve gastrointestinal sistem enfeksiyonu etkeni de olabilmektedir. Özellikle kistik fibrozlu hastalarda *P.aeruginosa* ciddi alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. *P.aeruginosa* hastane enfeksiyonları etkenleri içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. *P.aeruginosa* suşlarının etken olduğu enfeksiyonlar ve hazırlayıcı faktörler Tablo 2-1'de gösterilmiştir. Bu enfeksiyonlarda en önemli sorunlar çoğul antimikrobiyal direnci ile, mortalite ve morbiditenin yüksek olmasıdır (7, 8).

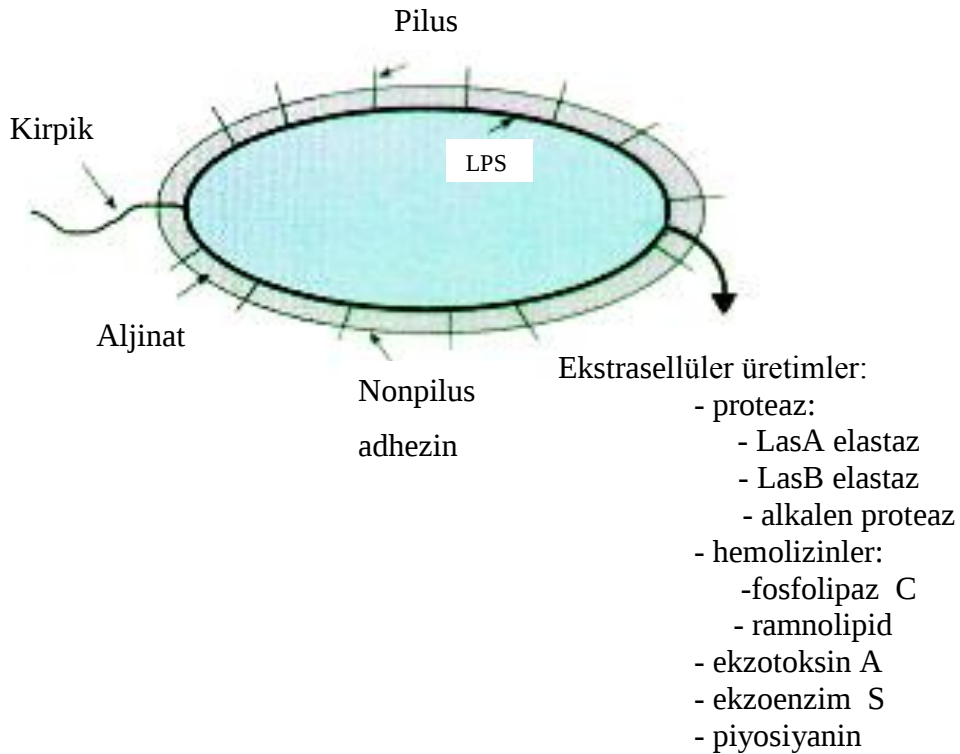
Tablo 2-1: *P.aeruginosa*'nın oluşturduğu enfeksiyonlar.

Enfeksiyonlar	Hazırlayıcı Faktörler
Solunum yolu enfeksiyonları	Mekanik ventilasyon, endotrakeal tüp, trakeostomi tüpü, nazogastrik tüp
Bakteremi	Kemoterapi, malign hematolojik hastalıklar, kalp kapağı protezi, damar içi uyuşturucu kullanımı
Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	Yanıklar, travma, dermatit, kontamine banyo ve kaplıcalar
İdrar yolu enfeksiyonları	Kateterizasyon, instrumentasyon, böbrek transplantasyonu
Göz enfeksiyonları	Travma, kontakt lens, tropikal steroid, kontamine göz damlası, koma
Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları	Travma ve cerrahi uygulamalar
Kemik ve eklem enfeksiyonları	Direkt inokülasyon, kontajiyöz yayılım veya uzaktan hematogen yayılım
Kulak enfeksiyonları	Kronik hastalıklar, kontamine sularda yüzme

2.4. Virulans faktörleri

Bir fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa* konak savunmasının bozulduğu durumlarda sahip olduğu çeşitli virulans faktörlerini kullanarak enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *P.aeruginosa* suşlarında bulunan virulans faktörleri bakteri yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri ve hücre dışına salgılanan virulans faktörleri olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (Tablo 2-2, Şekil 2-1) (9-12).

P.aeruginosa'nın virulans mekanizmaları sinyal molekülleri aracılığı ile QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle *P.aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi, virulans faktörlerinin üretilmesi yani patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır.



Şekil 2-1: *P.aeruginosa*'da bulunabilen virulans faktörleri (12).

Tablo 2-2: *P.aeruginosa*'da bulunabilen virulans faktörleri.

Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virulans Faktörleri	Hücre Dışına Salgılanan Virulans Faktörleri
Kirpik	Proteaz
Pili (Fimbriya)	Elastaz
Lipopolisakkarit (LPS)	Piyosiyanin
Aljinat	Ramnolipid
	Fosfolipaz C
	Ekzotoksin A
	Sitotoksin

2.4.1. Bakteri Yüzeyi İle İlişkili Virulans Faktörleri

P.aeruginosa hücre yüzeyi ile ilişkili bir takım virulans faktörlerine sahiptir ve bunlar kolonizasyonda önemli rol oynar. Bu faktörler kirpik, pili (fimbriya), lipopolisakkarit (endotoksin) ve aljinatdır.

2.4.1.1. Kirpik

Kirpik hareket organelidir. Protein yapıda, sitoplazmadan köken alan uzantılardır. Hareketli bakteriler kirpikleri sayesinde besin kaynaklarının olduğu bölgeye daha kolay gidebilirler.

Kirpik, *P.aeruginosa*' da “swimming” (yüzme) ve “swarming” (kayma) şeklindeki hareketleri sağlar. “Swimming” (yüzme) ve “swarming” (kayma) hareketleri *P.aeruginosa*'nın sahip olduğu QS sistemi ile kontrol edilmektedir. Ayrıca

P.aeruginosa enfeksiyonun başlangıç aşamasındaki aderans ve kolonizasyon için de kirpiğini kullanır (9, 13).

2.4.1.2. Pili (Fimbriya)

Pili; bakterinin kısa, filamentöz, ekstrasellüler yüzey yapılarıdır. Pili, *pilA* geni tarafından kodlanır. 15-18 kDa' luk homopolimerlerden oluşan uzun polar filamentlerdir. Pilin adı verilen protein ünitelerinin birleşmesiyle meydana gelir. Pilinler yaklaşık 5.2 nm çapındadır ve ortalama 2,5 mm uzunluğundadır.

P.aeruginosa' da bulunan Tip IV pili, titreme olarak adlandırılan “twitching” hareketini sağlar. “Twitching” (titreme) hareketi QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Tip IV pili, kolonizasyon sırasında konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak patogeneizde de önemli rol oynar (14 - 16).

2.4.2. Hücre Dışına Salgılanan Virulans Faktörleri

P.aeruginosa çok sayıda salgı sistemine sahiptir. Bu sistemler sayesinde hücre dışına salgıladığı virulans faktörleri, bakterinin çevreye adaptasyonunda ve patojenliğinde oldukça yarar sağlar (9).

2.4.2.1. Proteaz

P.aeruginosa çok sayıda hücre dışı proteaz üretmektedir. Elastaz ve alkalin proteaz bu proteazlar arasında en çok öne çıkanlardır. Alkalin proteaz akut enfeksiyon sürecinde ve *P.aeruginosa*' nın neden olduğu doku hasarında önemli rol oynamaktadır (12, 17). Elastaz; elastaz A ve elastaz B olmak üzere iki formda bulunur ve elastini parçalayabilen enzimdir. *P.aeruginosa*' nın ürettiği proteazlar, bakteri ve konak arasındaki patojenik etkileşimde de önemli etkinlik sağlar (7, 17, 18).

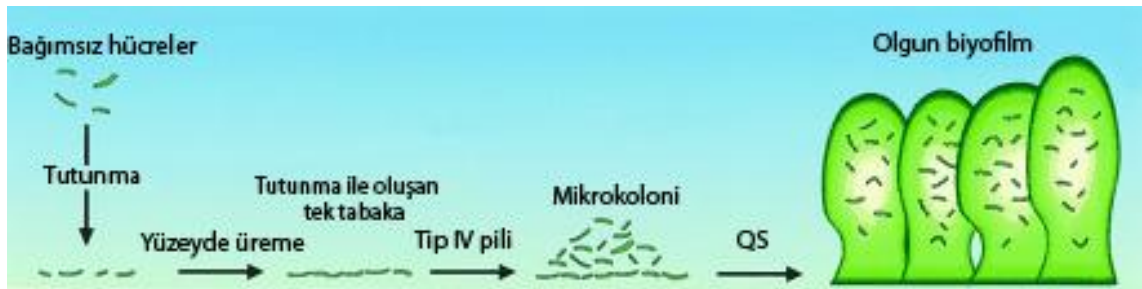
2.4.2.2. Biyofilm

Biyofilmler mikroorganizmaların bir araya gelmesi ile oluşan ve kendini oluşturan hücreleri dış faktörlerden koruyan dinamik bir yapıdır. Biyofilm bakterilerin uygun olmayan ortamlarda üremelerini ve hayatta kalmasını sağlar. Biyofilm oluşumunun başlangıç basamağında *P.aeruginosa* yüzeye tutunmak ve yayılmak için

kirpiğini kullanır. Biyofilm yüzeye tutunma, mikrokoloni oluşturma, hücre dışı polisakkarit moleküllerini üretme, olgunlaşma ve yayılma ile meydana gelir. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar besin eksikliğine, pH değişimlerine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (5, 19, 20).

Bir bakteri canlı kalabilmek için çevreye uyum sağlar ve çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirir (21, 22). Mikroorganizmalar biyofilm içinde çoğaldıklarında aralarında iletişim kurarak tek başına yapmaları mümkün olmayan ve çok sayıda hücrenin yapabildiği davranışlar sergilerler. Bu aşamada QS mekanizması devreye girer (Şekil 2-2).

Bakteri biyofilm oluşumu, hücreden hücreye iletişimi sağlayan sinyal molekülleri aracılığıyla kontrol edilmektedir. Bu sinyal sistemi QS olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm oluşumunda las sistemi merkezi rol oynar (4, 23 - 25).



Şekil 2-2: Biyofilm oluşumu (5).

3. “QUORUM SENSING” (ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA)

Prokaryot organizmalar birbirleriyle sözcükler yerine kimyasal bir dil (kimyasal sinyal molekülleri) kullanarak iletişim kurmaktadır. Bu moleküllerin kullanılması ile mikroorganizmalar çeşitli fonksiyonlarını populasyon yoğunluklarına göre düzenleyebilmektedir. Bu olay “quorum sensing (QS)” olarak adlandırılmaktadır. “Quorum” Latince kökenli olup, çoğunluk anlamına gelmektedir. “Quorum sensing” de çoğunluğu algılama olarak ifade edilmektedir. QS; bakterilerin konak üzerinde kendi kritik populasyon yoğunluklarını algılayarak bazı virulans genlerinin ekspresyonunu ve sonuç olarak bu genlerin ürünü olan virulans faktörlerinin sentez edilmesini sağlar (5, 26).

Çoğunluğu algılama sistemleri ilk kez 1970’li yıllarda iki lüminesan (ışık yayan) deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*’ de ortaya konmuş ve tanımlanmıştır. Daha sonra 1990’ların başında karbapenem antibiyotik üretemeyen bir bakteri olan *Erwinia carotovora*’nın farklı bir mutant bakteri grubu ile birlikte olduğunda diğer bakteri tarafından sağlanan sinyal molekülü sayesinde antibiyotik sentez etmeye başladığı gösterilmiştir (27). İlerleyen yıllarda *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* gibi bakteri türlerinde, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi mantar türlerinde çeşitli QS sistemleri tanımlanmıştır (24, 28, 29).

Mikroorganizmaların birbirleri ile eşgüdüm içinde davranmaları, çevresel koşullardaki değişmelere çabuk cevap vermelerini ve uyum göstermelerini sağlar. Mevcut besin maddelerinin kullanılmasında yarıştıkları mikroorganizmalara karşı avantaj sağlarlar. Buna ek olarak toksik bileşiklerden korunurlar, biyofilm oluştururlar, antibiyotik üretebilirler, sporulasyona geçebilirler ve çeşitli virulans faktörlerini üretebilirler (30).

3.1. “Quorum Sensing” Sisteminde Yer Alan Sinyal Molekülleri

Bakterilerin iletişimi için her bir tür, birden fazla kimyasal sinyal molekülü kullanmaktadır. Bu sinyal moleküllerine otoindükleyici (AI) adı verilmektedir. Bu moleküllerin otoindükleyici olarak ifade edilmelerinin nedeni; üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir. Belli bir ortamdaki otoindükleyici yoğunluğu o ortamda bulunan bakteri sayısı ile doğru orantılıdır (31, 32).

QS mekanizmasının temel mantığı, bir bakteri hücresinde herhangi bir metabolik değişimin ancak aynı tür bakteriler ortamda yeterli yoğunlukta olduklarında bakteriye yarar sağlamasıdır. Bakteriler üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da virulans faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir (31).

Bakteri popülasyonlarında, hücresel metabolitler ve QS sinyal moleküllerinin (QSSM) ayırt edilmesi güçtür. Gerçek bir QSSM’ leri bir metabolitten ayırdettiren başlıca özellikler şunlardır:

- QSSM’ nin üretimi üremenin değişik basamaklarında, özel fizyolojik koşullar altında veya çevresel değişikliklere cevap olarak ortaya çıkar.
- QSSM ekstrasellüler olarak birikir ve özgül reseptörler tarafından algılanır.
- QSSM’ lerin yoğunluğu kritik bir eşik değerine ulaştığında planlanmış bir yanıt ortaya çıkar.
- Bakteri hücrelerinin yanıtı; QSSM’ nin metabolize veya detoksifiye edilmesi gereken fizyolojik değişimlerin ötesinde bir olaydır.

