

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEMİR ŞELATÖRLERİ KOJİK ASİT, LİPOİK ASİT VE PİKOLİNİK  
ASİTİN *Pseudomonas aeruginosa*'da BİYOFİLM OLUŞUMUNA  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kübra ÇEVİK**

**Danışman  
Doç. Dr. Seyhan ULUSOY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2014**

© 2014 [Kübra ÇEVİK]

## TEZ ONAYI

**Kübra ÇEVİK** tarafından hazırlanan "**Demir Şelatörlerinden Kojik Asit, Lipoik Asit ve Pikolinik Asitin Pseudomonas aeruginosa'da Biyofilm Oluşumuna Etkisinin Araştırılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**

**Doç. Dr. Seyhan ULUSOY**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

**Yrd. Doç. Dr. Arzu KART**  
Marmara Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

**Yrd. Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Ahmet ŞAHİNER**

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Kübra ÇEVİK**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	3
2.2. <i>P. aeruginosa</i> Virülens Faktörleri .....	4
2.2.1. Elastaz .....	4
2.2.2. Piyosiyanin .....	4
2.2.3. Piyoverdin.....	5
2.2.4. Biyofilm.....	5
2.3. Şelatörler.....	7
2.3.1. Lipoik Asit .....	7
2.3.2. Pikolinik Asit.....	7
2.3.3. Kojik Asit .....	7
2.3.4. 2,2'-Bipiridil .....	8
3. MATERYAL METOT.....	8
3.1. Kullanılan Besiyerleri ve Bakteriyal Suşlar .....	8
3.2. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-Bipiridil'in Potansiyel Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitörü Özelliklerinin İncelenmesi.....	8
3.2.1. Quorum Sensing Selector Strain 1 (QSS1) Testi .....	8
3.2.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> 'da Viyolasin Üretimine Etkisi .....	9
3.3. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-Bipiridil'in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İçin Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi.....	10
3.4. Büyüme Eğrisi Oluşturulması .....	10
3.5. Biyofilm Testi .....	11
3.5.1. Şelatlanan Demir Solüsyonlarının Hazırlanması.....	11
3.6. Kayma Hareketi Testi.....	11
3.7. Elastaz Üretim Testi.....	12
3.8. Piyosiyanin Üretim Testi .....	12
4. BULGULAR.....	14
4.1. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in QSS1 ile Testi.....	14
4.2. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in <i>Chromobacterium Violaceum</i> 'da Viyolasin Üretimine Etkisi.....	14
4.3. Büyüme Eğrisi.....	16
4.4. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in Biyofilm Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi .....	17
4.5. FeCl <sub>3</sub> 'ün Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil ile Şelatlandıktan Sonra Biyofilm Oluşumuna Etkisi.....	28
4.6. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in Kayma Hareketine Etkisi .....	32

4.7. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in Elastaz Üretimine Etkisi .....	38
4.8. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in Piyosiyanın Üretimine Etkisi Etkisi.....	49
5. TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR .....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	63

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## DEMİR ŞELATÖRLERİNDEN KOJİK ASİT, LİPOİK ASİT VE PİKOLİNİK ASİTİN *Pseudomonas aeruginosa*'DA BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra ÇEVİK

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

Bu tez çalışmasında, demir şelatörleri kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asitin inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çevreyi algılama sistemi (QS) inhibisyonu, *Chromobacterium violaceum* O26 (CVO26) ve *C. violaceum* VIR07 suşlarında viyolesin pigmenti üretimi ile test edilmiştir. Şelatörlerin, *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlarda biyofilm oluşumu, elastaz, piyosiyenin üretimi ve kayma hareketi üzerine etkileri ayrıca araştırılmıştır.

Kojik, lipoik ve pikolinik asit *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar (*P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK03) için sırasıyla %5-27, %7-28, %24-33 oranında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Test ortamına FeCl<sub>3</sub> (100µM) eklendiği zaman inhibisyon oranları %39-57, %40-55, %50-57 olarak tespit edilmiştir.

Lipoik asitin *P. aeruginosa* 'da biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerine inhibitör etkisi ilk kez rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, lipoik asit ve pikolinik asitin biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit, biyofilm

2014, 63 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### INVESTIGATING EFFECTS OF IRON CHELATORS KOJIC ACID, LIPOIC ACID AND PICOLINIC ACID ON BIOFILM FORMATION OF *Pseudomonas* *aeruginosa*

Kübra ÇEVİK

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seyhan ULUSOY

In this study the inhibitory effects of iron chelators kojic acid, lipoic acid, and picolinic acid were investigated. QS inhibition was measured in violacein pigment producing *Chromobacterium violaceum* O26 (CVO26) and *C. violaceum* VIR07. And the effects of chelators on biofilm formation and elastase, pyocyanin production, swarming motility of *P. aeruginosa* PA01 and clinical isolates were also examined.