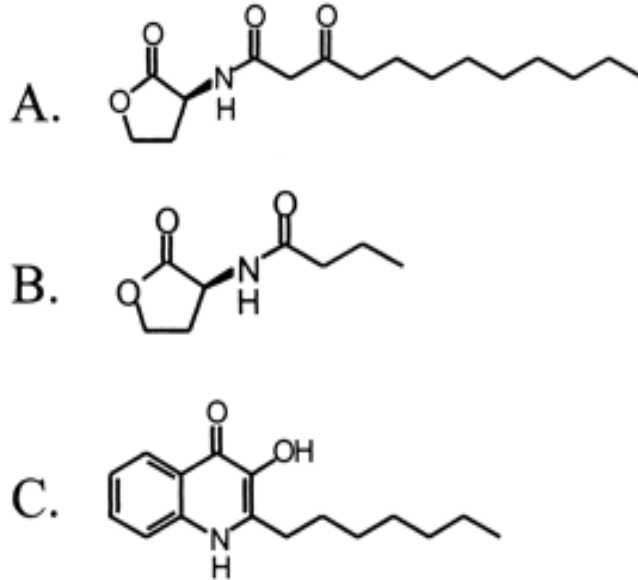
Bu dört özellikten ilk üçünü birçok metabolit de gösterirken, dördüncü özellik bir QS molekülünün mutlaka taşıması gereken bir özelliktir (33).

QS sisteminde kullanılan sinyal molekülleri türden türe değişmektedir ve bu moleküller üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

- Açıl-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) türevleri,
- Küçük peptitler,
- Furanosil Borat Diester’ dir (22, 34).

AHL sinyal molekülleri gram negatif bakteriler tarafından kullanılır. Küçük peptit sinyal molekülleri ise gram pozitif bakteriler tarafından kullanılır. Furanosil borat diester ise bazı gram negatif veya gram pozitif bakteriler tarafından kullanılmaktadır (29, 34).

P.aeruginosa tarafından kullanılan QS sistemlerinde üretilen 3-oxo-C12-HSL ve C4-HSL sinyal molekülleri AHL sinyal molekülleri grubunda yer almaktadır. Bir de bu sinyal moleküllerinin dışında hiçbir gruba dahil olmayan PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) sinyal molekülü *P.aeruginosa*' ya özgüdür (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: *P.aeruginosa*' da bulunan sinyal molekülleri (A. 3-oxo-C12-HSL, B. C4-HSL, C. PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon)) (21).

3.2. “Quorum Sensing” Sistemleri

Farklı insan topluluklarının farklı diller kullanmaları gibi, farklı mikroorganizma türleri de genellikle farklı QS mekanizmalarını kullanmaktadır.

Önemli bir insan patojeni olan *P.aeruginosa*’ da temel olarak üç tip QS mekanizması vardır. Bunlardan ilki AHL-LasI/LasR sistemidir. İkinci sistem ise, AHL-RhII/RhlR sistemidir. Bu iki AHL temeline dayanan sistem yanında bir de kinolonların rol oynadığı üçüncü bir sistem saptanmıştır. “Pseudomonas Quinolone Signal” (PQS) molekülü olarak adlandırılan molekül, las ve rhl sistemleri arasında düzenleyici olarak işlev görmektedir (12, 35, 36).

3.2.1. LasI / LasR Sistemi

P.aeruginosa’ da ilk tanımlanan QS sistemidir. Çevreyi algılamayı sağlayan bu sistem gram negatif bakteri türleri arasında yaygındır (37).

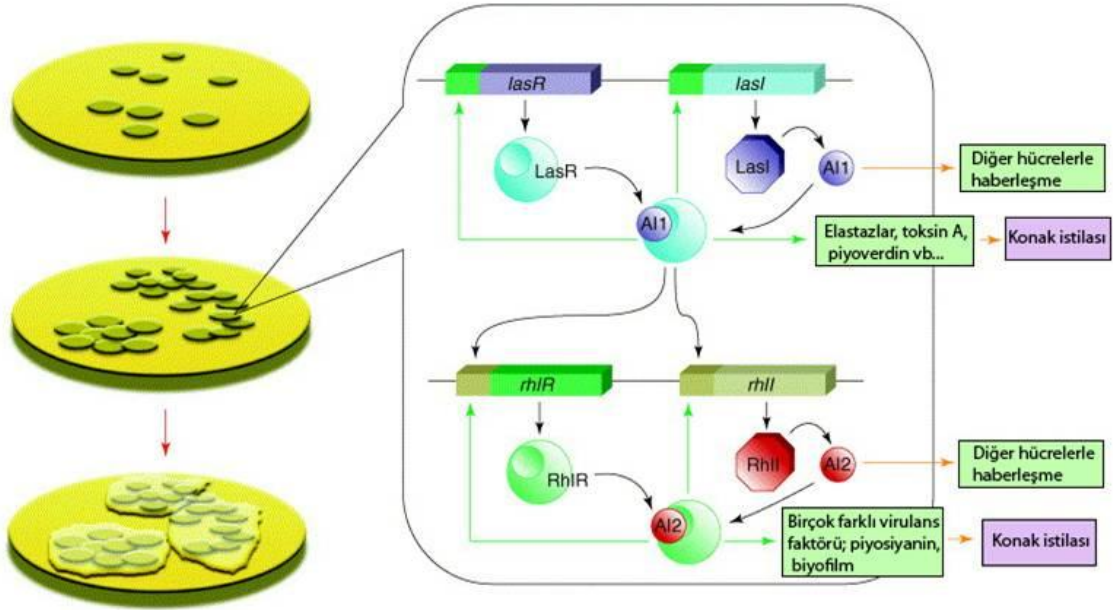
LasI geni, açıl homoserin lakton sinyal molekülünün üretiminden sorumludur ve 3-oxo-C12-HSL (N-3-oksododekanol-homoserin lakton) sinyal molekülünü üretir. Bakteri hücre yoğunluğu arttıkça ortamdaki sinyal molekülü konstantrasyonu artar ve belirli bir yoğunluğa ulaştığında *lasR* geni devreye girer. *LasR*, transkripsiyonel aktive edici proteini kodlar. 3-oxo-C12-HSL, transkripsiyonel aktive edici proteine bağlanır ve hedef genin transkripsiyonunu uyarır (Şekil 3-2) (26, 29, 38).

P.aeruginosa, Las sisteminde ürettiği AHL molekülü sayesinde elastaz, proteaz, ekzotoksin A, “swimming” (yüzme), “swarming” (kayma) ve “twitching” (titreme) hareketi gibi virulans faktörleri ile biyofilm üretimini sağlar (23 - 25).

3.2.2. RhII / RhlR Sistemi

P.aeruginosa suşlarında bulunan ikinci QS sistemi RhII / RhlR sistemidir. Bu sistemde *rhII* geni C4-HSL (N-bütiril-homoserin lakton) açıl homoserin lakton sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Sinyal molekülleri belirli bir yoğunluğa ulaştığında *rhlR* geninin transkripsiyonunu uyarır ve hedef genin aktivasyonu sağlanır (Şekil 3-2) (26, 29, 38).

Rhl sistemi tarafından üretilen AHL molekülü ile ramnolipid, piyosiyenin, “swimming” (yüzme), “swarming” (kayma) ve “twitching” (titreme) hareketi gibi virulans faktörlerinin üretimi uyarılır (23 - 25).



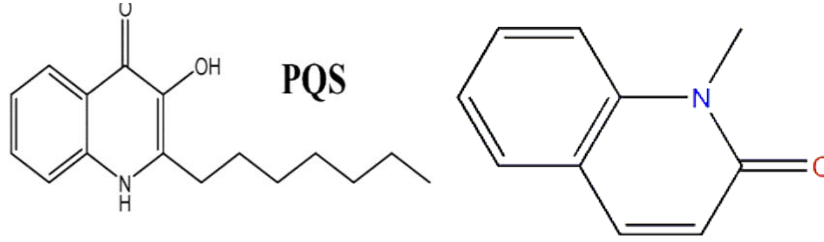
Şekil 3-2: *P.aeruginosa* suşlarında bulunan Las ve Rhl QS sistemi mekanizmaları (39).

3.2.3. Pseudomonas Kinolon Sinyal (PQS) Sistemi

P.aeruginosa suşlarında bulunan üçüncü QS mekanizması “Pseudomonas kinolon signal” (PQS)’ dir. Bu sistemde yer alan sinyal molekülü olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon, homoserin lakton grubunda bulunan sinyal moleküllerinden farklılık gösterir ve sadece PQS sistemine özgüdür. Bu sinyal molekülünün antimikrobiyal kinolonlardan 4-kinolon ailesi ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3-3) (6, 29).

PQS, Las ve Rhl QS sistemleri ile birlikte *lasB* elastaz geninin ekspresyonunu kontrol eder. PQS sinyal molekülünün ekspresyonu için *lasR* genine gereksinim vardır. *LasR* geninin varlığında PQS sinyal molekülü olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon üretilir

ve bu molekül *rhII* geninin transkripsiyonunu indükler. Özetle, LasI / LasR QS sistemi tarafından üretilen sinyal dizileri oluşuktan sonra, PQS devreye girer ve RhII / RhIR QS sisteminin aktive olmasına olanak sağlar. Böylece PQS, Las ve Rhl sistemleri arasında bağlantı sağlamış olur (24, 26).



Şekil 3-3: PQS sinyal molekülü ve 4-kinolonların temel yapısı (40).

3.3. “Quorum Sensing” İnhibisyonu

Bakteri hücresinde virulans genlerinin ekspresyonunun engellenmesi ve bu sayede bakteri virulansının azaltılması QS inhibisyonu ile mümkün olabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda QS inhibisyonu yeni antibakteriyel tedavi rejimlerinde önemli bir strateji olarak düşünüldüğünden, konuya ilişkin çok sayıda araştırma yapılmaktadır. QS inhibisyonu ile ilgili araştırmaların üç temel stratejiyi izlediği görülmektedir. Bunlar; QS sinyal molekülünün üretiminin engellenmesi, QS sinyal molekülünün yıkılması veya inhibisyonu, QS sinyal molekülünün alınmasının önlenmesidir (Şekil 3-4)(25, 26, 37).

3.3.1. “Quorum Sensing” Sinyal Molekülünün Üretiminin Engellenmesi

AHL, S-adenozil metiyoninden (SAM) sentez edildiği için, bu aminoasidin analogları QS sinyal molekülünün sentezini önlemek için denenmektedir (26). Bu moleküller holo-ACP, L/D-S-adenozil homosistein, sinefungin ve butiril-SAM’ dır.

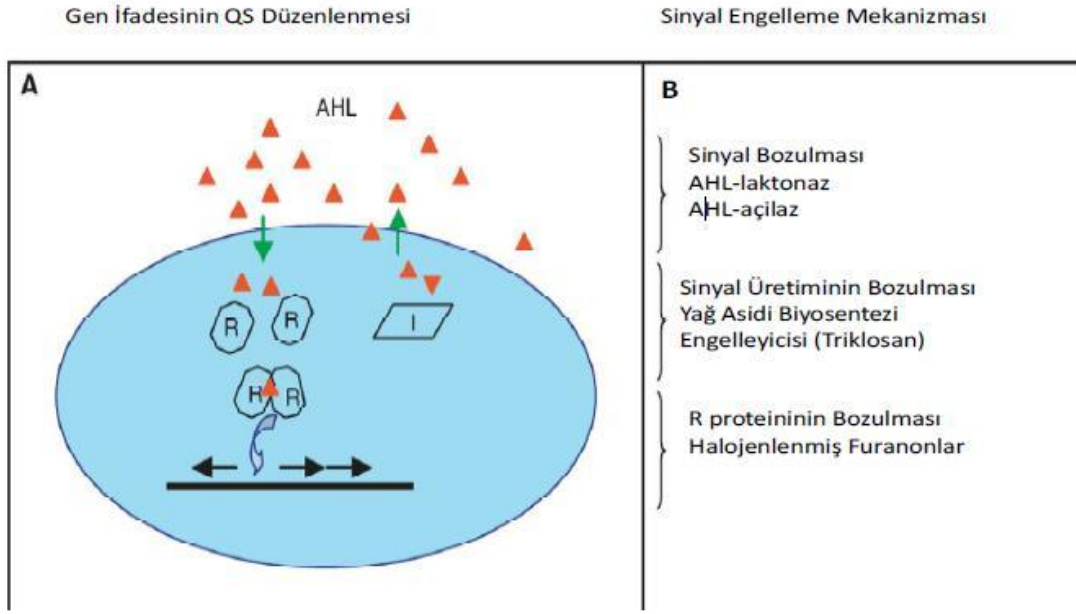
Yapılan çalışmalarda L/D-S-adenozil homosisteinin RhlI aktivitesini % 97 oranında azalttığı saptanmıştır (41). Sık kullanılan bir antiseptik olan triklosanın da gram negatif bakterilerde önemli bir sinyal molekülü olan AHL'nin sentezinde görevli bir enzimi inhibe ettiği, dolayısıyla bu molekülün sentezini de inhibe ettiği belirlenmiştir (42).

3.3.2. “Quorum Sensing” Sinyal Molekülünün Yıkılması Veya İnhibisyonu

“Quorum sensing” sinyalinin yayılmasını önlemenin en bilinen yollarından biri molekülün yıkıma uğratılmasıdır. AHL molekülündeki lakton halkasının dayanıklılığı ortamın pH değerine bağlıdır. pH 7' den yüksek değerlerde lakton halkası açılır (laktonoliz) ve molekül biyolojik aktivitesini kaybeder (43). Bir toprak bakterisi olan *Variovorax paradoxus* açıl homoserin laktonu tek enerji ve azot kaynağı olarak kullanmaktadır (44). Ayrıca bazı bakteriler AHL-parçalayıcı enzimler üretmektedir. İlk kez *Bacillus* türleri tarafından üretildiği saptanan bir enzimin *aiiA* geni tarafından kodlanan AHL-laktonaz olduğu belirlenmiştir (34, 45 - 47).

3.3.3. “Quorum Sensing” Sinyal Molekülünün Alınmasının Önlenmesi

“Quorum sensing” sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre karşı yarışan AHL analogları kullanılmaktadır. Bu analoglar genellikle AHL molekülünün yan zincirleri uzatılarak elde edilmektedir. Kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın (Deniz otu) üretmiş olduğu furanon bileşikler ile kendisine zararlı olabilecek bakteri kolonizasyonlarını önlediği gözlemlenmiştir. Bu molekülün *P.aeruginosa*'da “quorum sensing” sinyal moleküllerini inhibe ettiği gösterilmiştir (37, 48).



Şekil 3-4: QS sistemlerine karşı sinyal engelleme mekanizmalarına örnekler (49).

3.4. “Quorum Sensing” Mekanizmasını Engelleyen Doğal Bileşikler

Doğal bileşiklerin “quorum sensing” inhibitör etkisini gösterebilmek için bitkiler ve mantarlar üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Birçok bitkide (sarımsak, havuç, soya fasulyesi, bezelye, vanilya ekstresi, nilüfer çiçeği, domates) QS inhibitör etkisi belirlenmiştir. Çeşitli araştırmalarla balın anti-QS aktivitesi olduğu belirlenmiştir (50, 51). Bazı *Penicillium* türleri tarafından üretilen patulin ve penisillik asidin “quorum sensing” üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (52). Yapılan bir çalışmada ananas, muz gibi bitki ekstraktlarının *P.aeruginosa*’da virulans faktörlerinin ekspresyonuna karşı etkileri araştırılmıştır. İncelenen bitkilerde anti-QS aktivitesi saptanmıştır (53).

4. *P.AERUGINOSA* SUŞLARINDA ANTİMİKROBIYAL DİRENCİ

İnsanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotikler yaklaşık 60 yıldır insan yaşamına en önemli katkıyı sunmuş, ölümcül pek çok enfeksiyon hastalığının başarıyla tedavisine imkan sağlamışlardır. Artık son yıllarda başta uygunsuz ve gereksiz kullanımları sonucu gelişen direnç nedeniyle etkilerini önemli oranda kaybetmektedirler. Mikroorganizmaların yeryüzünün en eski canlıları olmasını sağlayan, değişen yaşam koşullarına hızla uyum sağlayabilme yetenekleridir. Bu yetenekleri sayesinde kendilerine karşı geliştirilen her yeni antibiyotikten kaçacak bir yol bulmaktadırlar. Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobiyal maddelere karşı er ya da geç direnç kazanmaktadırlar.

Direnç artışında en önemli neden, antibiyotik tüketimindeki artıştır. Akılcı olmayan antibiyotik kullanımı (gereksiz kullanım: viral enfeksiyonlar, yanlış antibiyotik, yanlış doz ve/veya yol, gereksiz kombinasyonlar) antibiyotik tüketimini büyük oranda artırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde tüketim sıralamasında 3-4. sırada yer alan antibiyotiklerin ülkemizde birinci sırada olması akılcı olmayan antibiyotik kullanımının kanıtıdır (54, 55).

Günümüzde hemen her bakteri kendilerine karşı kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı belli oranlarda direnç kazanmış durumdadır. *P.aeruginosa* da bu bakterilerden biridir.

P.aeruginosa, hastane enfeksiyonlarında sıkça karşılaşılan ve çoğul antibiyotik direnci nedeniyle tedavisi güç hastane enfeksiyonu etkenlerindendir. Çoğul ilaç direncine sahip *P.aeruginosa* suşlarıyla oluşan hastane enfeksiyonlarında mortalitenin üç kat, sekonder baktereminin dokuz kat daha yüksek olduğu, hastanede kalış süresinin 2,1 kat arttığı ve tedavi maliyetlerinde de artış gözlemlendiği belirtilmiştir (56-59).

Antipsödomonal penisilinler ve sefalosporinler, aminoglikozidler, florokinolonlar ve karbapenemler gibi sınırlı sayıdaki antibiyotiğin *P.aeruginosa*'ya etkili olması nedeniyle, bu ilaçlara direncin izlenmesi ve kontrolü büyük önem taşımaktadır (60).

Direnç doğal veya edinilmiş direnç olmak üzere iki şekildedir. *P.aeruginosa*, ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, 2.kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit, trimetoprim doğal dirençlidir. Bu dirence ek olarak; beta-laktam, aminoglikozit ve kinolon gruplarına dirençli

bulunan; çoğul antibiyotik dirençli suşlarla ve hatta hastanelerde zaman zaman pan-rezistan suşlarla karşılaşmaktadır (61 - 63).

Bu çalışmada kullanılan iki antibiyotik olan sefepim ve kolistin de *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla yer alan antibiyotiklerdendir. Bir dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepimin *P.aeruginosa* suşlarına etkinliği ile ilgili yapılan araştırmalarda, Türk Dağı ve arkadaşları (64) 92 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada, sefepime direnç oranı % 41 olarak belirlenmiştir. Paköz ve arkadaşlarının (65) aynı yılda, 154 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada sefepime direnç oranı % 40 bulunmuştur. 2012 yılında yapılan başka bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşunda sefepim duyarlılığı % 46,4 olarak saptanmıştır (66).

Kolistin siklik yapıli katyonik polipeptid antibiyotikler olan polimiksinlerin bir üyesidir. 1947 yılında keşfedilen polimiksinler gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Ciddi nefrotoksik etkileri nedeniyle 1980' li yıllarda klinik kullanımdan çıkarılmış ve daha az toksik etkileri olan yeni antibiyotikler polimiksinlerin yerini almıştır. Son yıllarda izlenen çoğul ilaç direncine sahip bakteriler ile oluşan enfeksiyonların sıklığındaki artış ve tedavilerinde yaşanan sorunlar, polimiksinlerin kullanımını yeniden gündeme getirmiştir. Klinikte, çoğul ilaç direnci bulunan mikroorganizmalar ile oluşan enfeksiyonlarda kolistin kullanılması önerilmektedir (22,59, 67, 68).

Kolistinin son yıllardaki sıklığı giderek artan kullanımına bağıli olarak gelişen direnç durumu ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Türk Dağı ve arkadaşlarının (64) 2011 yılında, 92 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada kolistin direncine rastlanmazken, 2012 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada Türkiye'nin 7 bölgesinden (İstanbul, Ankara, İzmir, Konya, Antalya, Trabzon, Diyarbakır, Van) toplanan 186 *P. aeruginosa* suşunun 155 (%83,3)'i kolistine duyarlı bulunmuştur (69).

Antibiyotik direnci gösteren bakteriler tüm Dünya'nın önemli bir sorunu haline gelmiş bulunmaktadır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlar, enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinin artmasına ve hastanedeki yatış süresinin uzamasına neden olmaktadır. Yeni, daha etkili ve farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotik üretimi olanakları günümüzde sınırlı olduğundan, antibiyotik direncindeki artışın devamı halinde *P.aeruginosa* gibi sıklıkla çoğul antibiyotik direnci gösteren bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavi edilmesi olanaksız hale gelecektir.

Antimikrobiyal tedavide kullanılan antibiyotiklere ek olarak QS inhibitörü olma yeteneği saptanan antibiyotiklerin sub-inhibitör konsantrasyonlarda hastaya uygulanması ile bir taraftan tedavide bakterisit etki sağlanırken, diğer taraftan etken bakterileri atenüe etmek suretiyle enfeksiyon hastalıkları tedavisindeki başarı oranının artırılması hedeflenmektedir. Bu uygulamalarla; hastalar antibiyotiklerin toksik etkilerinden korunmuş olacak, antibiyoterapi süresi kısaltılarak hem tedavi sırasında enfeksiyon etkeni bakteride direnç gelişimi olasılığı azaltılacak ve hem de tedavi maliyeti düşürülebilecektir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Bakteri suşları

İstanbul Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Laboratuvarı'nda 2010 yılında incelenen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 120 *P.aeruginosa* suşu kullanılmıştır (Tablo 5-1). Bu suşların QS' de rol oynayan AHL molekülleri ve virulans faktörleri özellikleri incelendikten sonra, kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonunun bu özellikler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, hareket deneylerinde pozitif kontrol olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Açıl Homoserin Lakton (AHL) moleküllerinin tespiti için *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 51350 (A136) biyosensör suşu kullanılmıştır. Biyofilm aktivitesinin belirlenmesi için yapılan deneylerde pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 suşları kullanılmıştır. Duyarlılık deneylerinin standardizasyonunda *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.

Tablo 5-1: Çalışma kapsamına alınan *P.aeruginosa* suşlarının izole edildiği klinik örnekler.

Klinik Örnek	Sayı
Endotrakeal aspirasyon	24
Balgam	22
İdrar	16
Doku parçası	14
Yara sürüntüsü	13
Abse	9
Transtrakeal aspirasyon	6
Dren sıvısı	5
Safra	4
Endotrakeal tüp	3
Plevra ponksiyon sıvısı	2
Asit sıvısı	1
Trakeal kateter ucu	1
Toplam	120

5.1.2. Besiyerleri

5.1.2.1. Luria Bertani (LB) Agar

LB Agar (14)

Trypton	10 gr
Maya özeti	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında maddeler distile su içerisinde çözündürülüp karıştırıldıktan sonra, 121⁰C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45⁰C’ ye soğutulduktan sonra petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.2. Açıl Homoserin Lakton (AHL) Besiyeri

AHL Besiyeri (70)

Trypton	10 gr
Maya özeti	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	12 gr
X-Gal	50 µg/ml
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında X-Gal dışındaki tüm malzemeler karıştırılarak 121⁰C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45⁰C’ ye kadar soğutulduktan sonra, DMSO’ da çözülmüş X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid) ilave edilip petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.3. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon-Skim Milk Agar (BHISMA)

BHIB-Skim Milk Agar (71)

BHIB	60 gr
Skim milk	40 gr
Agar	30 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında BHIB ve agar ayrı bir balonda, skim milk ayrı bir balonda eşit hacimlerde distile su içerisinde çözündürülüp hazırlandıktan sonra BHIB ve agar 121⁰ C' de 15 dakika, skim milk 105⁰C' de 10 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan karışımlar 45⁰C' ye soğutulduktan sonra karıştırılıp petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.4. Kongo Red Agar

Kongo Red Agar (72, 73)

BHIB	37 gr
Sakkaroz	50 gr
Kongo kırmızısı	0.8 gr
Agar	10 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında sakkaroz dışındaki tüm malzemeler karıştırılarak 121⁰C' de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45⁰C' ye kadar soğutulduktan sonra filtre edilerek steril hale getirilmiş sakkaroz çözeltisi ilave edilip petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.5. “Swimming” (Yüzme) Besiyeri

“Swimming” Testi (16)

Trypton	10 gr
Maya özeti	5 gr
Agar	3 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında tüm malzemeler karıştırılarak 121⁰C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45⁰C’ ye kadar soğutulduktan sonra petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.6. “Swarming” (Kayma) Besiyeri

“Swarming” Testi (16)

Nutrient buyyon	8 gr
Glikoz	5 gr
Agar	5 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında tüm malzemeler karıştırılarak 121⁰C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri belli bir sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra petri kutularına dökülmüştür.

5.1.2.7. “Twitching” (Titreme) Besiyeri

“Twitching” Testi (15)

Trypton	10 gr
Maya özeti	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	10 gr
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Besiyerinin hazırlanmasında tüm malzemeler karıştırılarak 121°C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45°C’ ye kadar soğutulduktan sonra petri kutularına 3 mm kalınlığında dökülmüştür.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Suşların Toplanması, Tanımlanması ve Muhafaza Edilmesi

İstanbul Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Laboratuvarı’ nda incelenen klinik örneklerden izole edilmiş toplam 120 adet *P.aeruginosa* suşu çalışmaya alınmıştır. Öncelikle toplanan suşların tür tanıları ve/veya tanı doğrulama deneyleri çeşitli konvansiyonel yöntemlerle (O/F özelliği, hareket, oksidaz, katalaz, piyosyanin pigmenti varlığı, 42°C’ de üreme) yapılmıştır. İzolatlar Triptik Soy Agar (TSA)’ da 37°C’ de üretildikten sonra % 15 gliserin içeren buyyon besiyerinde -20°C’ de muhafaza edilmiştir. Diğer deneylere başlamadan önce, denenecek tüm suşların Luria Bertani (LB Agar) besiyerindeki taze kültürleri hazırlanmıştır.

5.2.2. AHL (Açıl Homoserin Lakton) Moleküllerinin Saptanması

AHL moleküllerinin varlığı; hazırlanışı 5.1.2.2.’ de belirtilen AHL Besiyerinde incelenmiştir. Deneylerde *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 51350 (A136) biyosensör suşu kullanılmıştır. AHL molekülü varlığı araştırılan *P.aeruginosa* suşu ve *A.tumefaciens* ATCC 51350 (A136) biyosensör suşu aralarında 1 cm uzaklık olacak

şekilde çizgi ekim yapılmıştır ve 30°C’ de 48 saat inkübe edilmiştir. Standart suş *A.tumefaciens* A136; AHL üreten bir suş ile karşılıklı olarak 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid (X-Gal) içeren besiyerinde üretildiğinde, AHL’ lere bir yanıt olarak mavi renklenme meydana getirir. AHL negatif suşlarda, aynı besiyerinde yapılan kültürlerde ise mavi renklenme görülmez. Çünkü AHL moleküllerinin varlığında indikatör suştaki *lacZ* reporter geni ekprese olmaktadır (70, 74).

5.2.3. Proteaz Enzimi Üretiminin Belirlenmesi

Bu amaçla suşların taze kültüründen, hazırlanışı 5.1.2.3.’ de belirtilen BHIB-skim milk agar (BHISMA) besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C’ de 48 saatlik inkübasyondan sonra bakteri kolonilerinin çevresinde oluşan berrak zon varlığında suşun proteaz enzimi ürettiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca deneylerde semikantitatif yöntem ile suşların proteoliz oranları hesaplanmıştır. Proteoliz oranı (Rp); kolonilerin etrafında oluşan berrak zon çapının (Dzc), bakteri koloni çapına (Dc) bölünmesi ile elde edilmiştir. Proteoliz oranı (Rp) 3.5’ den büyük olanlar yüksek, 2.0-3.5 arası olanlar orta, 2.0’ dan küçük olanlar da düşük proteolitik aktiviteye sahip olarak belirlenmiştir (71, 75).

5.2.4. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

Biyofilm üretiminin belirlenmesi için hazırlanışı 5.1.2.4.’ de açıklanan Kongo Red Agar kullanılmıştır. Suşlar besiyerine nokta ekim şeklinde ekilerek, kültürler 37°C’ de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda siyah koloni oluşturan suşlar biyofilm pozitif, pembe renkli ya da renksiz koloniler biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (72, 73).

5.2.5. “Swimming” (Yüzme) Testi

“Swimming” (yüzme) testi için, hazırlanışı 5.1.2.5.’ de açıklanan özel besiyerine nokta ekim yapılmıştır. Kültürler 30°C’ de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Ekimin yapıldığı noktadan yayılarak üreme, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Deneylerde *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (16).

5.2.6. “Swarming” (Kayma) Testi

“Swarming” (kayma) testi için her bir kültürden hazırlanışı 5.1.2.6.’ da açıklanan özel besiyerine nokta ekim yapılmış ve kültürler 30⁰C’ de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru dendritik şekilde yayılarak üremenin görülmesi ile belirlenmiştir. Deneylerin standardizasyonunda, LB agar negatif kontrol, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (16).

5.2.7. “Twitching” (Titreme) Testi

“Twitching” (titreme) testi için suşlar, hazırlanışı 5.1.2.7.’ de belirtilen özel besiyerinin dibine kadar batırılarak ekilmiştir. Kültürler 30⁰C’ de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Agar ile petri kutusunun arasında sisli zon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Deney sırasında LB agar negatif kontrol, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu suretle, “twitching” (titreme) hareketi belirlenen suşların Tip IV pilusa sahip olduğu sonucuna, indirekt olarak ulaşılmıştır (15).