Kojic, lipoic and picolinic acids have inhibited biofilm formation in *P. aeruginosa* PA01 and three clinical isolates (*P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK03) by 5-27%, 7-28%, 24-33%, respectively. When the FeCl<sub>3</sub> (100µM) is added to the test medium inhibition percentage were 39-57%, 40-55%, 50-57%.

Inhibitory effect of lipoic acid on biofilm formation and swarming motility in *P. aeruginosa* has been reported for the first time. These results showed that lipoic acid and picolinic acid may provide an alternative for the treatment of biofilm infections.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, kojic acid, lipoic acid, picolinic acid, biofilm

**2014, 63 pages**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, hoş görü ortamı içerisinde, değerli tecrübe ve destekleriyle bana yol gösteren, değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin imkanlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Sayın Müdürümüz Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen laboratuar personeli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışma arkadaşlarım sevgili Pınar OLGUNSOY, Ramadan Bilgin AKALIN, Halime ÇEVİKBAŞ ve Erdi DOĞRU'ya destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

3347-YL2-12 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Kübra ÇEVİK  
ISPARTA, 2014

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Biyofilm gelişim aşamaları ve aşamaların elektron mikroskop görüntüleri .....	6
Şekil 2. Kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in QSI 1 testi sonucunda besiyeri üzerindeki görüntüsü.....	14
Şekil 3. Agar difüzyon yöntemi ile <i>C. violaceum</i> (VIR07)'de viyolasin üretimine kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in inhibitör etkisi .....	15
Şekil 4. Agar difüzyon yöntemi ile <i>C. violaceum</i> (CV026)'da viyolasin üretimine kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in inhibitör etkisi .....	15
Şekil 5. <i>P. aeruginosa</i> PA01 için kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit 8mM, 4mM, 2mM, 1mM, 2,2'-bipiridil için ise 1mM, 0,5mM, 0,25mM, 0,125mM derişimlerde(a, b, c, d) hazırlanmış büyüme eğrisi .....	16-17
Şekil 6.1. <i>P. aeruginosa</i> PA01suşunun biyofilm oluşumu.....	18
Şekil 6.2. <i>P. aeruginosa</i> PA01suşunun 600nm'deki absorbans değerleri.....	19
Şekil 6.3. <i>P. aeruginosa</i> PAK01klinik izolatının biyofilm oluşumu .....	21
Şekil 6.4. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 klinik izolatının 600nm'deki absorbans değerleri.....	22
Şekil 6.5. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatının biyofilm oluşumu .....	23
Şekil 6.6. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatının 600nm'deki absorbans değerleri.....	24
Şekil 6.7. <i>P. aeruginosa</i> PAK03klinik izolatının biyofilm oluşumu .....	26
Şekil 6.8. <i>P. aeruginosa</i> PA03 klinik izolatının 600nm'deki absorbans değerleri.....	27
Şekil 7.1. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1)solüsyonlarının <i>P. aeruginosa</i> PA01 için biyofilm oluşumuna etkisi .....	28
Şekil 7.2. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1)solüsyonlarının <i>P. aeruginosa</i> PAK01 için biyofilm oluşumuna etkisi .....	29
Şekil 7.3. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1)solüsyonlarının <i>P. aeruginosa</i> PAK02 için biyofilm oluşumuna etkisi .....	30
Şekil 7.4. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1)solüsyonlarının <i>P. aeruginosa</i> PAK03 için biyofilm oluşumuna etkisi .....	31
Şekil 8.1. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşu için kayma hareketi .....	32
Şekil 8.2. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunda, kontrol (a) ve lipoik asit (4mM) eklenmiş(b) petrilerde kayma hareketi.....	33
Şekil 8.3. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 klinik izolatu için kayma hareketi .....	34
Şekil 8.4. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatu için kayma hareketi .....	35
Şekil 8.5. <i>P. aeruginosa</i> PAK03 klinik izolatu için kayma hareketi .....	36
Şekil 9.1. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşu için elastaz aktivitesi.....	39
Şekil 9.2. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun 600nm'deki absorbans değerleri.....	40
Şekil 9.3. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 klinik izolatu için elastaz aktivitesi.....	41