5.2.8. Antibiyotiklerin “Quorum Sensing” ve Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Aktivitesinin İncelenmesi

Çalışmanın ilk bölümünde; 120 *P.aeruginosa* suşu, AHL moleküllerinin varlığı ve proteaz, biyofilm, “swimming – swarming - twitching” hareketleri gibi virulans faktörleri bakımından incelenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise; öncelikle bu suşlar arasından; araştırılan virulans faktörleri yönünden kuvvetli pozitif sonuç verenler seçilerek kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının virulans faktörlerinin sentezine inhibitör etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Hareket (swimming, swarming, twitching) için toplam 38 suş incelemeye alınmıştır. Kolistin ve sefepimin proteaz aktivitesi üzerine inhibitör aktivitesinin belirlenmesi için toplam 25 suş seçilmiştir. Biyofilm yönünden incelenen pozitif sonuç alınan suş sayısı az (2/120) olduğu için antibiyotiklerin bu virulans faktörü üzerine olan inhibitör aktivitesi araştırılamamıştır.

5.2.8.1. Kolistin ve Sefepimin İncelenen Suşlar İçin MİK ve SubMİK'lerinin Belirlenmesi

Kolistin ve sefepimin QS ve virulans faktörleri üzerine inhibitör etkisini belirlemek için incelenen *P.aeruginosa* suşları içinden seçilen suşların MİK ve subMİK değerleri belirlenmiştir. Bunun için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (76).

5.2.8.2. Kolistinin İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması

Kolistinin (Koçak Farma İlaç ve Kimya San. A.Ş., İstanbul) inhibitör aktivitesinin belirlenmesinde, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan kolistin ana çözeltisi 5.1.2.2, 5.1.2.3, 5.1.2.5, 5.1.2.6 ve 5.1.2.7'de yer alan besiyerlerine ml' de subMİK konsantrasyonlarda olacak şekilde ilave edilmiştir. Elde edilen antibiyotikli besiyerleri ve seçilen suşlar kullanılarak 5.2.2, 5.2.3, 5.2.5, 5.2.6 ve 5.2.7'de belirtilen deneyler tekrarlanmıştır. Çalışmanın birinci ve ikinci bölümüne ilişkin veriler birbiri ile karşılaştırılmıştır.

5.2.8.3. Sefepimin İnhibitör Aktivitesinin Araştırılması

Sefepimin (Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş., İstanbul) inhibitör aktivitesinin belirlenmesinde, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan sefepim ana çözeltisi 5.1.2.2, 5.1.2.3, 5.1.2.5, 5.1.2.6 ve 5.1.2.7'de yer alan besiyerlerine ml' de subMİK konsantrasyonlarda olacak şekilde ilave edilmiştir. Elde edilen antibiyotikli besiyerleri ve seçilen suşlar kullanılarak 5.2.2, 5.2.3, 5.2.5, 5.2.6 ve 5.2.7'de belirtilen deneyler tekrarlanmıştır. Çalışmanın birinci ve ikinci bölümüne ilişkin veriler birbiri ile karşılaştırılmıştır.

5.2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 17,0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı değerler ortalama, standart sapma, medyan (ortanca) ve minimum maksimum olarak verilmiştir. Kategorik değişkenler, olgu sayıları ve yüzde değer olarak ifade edilmiştir. Proteaz enzimi üretimi

dağılımının normale uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Proteaz üretimi deneylerinde antibiyotiksiz besiyeri, kolistinli besiyeri ve sefepimli besiyeri olmak üzere üç grubun karşılaştırmasında Kruskal Wallis test, ikili karşılaştırmalarında ise bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney-U test kullanılmıştır (anamlılık sınırı $p=0.016$ olarak alınmıştır). Kategorik değişkenlerin karşılaştırılması Yates düzeltmeli ki- kare ve Fisher kesin olasılık testleri ile yapılmıştır ($p < 0,05$) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).

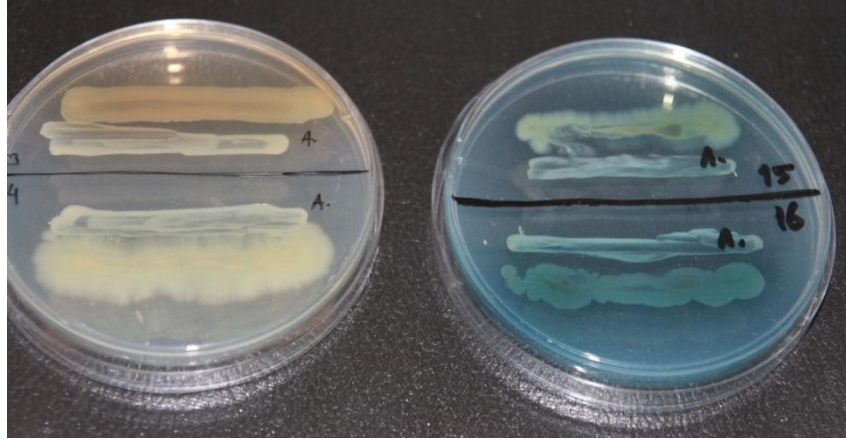
6. BULGULAR

İncelemeye alınan 120 *P.aeruginosa* suşunun 90' ı (% 75) AHL pozitif, 76' sı (% 63,3) proteaz pozitif ve 2' si (% 1,6) biyofilm pozitif bulunmuştur. Hareket özellikleri için incelenen 120 *P.aeruginosa* suşunun, 117' si (% 97,5) “swimming” (yüzme), 82' si (% 68,3) “swarming” (kayma) ve 66' sı (% 55) “twitching” (titreme) hareketi yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. İncelenen suşların AHL ve beş ayrı virulans faktörünün incelenme sonuçları Tablo 6-1' de toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 6-1: *P.aeruginosa* suşlarında (n:120) incelenen AHL ve beş ayrı virulans faktörü yönünden pozitif bulunan suş sayısı ve oranları.

AHL	Biyofilm	Proteaz	Hareket		
			Yüzme	Kayma	Titreme
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
90 (75)	2 (1,6)	76 (63,3)	117 (97,5)	82 (68,3)	66 (55)

İncelenen 120 *P.aeruginosa* suşunun 90 (% 75) 'nda uzun zincirli AHL moleküllerinin varlığı saptanmıştır. Şekil 6-1' de AHL molekülleri varlığı araştırılan *P.aeruginosa* suşlarında negatif ve pozitif deney sonuçları görülmektedir.



Şekil 6-1: AHL molekülleri varlığı araştırılan *P.aeruginosa* suşlarında negatif ve pozitif deney sonuçları (Soldaki kültür negatif, sağdaki kültür pozitif).

Tablo 6-2: *P.aeruginosa* suşlarında (n:120) AHL moleküllerinin varlığı ile incelenen virulans faktörlerinin varlığı arasındaki ilişki.

	Proteaz n: 76	Yüzme n: 117	Kayma n: 82	Titreme n: 66
AHL (+)	67 (% 88)	90 (% 76,9)	63 (% 76,8)	56 (% 84,8)
AHL (-)	9 (% 11)	27 (% 23)	19 (% 23)	10 (% 15)

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* suşlarında (n:120) AHL moleküllerinin varlığı ile, incelenen virulans faktörlerinin varlığı arasındaki ilişki Tablo 6-2’ de gösterilmiştir. Proteaz enzimi ürettiği belirlenen *P.aeruginosa* suşlarının % 88’ inin, “swimming” (yüzme) hareketi pozitif bulunan suşların % 76,9’ unun, “swarming” (kayma) hareketi pozitif bulunan suşların % 76,8’ inin, “twitching” (titreme) hareketi pozitif bulunan suşların % 84,8’ inin aynı zamanda AHL moleküllerini de ürettiği saptanmıştır.

Biyofilm aktivitesinin belirlenmesi için 120 *P.aeruginosa* suşu kullanılmış ve yapılan deneylerde siyah koloni oluşturan suşlar biyofilm pozitif, pembe ya da renksiz koloniler biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 6-2’ de biyofilm pozitif ve negatif suşların bulunduğu deney sonuçları görülmektedir. Pozitif sonuç veren suş sayısı (2/120) az olduğundan, sonuçların anlamlı olmayacağı düşünülerek biyofilm üzerine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi araştırılmamıştır.



Şekil 6-2: *P.aeruginosa* suşlarında biyofilm üretimi (117 numaralı kültür pozitif; 118, 119 ve 120 numaralı kültürler negatif).

6.1. Kolistin ve Sefepimin AHL Molekülleri ve Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Etkisinin Araştırılması

6.1.1. Antibiyotiklerin *P.aeruginosa* Suşları İçin Mikrodilüsyon Yöntemi İle Belirlenen MİK ve SubMİK Değerleri

Kolistin ve sefepimin AHL molekülleri ve virulans faktörleri üzerine inhibitör etkisini belirlemek için, incelenen *P.aeruginosa* suşları içinden seçilen 42 suşun mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK ve subMİK değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 6-3 ve Tablo 6-4’ de gösterilmiştir.

CLSI (76) kriterlerine göre; kolistin MİK' i ≥ 8 , $= 4$ ve ≤ 2 olan suşlar sırasıyla dirençli, orta duyarlı ve duyarlı olarak yorumlanmıştır. İncelenen 42 *P.aeruginosa* suşunun 19' u (% 45,2) kolistine duyarlı, 8' i (% 19) orta duyarlı ve 15' i (% 35,7) dirençli bulunmuştur. Sefepim MİK' i, ≤ 8 , $= 16$ orta duyarlı ve ≥ 32 olan suşlar sırasıyla duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak yorumlanmıştır. İncelenen 42 *P.aeruginosa* suşunun 38' i (% 90) duyarlı, 1' i (% 2) orta duyarlı ve 3' ü (% 7) dirençli bulunmuştur.

Tablo 6-3: İncelenen *P.aeruginosa* suşları (n:42) için kolistin MİK değerleri.

Suşlar	MİK (µg/ml)								MİK ₅₀	MİK ₉₀
	0.5	1	2	4	8	16	32	64		
<i>P.aeruginosa</i>	1	7	11	8	9	3	1	2	4	16

*: Suşlar için belirlenen MİK' lerin bir kat düşük konsantrasyonu subMİK olarak kabul edilmiştir.

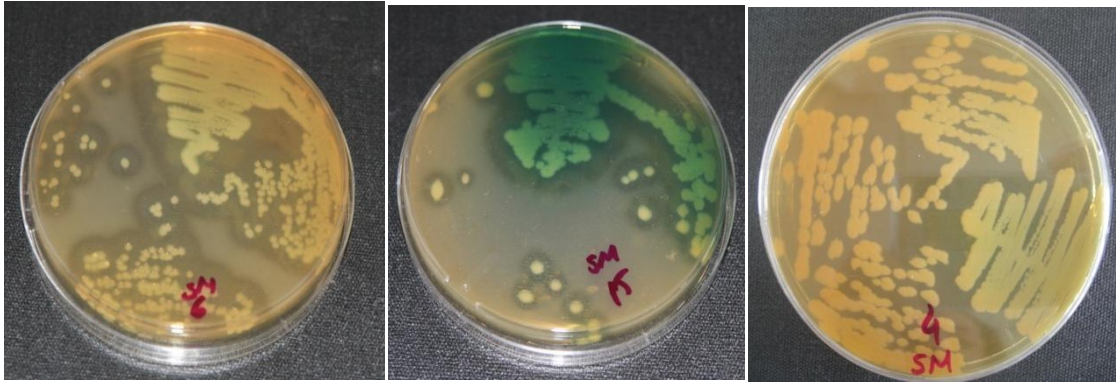
Tablo 6-4: İncelenen *P.aeruginosa* suşları (n:42) için sefepimin MİK değerleri.

Suşlar	MİK (µg/ml)							MİK ₅₀	MİK ₉₀
	1	2	4	8	16	32	64		
<i>P.aeruginosa</i>	5	16	11	6	1	1	2	2	16

*: Suşlar için belirlenen MİK' lerin bir kat düşük konsantrasyonu subMİK olarak kabul edilmiştir.

6.1.2. *P.aeruginosa* Suşlarında Kolistin ve Sefepimin Proteaz Enzimi Üretimine Etkisi

120 *P.aeruginosa* suşu proteaz enzimi üretimi yönünden incelenmiş ve bakteri kolonilerinin çevresinde, berrak zon varlığında suşun proteaz enzimi ürettiği saptanmıştır (Şekil 6-3). Ayrıca semi-kantitatif tarama yöntemi ile suşların proteolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla suşlarda proteoliz oranı hesaplanmıştır. Hidroliz zonu (Rp) 3,5' den büyük bulunanlar yüksek, 2,0-3,5 arası olanlar orta, 2,0' dan küçük olanlar da düşük proteolitik aktiviteye sahip olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 6-3: *P.aeruginosa* suşlarında proteaz aktivitesinin belirlenme sonuçları (6 ve 15 numaralı kültürler proteaz pozitif, 4 numaralı kültür proteaz negatif).

İncelenen 120 *P.aeruginosa* suşunun 76' sı (% 63,3) proteaz enzimi üretimi yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan suşların proteoliz oranları hesaplandığında; yüksek proteolitik aktiviteye sahip 6 (% 5) suş bulunmuştur. 61' i (% 50,8) orta ve 9' u (% 7,5) düşük proteolitik aktiviteli olarak belirlenmiştir (Tablo 6-5).

Tablo 6-5: İncelenen *P.aeruginosa* suşlarında (n:120) proteaz üretimi ve proteoliz oranı sonuçları.

Proteaz pozitif			Negatif
Yüksek (Rp)*>3.5	Orta (Rp) 2.0-3.5	Düşük (Rp)<2.0	
6 (% 5)	61 (% 50,8)	9 (% 7,5)	44 (% 36,6)

*Rp : Proteoliz oranı

Proteaz pozitif olarak belirlenen *P.aeruginosa* suşları arasından seçilen yüksek ve orta proteoliz oranına sahip 25 *P.aeruginosa* suşunda kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının proteaz inhibitör aktivitesi; antibiyotiksiz besiyerinde ve antibiyotik içeren besiyerinde belirlenen proteoliz oranları birbiri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 6-6' de gösterilmiştir.

Tablo 6-6: *P.aeruginosa* suşlarında kolistin ve sefepimin proteolitik aktivite üzerine etkisi.

Suş No	Proteoliz oranları		
	Antibiyotiksiz besiyerinde	Kolistinli besiyerinde	Sefepimli besiyerinde
2	2	2	1,5
3	3,25	2	2
10	3,3	3	1,6
21	3,3	3	2,3
23	2,5	2	2
33	3	2,6	1,75
38	3	3	2
39	3	2,25	1,4
43	3,3	3	3
75	3,3	3	2,3
79	3,6	3	2,6
84	3	2	2
87	3,25	3	2
88	2,8	2,6	2,6
89	3	2,6	2
90	5	2,8	1,5
91	3,2	2,6	1,6
92	4	3,3	3
93	3	2,6	2,3
94	4	1,6	1,3
96	3	2,5	2,3
97	3	3	1,5
98	2	1,75	1,5
99	3	2	1,8
100	3	2	1,5

Tablo 6-7: *P.aeruginosa* suşlarının üç farklı ortamda belirlenen proteoliz oranlarının, Kruskal-Wallis Testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Antibiyotiksiz besiyeri	Kolistinli besiyeri	Sefepimli besiyeri	p
$3,15 \pm 0,59, 3(2,5)^{b,c}$	$2,52 \pm 0,48, 2,6(1,6 - 3,30)^{a,c}$	$1,97 \pm 0,48, 2(1,30 - 3)^{a,b}$	*<0,001

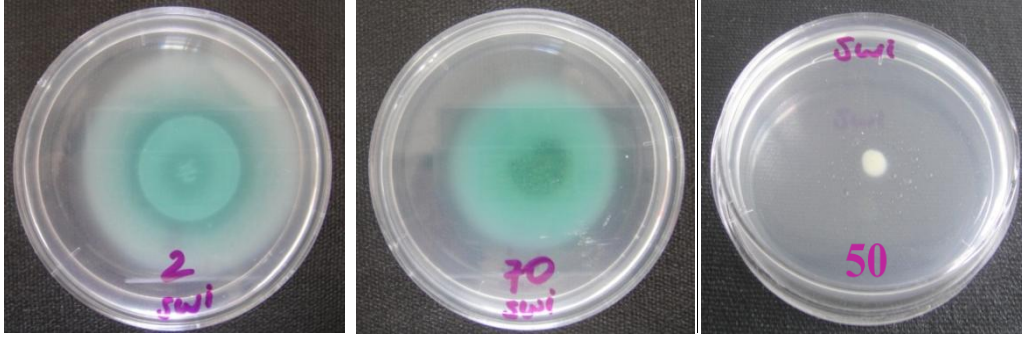
a: Antibiyotiksiz besiyerinden farklı, b: Kolistinli besiyerinden farklı, c: Sefepimli besiyerinden farklı

*İleri derecede anlamlı fark.

Tablo 6-6’ da gösterildiği gibi, kolistin ve sefepimin seçilen *P.aeruginosa* suşlarının proteaz enzimi üretimine farklı oranlarda inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır. Kolistin 25 suşun 22’sinde (% 88), sefepim ise tüm suşlar üzerinde (% 100) proteaz inhibitörü aktivitesi göstermiştir. Ayrıca farklı ortamlarda üretilmiş olan suşların proteoliz oranları arasındaki fark değerlendirildiğinde; kolistinli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları ile antibiyotiksiz besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında, sefepimli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları ile antibiyotiksiz besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında ve ayrıca kolistinli ve sefepimli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında istatistiksel yönden ileri derecede anlamlı fark ($p<0,001$) olduğu saptanmıştır (Tablo 6-7). Buna göre; sefepimin kolistine göre proteaz enzimi üretimine inhibitör etkisinin daha güçlü olduğu sonucuna varılmıştır.

6.1.3. *P.aeruginosa* Suşlarında Kolistin ve Sefepimin “Swimming” (Yüzme) Hareketine Etkisi

İncelenen 120 *P.aeruginosa* suşunda “swimming” yüzme hareketinin varlığını araştırmak amacıyla nokta ekim yapılmış ve ekim yapılan noktadan yayılmanın olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6-4). Yapılan deneylerde 117 (% 97,5) *P.aeruginosa* suşu’ nda “swimming” (yüzme) hareketinin varlığı saptanmıştır.



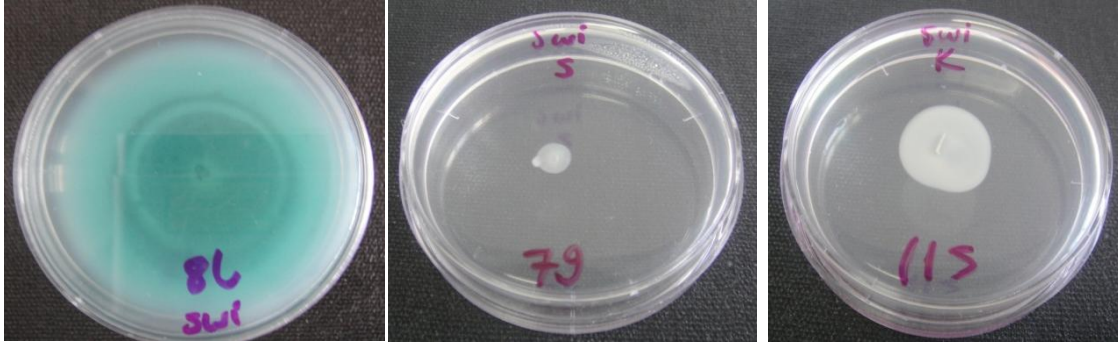
Şekil 6-4: *P.aeruginosa* suşlarında “swimming” (yüzme) hareketi (2 ve 70 numaralı kültürler pozitif, 50 numaralı kültür negatif)

“Swimming” (yüzme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar arasından seçilen 38 adet suş üzerinde kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin 38 suşun 6’ sında (% 15,7), sefepim ise 15’ inde (% 39,4) inhibitör etki göstermiştir (Şekil 6-7). Sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının, kolistin subinhibitör konsantrasyonlarına göre “swimming” (yüzme) hareketini istatistiksel yönden anlamlı derecede daha yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir (Tablo 6-8).

Tablo 6-8: *P.aeruginosa* suşlarında (n:38) “swimming” (yüzme) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.

	Swi (+)	Swi (-)	p
Kolistin	32 (% 84,2)	6 (% 15,7)	*0,040
Sefepim	23 (% 60,5)	15 (% 39,4)	

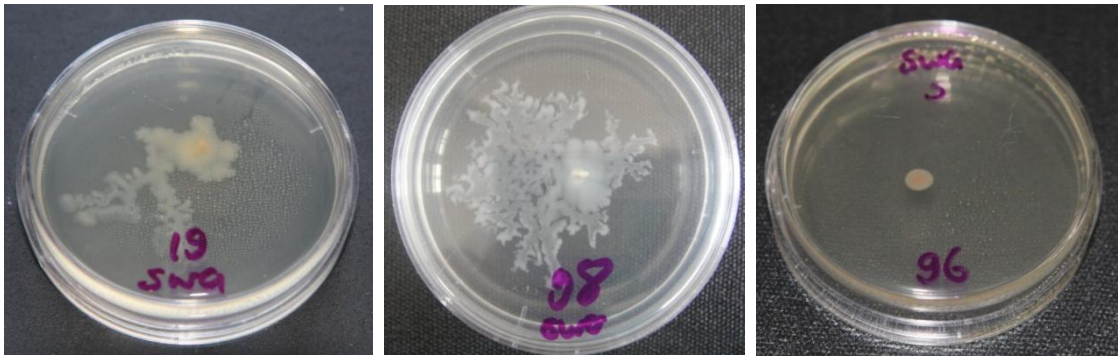
*Anlamlı fark.



Şekil 6-5: *P.aeruginosa* suşlarından “swimming” (yüzme) hareketi ve antibiyotiklerle inhibisyonu (86 numaralı kültür antibiyotiksiz ortamda-pozitif, 79 numaralı kültür sefepimli ortamda-negatif, 115 numaralı kültür kolistinli ortamda-pozitif).

6.1.4. *P.aeruginosa* Suşlarında Kolistin ve Sefepimin “Swarming” (kayma) Hareketine Etkisi

Çalışma kapsamına alınan *P.aeruginosa* suşları “swarming” (kayma) hareketi yönünden incelenmiş ve yapılan deneylerde ekim yapılan noktadan çevreye doğru yayılmanın olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6-6). Yüz yirmi *P.aeruginosa* suşunun 82 (% 68,3) ‘sinde “swarming” (kayma) hareketinin varlığı saptanmıştır.

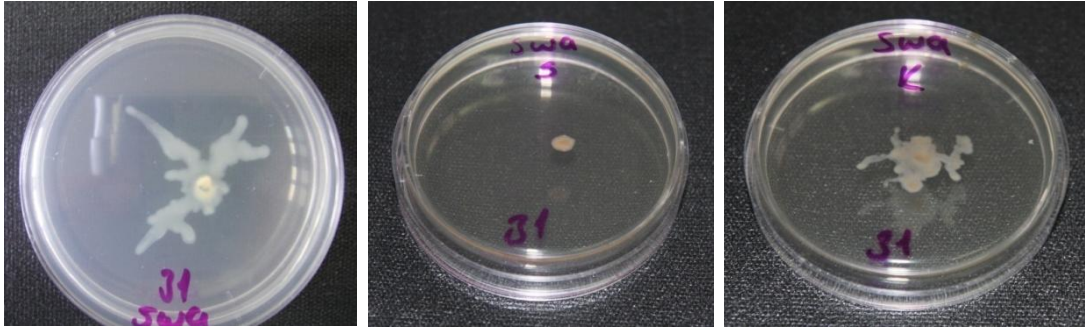


Şekil 6-6: *P.aeruginosa* suşlarında “swarming” (kayma) hareketi (19 ve 98 numaralı kültürler pozitif, 96 numaralı kültür negatif).

“Swarming” (kayma) hareketi yönünden pozitif bulunan *P.aeruginosa* suşları arasından seçilen 38 suş üzerinde kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Kolistin ve sefepim 38 suşun 26’ında inhibitör etki göstermiştir (Şekil 6-7). “Swarming” (kayma) hareketinin inhibisyonunda kolistin ve sefepimin etkinliği arasında fark olmadığı saptanmıştır (Tablo 6-9).

Tablo 6-9: “Swarming” (kayma) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.

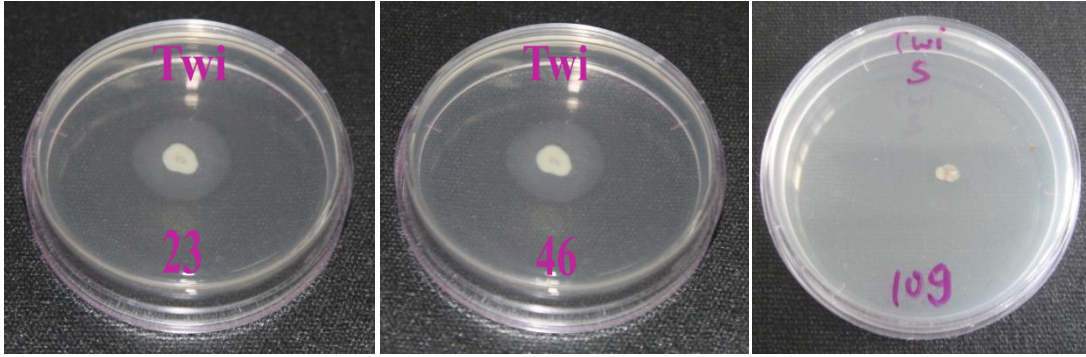
Toplam Suş Sayısı	KOLİSTİN		SEFEPİM	
	Swa (+)	Swa (-)	Swa (+)	Swa (-)
38	12 (% 31,5)	26 (% 68,4)	12 (% 31,5)	26 (% 68,4)



Şekil 6-7: İncelenen *P.aeruginosa* suşlarından 31 numaralı kültür. Soldan sağa: Antibiyotiksiz ortamda “swarming” (kayma) hareketi, sefepim varlığında kayma hareketinin inhibisyonu, kolistin varlığında kayma hareketinde inhibisyon yok.

6.1.5. *P.aeruginosa* Suşlarında Kolistin ve Sefepimin “twitching” (titreme) Hareketine Etkisi

İncelenen *P.aeruginosa* suşlarında “twitching” (titreme) hareketinin varlığı araştırılmış ve yapılan deneylerde agar ile petri kutusunun arasında sisli bir zon görülmesi durumunda sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6-8). Yüz yirmi *P.aeruginosa* suşunun 64 (% 53,3)’ünde “twitching” (titreme) hareketinin varlığı saptanmıştır.



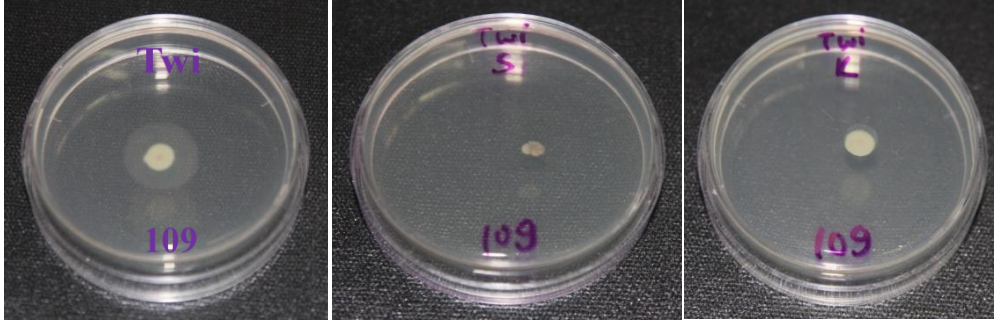
Şekil 6-8: *P.aeruginosa* suşlarında “twitching” (titreme) hareketi (23 ve 46 numaralı kültürler pozitif, 109 numaralı kültür negatif).

“Twitching” (titreme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar arasından seçilen 38 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin 38 suşun 34’ünde (% 89,4), sefepim ise denenen tüm suşlarda (% 100) inhibitör etki göstermiştir (Şekil 6-9). Sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının, kolistinin subinhibitör konsantrasyonlarına göre “twitching” (titreme) hareketini istatistiksel yönden ileri derecede anlamlı olarak daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır (Tablo 6-10).

Tablo 6-10: *P.aeruginosa* suşlarında (n:38) “twitching” (titreme) hareketine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi.

	Twı (+)	Twı (-)	p
Kolistin	4 (% 10,5)	34 (% 89,4)	*0,005
Sefepim	0 (% 0)	38 (% 100)	

*İleri derecede anlamlı fark.



Şekil 6-9: İncelenen *P.aeruginosa* suşlarından 109 numaralı kültür. Soldan sağa: Antibiyotiksiz ortamda “twitching” (titreme) hareketi, sefepim varlığında ve kolistin varlığında “twitching” (titreme) hareketinin inhibisyonu.