Şekil 9.4. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 klinik izolatu için 600nm'deki absorbands değerleri.....	42
Şekil 9.5. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatu için elastaz aktivitesi.....	44
Şekil 9.6. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatu için 600nm'deki absorbands değerleri.....	45
Şekil 9.7. <i>P. aeruginosa</i> PAK03 klinik izolatu için elastaz aktivitesi.....	46
Şekil 9.8. <i>P. aeruginosa</i> PAK03 klinik izolatu için 600nm'deki absorbands değerleri.....	47
Şekil 10.1. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşu için piyosiyanın üretimi .....	49
Şekil 10.2. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 klinik izolatu için piyosiyanın üretimi .....	51
Şekil 10.3. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 klinik izolatu için piyosiyanın üretimi .....	52
Şekil 10.4. <i>P. aeruginosa</i> PAK03 klinik izolatu için piyosiyanın üretimi .....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	Açıl Homoserin Lakton
BHL	N-butanoyil-L-homoserin lakton
C4HSL	N-butanoyil-L-homoserin lakton
ECR	Elastin Congo Red
HHL	N-hekzanoyil-L-homoserin lakton
LB	Luria-Broth
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
OdDHL	N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton
QS	Quorum Sensing
tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
X-gal	5-Bromo-4-Kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranosid
$\mu$ l	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negatif, biyofilm oluşturan, bağışıklığı baskılanmış kistik fibrozlu ve yanıklı bireylerde biyofilm kaynaklı enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir insan patojenidir. *P. aeruginosa* virülens faktörlerinin üretimini (elastaz, ramnolipit, piyosiyenin, proteaz) ve biyofilm oluşumunu kontrol etmek için, Açıl homoserin lakton aracılı çevreyi (çoğunluğu) algılama sistemi olarak bilinen bir çeşit hücreler arası iletişim mekanizması kullanır. Bu organizmada çevreyi algılama sistemi las ve *rhl* sistemleri olarak bilinen birbirleriyle ilişkili iki majör sistemden oluşur. las sisteminde lasI *N*-3-okso-dodekanoyil-homoserin lakton (3-oxo-C12-HSL) sinyal molekülünü kodlar ve LasR bu moleküle bağlanarak elastaz, LasA proteaz, alkalin proteaz ve ekzotoksin A üretiminin kontrolünü sağlar. *rhl* sisteminde, *rhlI* *N*-butanoyil-homoserin lakton (C4-HSL) sinyal molekülünü kodlar ve RhIR bu moleküle bağlanarak ramnolipit, elastaz, LasA proteaz, piyosiyenin ve siderefor üretiminin kontrolünü sağlar (Ochsner vd., 1994; Deizel vd., 2003; Musk vd., 2005; De Kievit, 2008).

*P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi ile biyofilm oluşumunun/gelişiminin yakından ilişkili olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Ochsner vd., 1994; Deizel vd., 2003; De Kievit, 2008; Jiricny vd., 2014). Bu fırsatçı patojen, kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde antibiyotik dirençli biyofilmler oluşturan, tartışmasız üzerinde en fazla çalışma yapılan organizmadır. Kronik *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilm enfeksiyonları, kistik fibroz hastalarında morbidite ve mortalitenin büyük bir oranının sebebi durumundadır (Van Delden ve Iglewski, 1998; Costerton vd., 1999; Parsek ve Singh, 2003; Banin vd., 2005; Oglesbay vd., 2008; Braud vd., 2009). Bu hastalarda bu enfeksiyonlar konağın savunma sistemi ve antibiyotik tedavisi tarafından eradike edilemez, bu yüzden biyofilm oluşturan patojenlerin engellenmesi için yeni metotlara acilen ihtiyaç vardır.

*P. aeruginosa* da gelişme ve biyofilm oluşumu için demire ihtiyaç duyar (Glick vd., 2010). Dahası demir *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmlerin daha kararlı olmasını sağlar (Braun ve Hantke, 1997; Lamont vd., 2002). *P. aeruginosa* demirin kısıtlı olduğu ortamlarda demiri kullanabilmek için piyoverdin ve piyoselin

moleküllerini üretir (Neilands, 1995). Bu şelatör moleküller konakta transferin ve laktoferrin molekülleri ile yarışır. Laktoferrin uygulamasının *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Musk vd., 2005; Musk ve Hergenrother, 2008).