7. TARTIŞMA

Mikroorganizmalar, sözcükler yerine ortama salgıladıkları sinyal moleküllerini kullanarak iletişim kurarlar. Bakteriler, bu sinyal moleküllerini bulundukları ortama salgılamakla kalmaz aynı zamanda popülasyonda bulunan sinyal moleküllerinin miktarını (konsantrasyonunu) da algılayabilirler. Çoğunluğu algılama (Quorum Sensing) olarak adlandırılan bu olay, bir mikroorganizmanın ortama sinyal molekülü bırakması ve bu molekölün diğer mikroorganizmalar tarafından algılanmasıyla gerçekleşir (77).

İnsanlarda farklı enfeksiyon tablolarına yol açan bir bakteri olan *P. aeruginosa* da birçok QS sistemine sahiptir. Pek çok çalışmada *P.aeruginosa* patojenitesinde QS sisteminin katkısı tanımlanmıştır (78 - 80). *P.aeruginosa*'nın patojenitesi hücre yüzeyi ile ilişkili; kirpik, pili (fimbriya), lipopolisakkarit (endotoksin), aljinat ve hücre dışına salgılanan proteazlar (elastaz, alkalin proteaz), hemolizinler (ramnolipid ve fosfolipazlar), toksinler (eksoenzim S ve ekzotoksin A) ve piyosyanin gibi virulans faktörlerine bağlıdır. Bu virulans faktörlerinin ekspresyonu AHL molekülleri aracılığı ile QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir (9 - 11).

P.aeruginosa suşlarında QS sisteminin virulansla ilgili genleri regüle ettiği in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Las sistemi elastaz, ekzotoksin A, biyofilm üretiminden, “swimming” (yüzme), “swarming” (kayma) ve “twitching” (titreme) hareketi gibi virulans faktörleri oluşumundan sorumludur. Rhl sistemi ise ramnolipid, piyosyanin, proteaz gibi virulans faktörlerinin üretimini kontrol etmektedir (23).

Enfeksiyon hastalıkları patojen mikroorganizma ile konak arasındaki dinamik bir etkileşimin sonucunda ortaya çıkar. Konak bir enfeksiyona doğal ve edinilmiş immun savunma mekanizmaları ile yanıt verirken, hastalık etkeni patojen ise virulans faktörlerinden oluşan bir savunma mekanizması üreterek immun sistemi aktive eder. Bugün enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sadece çoğul antimikrobiyal direnci sorun yaratmamakta, ek olarak konakta biyofilm içinde canlı kalan persistan bakteriler de bu probleme eklenmektedir. Ki biyofilm oluşumu QS sonucunda meydana gelmekte ve patojen bakterilerin konak organizmadaki persistansı buna bağlı olarak gerçekleşmektedir (81).

Bakterilerin birbirleriyle ve konak ile iletişimini önlemek, diğer bir deyişle QS sistemini inhibe etmek antibakteriyel tedavi rejimlerinde yeni bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. QS inhibisyonu ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmaktadır ve bu araştırmaların üç temel stratejide toplandığı görülmektedir. Bunlar; QS sinyal molekülünün üretiminin engellenmesi, QS sinyal molekülünün yıkılması veya inhibisyonu, QS sinyal molekülünün alınmasının önlenmesidir (25, 26).

QS sinyal molekülünün üretiminin engellenmesi için yapılan araştırmalarda; AHL, S-adenozil metiyoninden (SAM) sentez edildiği için, bu aminoasidin analogları QS sinyal molekülünün sentezini önlemek için denenmektedir (26, 41). QS sinyal molekülünün yıkılması veya inhibisyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, bazı bakterilerin AHL-parçalayıcı enzimler ürettiği belirlenmiştir. Bu enzimlerin *aiiA* geni tarafından kodlanan AHL-laktonaz oldukları saptanmıştır (34, 46). QS sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre karşı yarışan AHL analogları kullanılmaktadır. Kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın (Deniz otu) üretmiş olduğu furanon bileşikleri ile kendisine zararlı olabilecek bakteri kolonizasyonlarını önlediği gözlemlenmiştir. Bu molekülün *P.aeruginosa*'da QS ile ilişkili sinyal moleküllerini inhibe ettiği gösterilmiştir (37, 59). Ayrıca doğal bileşiklerin QS inhibitör etkisini gösterebilmek için bitkiler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (50, 51, 53, 82).

Çeşitli araştırmalar bazı antimikrobiyal maddelerin QS inhibitörü olarak aktivite gösterebildiğini belirlemiştir. Bir çalışmada 12 farklı antimikrobiyal maddenin sub-inhibitör konsantrasyonlarında QS inhibitör etkisi araştırılmış ve QS sinyal molekülü üreten bir *P.aeruginosa* suşu kullanılmıştır. İncelenen antimikrobiyal maddelerin üçünde (azitromisin, seftazidim ve siprofloksasin) yüksek aktivite saptanmış ve bunların *P.aeruginosa* suşundaki QS ile regüle edilen virulans faktörleri üretimini de azalttığı belirlenmiştir (83). Yapılan çeşitli çalışmalarda *P.aeruginosa* suşlarında tobramisin QS inhibitör aktivitesi olduğu saptanmıştır (84). Yapılan bir çalışmada tobramisin subinhibitör konsantrasyonlarda *P.aeruginosa*'nın sahip olduğu QS sistemlerinden RhII/R sistemini inhibe ederek, bu sistemde rol oynayan sinyal molekülü olan C4-HSL üretimini azalttığı saptanmıştır (85). Azitromisinin de *P.aeruginosa* suşlarında QS inhibitör aktivitesi olduğu çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir (86, 87). Tateda ve arkadaşları (88) azitromisinin *P.aeruginosa* PAO1 suşunda QS inhibitör aktivitesi olduğunu saptamış ve azitromisinin bilinmeyen bir mekanizma ile QS sisteminde rol oynayan otoindükleyicilerin sentezini engellediğini ve bu yolla virulans faktörleri

üretimini azalttığını belirlemişlerdir. Cummins ve arkadaşları (89) kolistin çeşitli konsantrasyonlarının *Pseudomonas* kinolon sinyal moleküllerinin sentezi ile ilgili genler üzerine etkili olduğunu göstermişlerdir. Ülkemizde de antibiyotiklerin *P.aeruginosa* suşlarında QS inhibitör aktivitesinin belirlenmesine ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda gentamisin, imipenem, amikasin ve netilmisin çeşitli yöntemlerle QS sistemine etkileri araştırılmıştır (90, 91). Doğan ve arkadaşları (92) yaptıkları çalışmada gentamisine orta duyarlı ve duyarlı iki klinik *P.aeruginosa* suşu ile, gentamisine orta duyarlı standart ATCC 27853 suşunda gentamisinin QS sistemine etkisini araştırmışlar ve gentamisinin QS ile ilişkili AHL molekülü üretimini her suş için farklı şekilde etkilediğini saptamışlardır.

Çalışmamızda kolistin ve sefepimin *P.aeruginosa* suşlarında QS ve virulans faktörleri üretimine inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin, polimiksin grubundan polipeptid bir antibiyotiktir. Ciddi nefrotoksik ve nerotoksik etkileri nedeniyle bir süre kullanımdan çıkarılmıştır. Son 20 yıl içinde, özellikle gram negatif bakterilerde direnç sorunu ve yeni antibiyotik üretiminin yetersizliği, bir tedavi seçeneği olarak kolistini tekrar gündeme getirmiştir (93). Sefepim *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan ve QS inhibisyonu ile ilgili araştırmalarda bugüne kadar denenmemiş bir antibiyotik olduğu için seçilmiştir.

Çalışmamızda 120 *P.aeruginosa* suşu arasından bu çalışmanın kapsamına alınan virulans faktörlerini ürettikleri belirlenmiş olduğu için seçilen 42 suшта mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak sefepim duyarlılığı araştırılmış, suşlarda $MİK_{50}$: 2 µg/ml, $MİK_{90}$: 16 µg/ml bulunmuştur. Direnç oranı ise % 7 olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan üç ayrı çalışmada ise sefepime direnç oranları % 41-46,4 arasında belirlenmiştir (64 - 66). Direnç oranları arasındaki büyük farkın, sefepimin farklı hastanelerde kullanım yaygınlığının da farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Yüz yirmi *P.aeruginosa* suşu arasından seçilen 42 suшта mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak kolistin duyarlılığı araştırılmış, suşlarda $MİK_{50}$: 4 µg/ml, $MİK_{90}$: 16 µg/ml bulunmuştur. Direnç oranı ise % 35,7 olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda kolistine direnç oranları % 0-16,7 olarak belirlenmiştir (64, 69).

Yapılan araştırmalarda bakterilerin QS sisteminde rol oynayan sinyal moleküllerinin belirlenmesinde çeşitli biyoindikatör bakteriler kullanılmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* A136' da bu biyosensör suşlardan biridir.

Agrobacterium tumefaciens A136 uzun zincirli AHL moleküllerini tespit eder (C4-C18). Bu moleküller 3-oxo ve 3-hidroksillenmiş türevdeki AHL' lerdir. AHL moleküllerinin tespit edilmesinde *Agrobacterium tumefaciens* A136 geniş bir aralığa sahip AHL moleküllerinin indikatörü olduğu için genellikle AHL moleküllerinin belirlenmesinde kullanılan ilk biyosensör suştur. Bakterinin hangi AHL molekülünü saptadığını belirlemek için daha spesifik biyosensör suşların kullanımı gerekmektedir. (22, 94).

A.tumefaciens A136 ortamda X-Gal varlığında, AHL moleküllerine yanıt olarak mavi renklenme meydana getirir. Çünkü AHL moleküllerinin varlığında indikatör suştaki *lacZ* reporter geni ekprese olmaktadır (95). QS sistemlerinde rol oynayan AHL moleküllerinin belirlenmesi ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada 231 *P.aeruginosa* suşu kullanılmış ve QS ile ilişkili AHL üretimi % 68 olarak saptanmıştır (96). Boşgelmez ve arkadaşları (97) *A.tumefaciens* NT1 biyosensör suşunu kullanarak, 50 *P.aeruginosa* suşunda AHL moleküllerinin varlığını araştırmış ve tüm suşların uzun zincirli AHL molekülü ürettiklerini belirlemişlerdir. Yüz yirmi *P.aeruginosa* suşunun denendiği çalışmamızda ise 90 (% 75) *P.aeruginosa* suşunun uzun zincirli AHL molekülü ürettiği belirlenmiştir.

P.aeruginosa, QS sisteminin kontrolü altında katı ve sıvı yüzeylerde biyofilm adı verilen bir yapı oluşturur. Biyofilm bakterilerin uygun olmayan koşullarda üremelerini ve canlı kalmalarını sağlar. Bakterinin bu yapıyı oluşturması, bakteriyel direncini arttırmasına ve biyofilm üzerindeki bakterinin konağın immun yanıtından daha az etkilenmesine olanak sağlar (19). *P.aeruginosa*' da biyofilm üretiminin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar "Tissue Culture Method" (TCP), Tüp Metodu (TM) ve Congo Red Agar Metodu (CRA) dur. *P.aeruginosa*' da biyofilm üretiminin belirlenmesi ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Perez ve arkadaşları (96) 231 *P.aeruginosa* suşu kullanarak yaptıkları çalışmada biyofilm üretimini % 85,3 olarak belirlemişlerdir. Biyofilm pozitif olarak belirlenen suşların % 45,2' sinin kistik fibrozlu hastalara ait olduğunu saptamışlardır. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada *P.aeruginosa* suşlarındaki biyofilm oranı % 33,3 olarak bulunmuştur (98). Hassan ve arkadaşları (99) 110 klinik örnek kullanarak yaptıkları çalışmada biyofilm üretiminin belirlenmesinde kullanılan üç yöntemi karşılaştırmışlardır. Yapılan deneylerde biyofilm üretimi TCP yöntemi ile % 22,7, TM yöntemi ile % 19 ve CRA yöntemi ile % 3,6

olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak biyofilm üretiminin belirlenmesinde TCP yönteminin altın standart olduğu kanısına varılmıştır. TM yönteminin duyarlılığı % 70 olarak belirlenirken, CRA yöntemi % 11 duyarlılığa sahip olarak bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada yine biyofilm üretiminin belirlenmesinde kullanılan üç yöntem (TCP, TM, CRA) karşılaştırmıştır. 12 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak yapılan çalışmada TCP ile 6, TM ile 5 ve CRA ile 1 suş biyofilm pozitif olarak belirlenmiştir (100). Yapılan çalışmalar Congo Red Agar (CRA) yönteminin yüksek özgüllüğe sahip bir yöntem olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda 120 *P.aeruginosa* suşunda biyofilm aktivitesinin varlığı araştırılmış ve biyofilm pozitif suş sayısı 2 (%1,6) olarak belirlenmiştir. Pozitif sonuç veren suş sayısı az olduğundan, sonuçların anlamlı olmayacağı düşünülerek biyofilm üretimi üzerine kolistin ve sefepimin inhibitör etkisi araştırılmamıştır.

Bakteriler sahip olduğu çok sayıdaki enzimleri ve toksinleri ile konağın farklı dokularında etkili olurlar. *P.aeruginosa* da birçok sayıda hücre dışı proteaz enzimi üretmektedir. Alkalen proteaz akut enfeksiyon sürecinde ve *P.aeruginosa*'nın neden olduğu doku hasarında önemli rol oynamaktadır (12, 17). Alkalen proteaz enzimi karaciğer, kornea ve deride nekroz oluşturur. "Ecthyma gangrenosum" adı verilen deri lezyonlarının oluşumunda da proteazlar rol oynar. Proteazlar doku harabiyeti oluşturdıklarından, aynı zamanda bakterinin dokular arasında yayılımını kolaylaştırır, immunoglobulinler ve komplemanın proteolizine de neden olur. Elastaz; elastaz A ve elastaz B olmak üzere iki formda bulunur ve elastini parçalayabilen enzimdir. Elastaz enzimi ise, kan damarındaki elastinin yapısını bozarak hemorojilerin oluşumuna yol açar (3).

P.aeruginosa suşlarında proteaz enzimi üretimine ilişkin çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Tingpej ve arkadaşları (101) 43 *P.aeruginosa* suşunda alkalen proteaz üretimini % 51, total proteaz üretimini ise % 86 olarak belirlemişlerdir. 157 *P.aeruginosa* suşu kullanarak yapılan başka bir çalışmada proteaz üretimi % 95 olarak saptanmıştır (102). Babic ve arkadaşları (85) tobramisin subinhibitör konsantrasyonlarda QS ve bununla ilişkili çeşitli virulans faktörleri üretimine inhibitör etkisini araştırmışlar ve tobramisin *P.aeruginosa*'da proteaz enzimi üretimine etki etmediğini belirlemişlerdir. Bunun nedeninin tobramisin, *P.aeruginosa*'nın sahip olduğu QS sistemlerinden RhII/R sistemini inhibe ettiğini fakat proteaz enzimi

üretimini LasI/R QS sistemi tarafından kontrol edildiği için etki etmediğini belirtmişlerdir. Alipour ve arkadaşları (84) yaptıkları çalışmada tobramisin subinhibitör konsantrasyonlarında *P.aeruginosa* PAO1 suşunda çeşitli virulans faktörleri üretimine inhibitör etkisini araştırmışlardır. Tobramisin $\frac{1}{2}$ MİK değerinde proteaz üretimini önemli derecede azalttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda 120 *P.aeruginosa* suşu proteaz enzimi üretimi yönünden incelenmiş ve 76' sında (% 63,3) proteaz enzimi üretimi pozitif bulunmuştur. Ayrıca semi-kantitatif tarama yöntemi ile suşların proteolitik aktiviteleri hesaplanmıştır. Proteoliz oranı (Rp) 3,5' den büyük bulunanlar yüksek, 2,0-3,5 arası olanlar orta, 2,0' dan küçük olanlar da düşük proteolitik aktiviteye sahip olarak değerlendirilmiştir (75). Proteaz enzimi üretimi saptanan suşlarda, yüksek proteolitik aktiviteye sahip 6 (% 5) suş bulunmuştur. 61' i (% 50,8) orta ve 9' u (% 7,5) düşük proteolitik aktiviteli olarak belirlenmiştir. Ayrıca proteaz üretimi yönünden pozitif bulunan suşlar incelendiğinde 67' sinin (% 88) AHL molekülleri üretimi yönünden de pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular literatür bilgileri ile uyumlu olarak; proteaz enzimi üretiminin, AHL molekülleri varlığı ile ve bununla bağlantılı olarak QS sistemi ile yakın bir ilişkisinin bulunduğunu göstermiştir (23). Proteaz pozitif olarak belirlenen *P.aeruginosa* suşları arasından seçilen 25 *P.aeruginosa* suşunda kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda proteaz inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, antibiyotiksiz besiyerinde ve antibiyotik içeren besiyerinde belirlenen proteoliz oranları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kolistin subinhibitör konsantrasyonlarının 25 suşun 22'sinde (% 88), sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının ise tüm suşlar üzerinde (% 100) proteaz inhibitörü aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca kolistinli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları ile antibiyotiksiz besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında, sefepimli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları ile antibiyotiksiz besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında ve kolistinli ve sefepimli besiyerlerinde belirlenen proteoliz oranları arasında istatistiksel yönden ileri derecede anlamlı fark ($p<0,001$) olduğu belirlenmiştir. Sefepimin kolistine göre proteaz enzimi üretimine inhibitör etkisinin daha güçlü olduğu sonucuna varılmıştır.

P.aeruginosa “swimming” (yüzme), “swarming” (kayma), “twitching” (titreme) olmak üzere üç çeşit harekete sahiptir (16). Sıvı besin ortamlarındaki hareketi olan “swimming” (yüzme) hareketini kirpiği ile sağlar. Ayrıca şeker gibi ilgi duyduğu moleküllere kemotaksi hareketini de kirpiği ile gerçekleştirir. İnsanlarda ciddi

enfeksiyonlara neden olan *P.aeruginosa*, enfeksiyonun erken safhalarında konak dokuya ulaşma ve kolonizasyon için kirpiğini kullanır (9).

P.aeruginosa’ da “swimming” (yüzme) hareketinin belirlenmesine ilişkin çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşunda “swimming” (yüzme) hareketinin varlığı saptanırken bu suşun QS ile ilgili genlerinin mutasyonu ile oluşturulan mutant suşlarda “swimming” (yüzme) hareketinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (103). Nalca ve arkadaşları (86) yaptıkları çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşunda azitromisinin “swimming” (yüzme) hareketine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, azitromisinin *P.aeruginosa*’ da kirpik biyosentezini sağlayan çeşitli proteinlerinin ekspresyonunu azalttığını ve buna bağlı olarak swimming agar besiyerinde kirpik-bağımlı hareketin azaldığını belirlemişleridir. “Quorum Sensing” ve virulans faktörleri ile ilgili yaptığımız araştırmamızda, çalışma kapsamına aldığımız çeşitli klinik örneklerden izole edilen 120 *P.aeruginosa* suşu, “swimming” (yüzme) hareketi varlığı yönünden araştırılmış ve yapılan deneylerde “swimming” (yüzme) hareket özelliği pozitif bulunan suş sayısı 117 (% 97,5) olarak belirlenmiştir. “Swimming” (yüzme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlardan 90’ ının (% 76,9) AHL moleküllerini de ürettiği saptanmıştır. Bu bulgular literatürde de belirtildiği gibi, “swimming” (yüzme) hareketi ile AHL molekülleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir (23). “Swimming” (yüzme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar arasından seçilen 38’inde kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda “swimming” (yüzme) hareketine inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin 38 suşun 6 (% 15,7)’ sında, sefepim ise 15 (% 39,4)’ inde inhibitör etki göstermiştir. Sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının, kolistinin subinhibitör konsantrasyonlarına göre “swimming” (yüzme) hareketini istatistiksel yönden anlamlı derecede ($p<0,040$) daha yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir.

“Swarming” (kayma) hareketi; yarı katı, visköz yüzeylerde bakteri popülasyonlarının hızlı hareketi ya da sosyal hareket olarak nitelendirilir. Hareket etme yeteneğine sahip birçok bakteride hareket yönü kimyasal uyarılara doğru, kemotaksi şeklindedir (104). “Swarming” (kayma) hareketinin gerçekleşmesinde de ortamda, bakteriler tarafından salgılanan faktörler ve sinyal moleküllerinin artışı rol oynar. Doğal olarak “swarming” (kayma) hareketinin meydana gelmesinde bakterinin sahip olduğu kirpik rol oynamaktadır. *P.aeruginosa* da sahip olduğu kirpiği ile “swarming” (kayma)

hareketini sağlar. *P.aeruginosa*’ da “swarming” (kayma) hareketi QS sistemi aracılığı ile AHL molekülleri tarafından kontrol edilmektedir. *P.aeruginosa*’ da “swarming” (kayma) hareketi, özel besiyerindeki kültürde dendritik hücre toplulukları oluşturacak şekilde üreme ile fenotipik olarak görülebilmektedir. “Swarming” popülasyonu bir aktif zon olarak tanımlanabilir. Bu yüksek hücre yoğunluğu; besin, sinyal molekülleri ve bakteriler tarafından salgılanan faktörlerin konsantrasyonuna bağlı olarak “swarming” (kayma) hareketini destekler. Tanımlanan aktif zon asimetrik bir görüntüdür. Yani hücre yoğunluğu olduğu kadar kimyasal maddelerin konsantrasyonu da zon içinde eşit şekilde dağılmamıştır. (105).

P.aeruginosa suşlarındaki “swarming” (kayma) hareketinin belirlenmesine ilişkin çok sayıda araştırma yapılmıştır. Gupta ve arkadaşlarının (10) yaptıkları çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşu ve bu suşun çeşitli mutantları kullanılarak “swarming” (kayma) hareketine QS sisteminin etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. *P.aeruginosa* PAO1 suşunda “swarming” (kayma) hareketi gözlenirken, QS sistemi ile ilgili çeşitli genleri inaktive edilen mutant suşlarda ise, “swarming” (kayma) hareketinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada *P.aeruginosa* suşunda “swarming” (kayma) hareketi varlığı araştırılmış ve daha sonra besiyeri ortamına sentetik AHL molekülü ilave edilerek üretilen “swarming” (kayma) hareketinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak *P.aeruginosa*’ da “swarming” (kayma) hareketinin QS ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır (105). Babic ve arkadaşları (85) tobramisin subMİK konsantrasyonlarında “swarming” (kayma) hareketine inhibitör etkisini araştırmışlardır. *P.aeruginosa*’ nın antibiyotiksiz “swarming” (kayma) besiyerinde hareket oluşturduğunu, tobramisin ilave edilen ortamda “swarming” (kayma) hareketinin olmadığını, fakat besiyeri ortamına sentetik AHL molekülü ilave edildiğinde “swarming” (kayma) hareketinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar “swarming” (kayma) hareketinin QS sistemi ile ilişkili olduğunu ve tobramisin QS inhibisyonunu sağladığını göstermiştir. Çalışmamızda ise, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 120 *P.aeruginosa* suşu “swarming” (kayma) hareketi yönünden incelenmiş ve 82 suşda (% 68,3) bu hareketin varlığı belirlenmiştir. “Swarming” (kayma) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlardan 63’ ünde (% 76,8) AHL molekülleri üretimi de belirlenmiştir. Bu bulgular literatürde de belirtildiği gibi, “swarming” (kayma) hareketi ile AHL molekülleri arasında yakın bir ilişki olduğunu desteklemektedir (23). “Swarming” (kayma) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar

arasından seçilen 38 suş üzerinde kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin ve sefepim 38 suşun 26' sında (% 68,4) inhibitör etki göstermiştir. "Swarming" (kayma) hareketinin inhibisyonunda kolistin ve sefepimin etkinliği arasında fark olmadığı saptanmıştır.

Piluslar bakterinin kısa, filamentöz, ekstrasellüler yüzey yapılarıdır. Birçok klinik *P.aeruginosa* suşu Tip IV pilus taşır. *P.aeruginosa*' nın mukoza yüzeyine kolonizasyonu, epitel hücrelerine fimbriyaları ile tutunması sonucunda gerçekleşir. *P.aeruginosa*' da Tip IV pilus titreme olarak adlandırılan "twitching" hareketini sağlar. "Twitching" (titreme) hareketi QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Tip IV pili, kolonizasyon sırasında konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak patogeneizde önemli rol oynar.

P.aeruginosa' da "twitching" (titreme) hareketinin tespiti, Tip IV pilus varlığının bir göstergesidir. Tip IV pilus bu bakterinin hedef dokuya aderansını sağlayan ve dolayısıyla kolonizasyonu/enfeksiyonu başlatan önemli bir virulans faktörüdür. *P.aeruginosa*' da Tip IV pilus varlığında "twitching" (titreme) hareketinin oluşumu ve bu hareketin QS sistemi ile ilişkisini ortaya koyan çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşunda "twitching" (titreme) hareketinin varlığı saptanmış ve bu bakterinin Tip IV pilusa sahip olduğu belirlenmiştir. Daha sonra bu bakterinin çeşitli genetik yöntemlerle pilus geni mutasyona uğratarak elde edilen mutant suşlarında "twitching" (titreme) hareketinin olmadığı gözlemlenmiştir (14). Başka bir çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşunda "twitching" (titreme) hareketinin varlığı saptanırken bu suşun QS ile ilgili genlerinin mutasyonu ile oluşturulan mutant suşlarda "twitching" (titreme) hareketinin azaldığı belirlenmiştir (103). Glessner ve arkadaşları (15) "twitching" (titreme) hareketi ve QS sistemleri ile ilişkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada *P.aeruginosa* PAO1 suşunu kullanmışlar ve bu suşun *lasI* ve *rhII* genlerini inhibe ederek mutant suşlar oluşturmuşlardır. *P.aeruginosa* PAO1 suşunda koloninin etrafında sisli zon oluşumuyla "twitching" (titreme) hareketi gözlemlenirken, *rhII* geni mutasyona uğratılmış suşda zon oluşmamış, *lasI* geni mutasyona uğratılmış suşda ise, sisli zon çapında azalma belirlenmiştir. Hem *lasI* hem de *rhII* genleri mutasyona uğratılmış suşda ise zon oluşumu gözlemlenmemiş, fakat her iki geni mutasyona uğratılmış bu suşun bulunduğu besiyeri ortamına Las ve Rhl sistemleri tarafından üretilen sentetik 3-oxo-C12-HSL ve C4-HSL ilave edildiğinde sisli

zon ile “twitching” (titreme) hareketinin oluştuğu belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada tobramisinin subinhibitör konsantrasyonlarda “twitching” (titreme) hareketine inhibitör etkisi araştırılmış ve tobramisinin Tip IV pilus-bağımlı “twitching” (titreme) hareketini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (84). Çalışmamızda 120 *P.aeruginosa* suşunda “twitching” (titreme) hareketinin varlığı araştırılmış ve 64 (% 53,3)’ ünde “twitching” (titreme) hareketi ve dolayısı ile Tip IV pilus varlığı saptanmıştır. “Twitching” (titreme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar incelendiğinde 56’ sında (% 84,8) AHL molekülleri üretimi de pozitif bulunmuştur. “Twitching” (titreme) hareketi ile AHL molekülleri arasında, dolayısıyla QS sistemi ile yakın bir ilişki olduğunu gösteren bu bulgular, literatür bilgileriyle de uyumludur (23). Twitching” (titreme) hareketi yönünden pozitif bulunan suşlar arasından seçilen 38 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak kolistin ve sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarda inhibitör etkisi araştırılmıştır. Kolistin 38 suşun 34’ ünde (% 89,4), sefepim ise denenen tüm suşlarda (% 100) inhibitör etki göstermiştir. Sefepimin subinhibitör konsantrasyonlarının, kolistinin subinhibitör konsantrasyonlarına göre “twitching” (titreme) hareketini istatistiksel yönden ileri derecede anlamlı ($p<0,005$) olarak daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır.

P.aeruginosa ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan ve tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle bakterinin patogenezinde önemli rol oynayan QS sisteminin yeni bir tedavi stratejisi olabileceği düşünölmektedir. Yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı olarak QS inhibisyonunun bakteri hücrelerinde virulans genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virulansının azaltılmasının enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği düşünölmektedir. Elde edilen veriler; günümüzde bazı suşları çoğul antibiyotik dirençli ve hatta pan-rezistan olan *P.aeruginosa* suşlarının etken olduğu, (özellikle persistan ve kronik olmak üzere) enfeksiyonların tedavisindeki yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır.

Gelecekteki biyoteknolojik araştırmalar QS mekanizmasında iletişimi sağlayan ve patogenezin düzenlenmesinde rol oynayan moleküllerin tanımlanması ve tasarımına odaklanmaktadır. Tasarlanacak yeni antibakteriyel ilaçların, ya sinyal moleküllerini baskılayacak maddeler olması ya da bu maddeler ile beraber antibakteriyellerin birlikte kullanılması ile etkili olacağı düşünölmektedir. Aynı zamanda yine QS mekanizmasında

rol oynayan enzimlerin de antibakteriyel ilaçların tasarımında etkili olabilecek başka bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın verileri; özellikle sefepim olmak üzere, denenen her iki antibiyotiğin (sefepim ve kolistinin) subinhibitör konsantrasyonlarında çalışmada incelenen virulans faktörlerini atenüe edebildiği ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde bu antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonlarda bakterisit etkili başka antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılabileceğini ve tedavi başarısını yükseltebileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003; **22(15)**: 3803-3815.
2. Murray P.R, Baron E.J, Pfaller M.A. Editörler *Manual of Clinical Microbiology 8th ed.* Washington DC: American Society for Microbiology; 2003.
3. Gürler B, editör. *Tıbbi Mikrobiyoloji -3-*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
4. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med* 2010; **12**: 1-18.
5. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS* 2000; **97(16)**: 8789-8793.
6. Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau Gw, Miklos SM, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Topkins RG. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *PNAS* 2000; **97(16)**: 8815-8821.
7. Hoge R, Pelzer A, Rosenav F, Wilhelms S. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. 2010; 383-395. <http://www.formatex.info/microbiology2/contents.pdf>
8. Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infections. *Clin Rev Allerg Immunol* 2008; **35**: 124-134.

9. Wiener-Kronish JP, Pittet JF. Therapies against virulence products of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; **32(2)**: 228-235.
10. Gupta RK, Setia S, Harjai K. Expression of quorum sensing and virulence factors are interlinked in *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro approach. *Am J Biomed Sci* 2011; **3(2)**: 116-125.
11. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *J Hosp Infect* 1999; **43**: 211-218.
12. Delden CV, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; **4(4)**: 551-560.
13. Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *PNAS* 2004; **101(17)**: 6664-6668.
14. Darzins A. The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator *cheY*. *J Bacteriol* 1993; **175(18)**: 5934-5944.
15. Glessner A, Smith RS, Iglewski BH, Robinson JB. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol* 1999; **181(5)**: 1623-1629.
16. Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J Bacteriol* 2001; **183(4)**: 1195-1204.
17. Engel SE, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bio Chem* 1998; **273(27)**: 16792-16797.

18. Zhu H, Thuruthyil SJ, Willcox MDP. Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 1063-1070.
19. Costerton JV, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318-1322.
20. Reid G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 1999; **11**: 233-226.
21. Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 11229-11234.
22. Garcia-Aljaro C, Vargas-Cespedes GJ, Blanch AR. Detection of acylated homoserine lactones produced by *Vibrio* spp. and related species isolated from water and aquatic organisms. *J App Microbiol* 2011; **112**: 383-389.
23. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol* 2005; **13(1)**: 27-33.
24. Gera C, Srivastava S. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. *Curr Sci* 2006; **90(5)**: 666-676.
25. Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005; **7(4)**: 459-471.
26. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Inter J Med Microbiol* 2006; **296**: 149-161.
27. Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, Bycroft BW, Salmond GPC, Steward GSAB, Williams P. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 1992; **288**: 997-1004.
28. Camara M, Williams P, Hardman A. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* 2002; **2(11)**: 667-676.

29. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *J Lab Physicians* 2011; **3(1)**: 4-11.
30. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyj OD, Young JM. Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312(2)**: 417-423.
31. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; **46(4)**: 207-214.
32. Bhattacharyya I, Choudhury M. Quorum sensing-let bacteria talk. *Advanced Biotech* 2008; 30-33.
33. Winzer K, Hardie KR, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can’t talk now-gone to lunch!. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 216-222.
34. March JC, Bentley WE. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotech* 2004; **15**: 495-502.
35. Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allerg Immunol* 2008; **35**: 124-134.
36. Diggle SP, Gardner A, West SA, Griffin AS. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; **362**: 1241-1249.
37. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; **112(9)**: 1300-1307.
38. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol* 2010; **156**: 2271-2282.
39. Suga H, Smith KM. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Bio* 2003; **7(5)**: 586-591.
40. William P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 2007; **153**: 3923-3938.

41. Parsek MR, Val DL, Henzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 4360-4365.
42. Dobretsov S, Dahms HU, Yii H, Wahl M, Qian PY. The effect of quorum-sensing blockers on the formulation of marine microbial communities and larval attachment. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; **60(2)**: 177-188.
43. Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Camara M, Smith H, William P. N-acyl homoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature- and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2002; **70**: 5635-5646.
44. Leadbetter JR, Greenberg EP. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* 2000; **182(24)**: 6921-6926.
45. Dong YH, Gusti AR, Zhang, Xu JL, Zhang LH. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68(4)**: 1754-1759.
46. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; **43**: 101-109.
47. Ceyhan N. Klinikte biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri. *Turkish J Infect* 2008; **22(4)**: 227-240.
48. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; **55**: 165-199.
49. Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 2004; **53(6)**: 1563-1571.
50. Truchado P, Gil-Izquierdo A, Tomas-Barberan F, Allende A. Inhibition by chestnut honey N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009; **57**: 11186-11193.

51. Truchado P, Lopez-Galvez F, Gil MI, Tomas-Barberan FA, Allende A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem* 2009; **115**: 1337-1344.
52. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen, K  te M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 2005; **187(5)**: 1799-1814.
53. Musthafa KS, Ravi AV, Annapoorani A, Packiavathy IS, Pandian SK. Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the N-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 2010; **56**: 333-339.
54. Breidenstein EBM, Fuente-Nunez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trend Microbiol* 2011; **19(8)**: 419-426.
55. Mellbye B, Schuster M. The sociomicrobiology of antivirulence drug resistance: a proof of concept. *MBio* 2011; **2**: 1-4.
56. French GL, Philips I. Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. *Hosp Epidemiol Infect Control* 1999; 1243-64.
57. Arda B. Diren  li non-fermentatif gram negatif bakteri infeksiyonlarının tedavi ve y  netimi. *Ankem Derg* 2011; **25(2)**: 45-49.
58. G  ney M, Bedir O, Kılıç A, Ba  ustao  lu AC. GATA Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında hemokültür örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç durumları. *Gülhane Tıp Derg* 2011; **53**: 119-122.
59. Roux D, Ricard JD. Novel therapies for *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Disord Drug Targets* 2011; **11**: 389-394.
60. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos M, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43(6)**: 1379-1382.

61. Öztürk R. Çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ile oluşan infeksiyon hastalıklarında antimikrobik tedavi. *Ankem Derg* 2008; **22**: 36-43.
62. Aygün G. Yoğun bakım birimlerinde antibiyotik direnç problemi ve tedavide güncel durum: Nonfermentatifler (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*). *Türk Yoğun Bakım Derneği Derg* 2007; **5**: 25-28.
63. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. *Ankem Derg* 2005; **19**: 66-77.
64. Türk Dağı H, Arslan U, Fındık D, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *Ankem Derg* 2011; **25**: 107-110.
65. Paköz NİE, Doğan SŞ, Aral M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2011; **25(2)**: 73-78.
66. Atilla A, Eroğlu C, Esen Ş, Sünbül M, Leblebicioğlu H. Hastane kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 tipi beta-laktamaz sıklığının ve antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; **46(1)**: 1-8.
67. Akalın H. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları ve tedavisi. *Klimik* 2007; **13**: 208-214.
68. Sümer Ş, Dikici N. Kolistin. *Yoğun Bakım Derg* 2010; **9(4)**: 182-187.
69. Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Gülay Z, Arslan U, Nevgun SÖ, Bayramoğlu G, Berktaş M, Yalçın AN, Gencer S, Hoşoğlu S, Demiröz AP. Türkiye’ de yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo beta-laktamaz enzimlerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; **32(3)**: 687-93.
70. Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their

- application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Methods* 2001; **44**: 239-251.
71. Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G, Villena A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine. *Vet Microbiol* 2004; **101**: 167-176.
 72. Yazdeni R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M, Foroohesh H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *J Publ Health* 2006; **35(2)**: 25-28.
 73. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; **42**: 872-874.
 74. Huang YL, Ki JS, Lee OO, Qian PY. Evidence for the dynamics of acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J* 2009; **3**: 296-304.
 75. Nimitan E, Octavita A, Dunca S, Stefan M. Research studies on proteases producing *Bacillus* sp. strains. *G&BM* 2003; 10-13.
 76. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-first informational supplement. Wayne: CLSI document M 100-S21; 2011.
 77. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269-275.
 78. Steindler L, Bertani I, Sordi L, Schwager S, Eberl L, Venturi V. LasI/R and RhII/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *App Envirol Microbiol* 2009; **75(15)**: 5131-5140.
 79. Adonizio A, Kong KF, Mathee K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52(1)**: 198-203.
 80. Tielen P, Narten M, Rosin N, Biegler I, Haddad I, Hogardt M, Neubauer R, Schobert M, Wiehlmann L, Jahn D. Genotypic and phenotypic characterization

- of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int J Med Microbiol* 2011; **301(4)**: 282-292.
81. Haussler S, Becker T. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *PLOS Pathog* 2008; **4(9)**: 1-8.
 82. Mihalik K, Chung DW, Crixell SH, McLean RJC, Vattam DA. Quorum sensing modulators of *Pseudomonas aeruginosa* characterized in *Camellia sinensis*. *Asian J Trad Med* 2008; **3(1)**: 12-23.
 83. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52(10)**: 3648-3663.
 84. Alipour M, Suntres ZE, Lafrenie RM, Omri A. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 684-693.
 85. Babic F, Venturi V, Vlahovicek GM. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhII/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. *BMC Infect Dis* 2010; **10**: 148-160.
 86. Nalca Y, Jansch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Haussler S. Quorum-Sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50(5)**: 1680-1688.
 87. Köhler T, Perron GG, Buckling A, Van Delden C. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens* 2010; **6(5)**: 1-6.
 88. Tateda K, Comte R, Pechere JC, Köhler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45(6)**: 1930-1933.

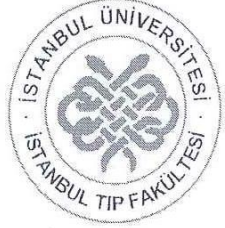
89. Cummins J, Reen FJ, Baysset C, Mooij MJ, O’Gara F. Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2009; **155**: 2826-2837.
90. Baykaral V, Baskın H, Bahar İH. Deneysel mikroçevre modelleme çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*’ nın farklı hücre dizilerinde çoğunluğu algılama ve biyofilm yanıtları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; **29(3)**: 637-642.
91. Karaman M, Yılmaz O, Baykaral V, Bahar İH. Gentamisin ve imipenem etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: in-vivo modelleme. *Ankem Derg* 2010; **24(2)**: 76-81.
92. Doğan Y, Bayrakal V, Bahar İH, Baskın H. Gentamisin varlığında *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu ve quorum sensing ilişkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; **37(3)**: 134-147.
93. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 18-29.
94. Pinto UM, Viana ES, Martins ML, Vanetti MCD. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food control* 2007; **18**: 1322-1327.
95. Stickler DJ, Morris NS, McLean RJC, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *App Envirol Microbiol* 1998; **64(9)**: 3486-3490.
96. Perez LR, Freitas AL, Barth AL. Cystic and non-cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are not differentiated by the quorum-sensing signaling and biofilm production. *Curr Microbiol* 2012; **64(1)**: 81-84.
97. Boşgelmez-Tınaz G, Ulusoy S, Arıdoğan B, Eroğlu F, Kaya S. N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiol Res* 2005; **160**: 399-403.
98. Çoban AY, Çiftçi A, Onuk EE, Erturan Z, Çaycı YT, Durupınar B. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm

- oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2009; **43(4)**: 563-573.
99. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011; **15(4)**: 305-311.
 100. Nagaveni S, Rajeswari H, Oli AK, Patil SA, Chandrakanth RK. Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscan* 2010; **5(4)**: 563-566.
 101. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Nassafi KA, Manos J, Elkins M, Bye P, Willcox M, Bell S, Wainwright C, harbour C. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007; **45(6)**: 1697-1704.
 102. Demir M, Cevahir N, Kaleli İ, Yıldırım U, Şahin R, Tepeli EÇ. Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2008; **42**: 197-208.
 103. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 841-853.
 104. Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J Bacteriol* 2001; **183(4)**: 1195-1204.
 105. Netotea S, Bertani I, Steindler L, Kerenyi A, Venturi V, Pongor S. A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an “activation zone”. *Biology Direct* 2009; **4(6)**: 1-16.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1018

Tarih : 30.05.2011

Konu : Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ hk,

Sayın Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi
İlgi : 14.04.2011 tarihli 419 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yük. Lis. Öğr. Zinnet YILMAZ'ın yürüteceği 2011/991-597 dosya numaralı "Klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında çeşitli antibiyotiklerin " Quorum sensing" e ve virulans faktörlerine etkisinin belirlenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 27.05.2011 tarihli 08 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SIGORTA		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
	İLAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 08	Tarih: 27.05.2011
	Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ ve Yük. Lis. Öğr. Bio. Zinnet YILMAZ'ın koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tez başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	İstanbul Üniversitesi İnsan Denekler Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi, 10 Aralık 2010 tarihli, T.C. Sağlık Bakanlığı İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	
ETİK KURUL ÜYELERİ	

ETİK KURUL ÜYELERİ									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E	X	K	E	H	X	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E		K	X	E	H	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E	X	K	E	H	X	T.Katılmadı.
Prof. Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E		K	X	E	H	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E	X	K	E	H	X	
Prof. Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E		K	X	E	H	
Uzm. Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araş. Hast. Biyokimya	E	X	K	E	H	X	
Prof. Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E		K	X	E	H	T.Katılmadı.
Doç. Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araş. Hast. İç Hast. 1. Dahiliye Kliniği	E	X	K	E	H	X	T.Katılmadı.
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Şişli Etfal E. ve Arş. Hst	E	X	K	E	H	X	
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	E	X	K	E	H	X	T.Katılmadı.
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E		K	X	E	H	
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	E	X	K	E	H	X	T.Katılmadı.
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	E	X	K	E	H	X	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İSTANBUL KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hulusi Behçet Kütüphanesi Kat 3 Çapa Fatih/İstanbul 34380
TELEFON	0 212 414 20 00 – 313 46
FAKS	0 212 414 21 53
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında çeşitli antibiyotiklerin " Quorum sensing" e ve virulans faktörlerine etkisinin belirlenmesi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	-			
	EUDRACT NUMARASI	-			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	AKADEMİK AMAÇLI (X)		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2			
		FAZ 3			
		FAZ 4			
		BE/BY			
DİĞER		Diğer ise belirtiniz:			
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA		Belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ (X)	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.04.2011	1	TürkçeX	İngilizce	Diğer
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe	İngilizce	Diğer
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	29.04.2011	1	TürkçeX	İngilizce	Diğer
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	İngilizce	Diğer

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ZİNNET	Soyadı	YILMAZ
Doğ.Yeri	ÜSKÜDAR	Doğ.Tar.	08.02.1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	32951379874
Email	znnetylmz@hotmail.com	Tel	05443499867

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	2012
Lisans	KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	2009
Lise	SEMİHA ŞAKİR LİSESİ	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	iyi	orta	orta	67,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74	74	74
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):