Transferin ve laktoferrin demiri güçlü bir şekilde bağlayarak bakterilerin demiri kullanımını kısıtlamaktadır (Wooldridge ve Williams, 1993). Yapılan çalışmalarda laktoferrinin, bakterilerin demir kullanımını engelleyerek *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Singh vd., 2002). Çoğu bakteride demir  $10^{-7}$  ile  $10^{-5}$  M arasında bir fizyolojik konsantrasyonda gerekli olmasına rağmen, konak hücrede serbestçe kullanılamaz (Huston vd., 2003). Konakta serbest demirin eksikliği karşısında patojen bakteriler, konaktan demir elde etmek için bir dizi sistem geliştirmiştir (Wooldridge ve Williams, 1993; Braun, 2001; Huston vd., 2003). Bunlardan birisi de Fe(III) için yüksek afiniteye sahip düşük molekül ağırlıklı siderofor salgılamaktır.

Sulu ortamlarda çözünmüş bulunan demir seviyesi, iyonların hücre içine pasif difüzyon ile alınması gereken demir için çok düşüktür (Griffiths, 1987). Bakteriler bu problemi çözmek için kullandıkları stratejilerden en yaygını siderofor olarak adlandırılan demiri şelatlayabilen moleküllerin üretilmesidir (Guerinot, 1994). Ortamdaki ferrik iyon şelatları ve ferrisiderofor kompleksleri spesifik hücre yüzeyi reseptör proteinleri aracılığı ile bakteriler tarafından alınır (Lamont vd., 2002). Demir hücre proteinlerine dahil edilmek için ferrisiderofor kompleksinden salınır (Lamont vd., 2002).

Tanımlanmış yaklaşık 500 siderofor vardır ve çoğu bakteri cinsi siderofor üreticisi içerir (Drechsel & Winkelmann, 1997).

Demirin şelatlanmasının, *P. aeruginosa*' da hücreleri öldürmeden, biyofilm oluşumunun engellenmesi veya bozulması için umut verici yeni bir tedavi olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında, *P. aeruginosa*'da elastaz, piyosiyenin üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerine demir şelatörleri 2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik

asit ve pikolinik asitin etkileri incelenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşunda ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarında (*P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02 ve *P. aeruginosa* PAK03) biyofilm oluşumu 2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit eklenerek ayrıca FeCl<sub>3</sub> şelatlanarak etkileri incelenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Musk ve Hergenrother (2008) tarafından yapılan çalışmada; pikolinik asit, kojik asit, asetohidroksamik asit ve ferrik amonyum sitrat kullanılarak, demir: şelatör oranı 3:1 (300µl kimyasal: 100µl FeCl<sub>3</sub>) olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır ve 250µM l<sup>-1</sup> pikolinik asit: FeCl<sub>3</sub> karışımının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine %50 ve daha fazla inhibitör etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Musk, vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada; demir şelatörleri (ferrik sülfat, sodyum sitrat, sitrik asit, amonyum sitrat ve ferrik amonyum sitrat) kullanılarak *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. *P.aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu bakteri gelişimini engellemeden, ferrik amonyum sitratın %40 oranından fazla inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonadaceae* ailesi *Pseudomonas* cinsine ait, Gram-negatif, suda ve toprakta yaşayan bir bakteridir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde (yanıklı ve kistik fibrozisli hastalarda) ciddi enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir insan patojenidir (Van Delden ve Iglewski, 1998; Costerton vd., 1999; Parsek ve Singh, 2003; Banin vd., 2005; Oglesbay vd., 2008; Braud vd., 2009).

*P. aeruginosa*; sabun, göz damlası, diyaliz sıvıları, solunum cihazları, ilaçlar, uygun koşullarda bekletilmeyen ağız açık dezenfektanlar, temizlik bezleri ve fırçalar, havalandırma cihazları, lavabolar, duş başlıkları ile hasta odalarındaki çiçekler

aracılığı ile bulaşabilmekte ve hastana enfeksiyonlarının %10-30'undan sorumlu tutulmaktadır (Çiftçi vd., 2005; Gazi vd., 2006; Topçu Albayrak, 2008; Özdemir vd., 2009).

*P. aeruginosa*'nın nemli ortamları sevmesi, fiziksel ortamlara dayanıklı olması, üreyebilmesi için oldukça az besine ihtiyaç duyması, antiseptiklerden birçoğuna ve antibiyotiklere dirençli olması, distile suda dahi üreyebilmesi, bu mikroorganizmanın dış ortamlarda ve özellikle hastane ortamında yaşamasını kolaylaştırmaktadır (Berктаş vd., 2011).

## **2.2. *P. aeruginosa* VİRÜLENS FAKTÖRLERİ**

### **2.2.1. ELASTAZ**

Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur, enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalarlar. LasA bir serin metalloproteinazdır, LasA proteaz elastini yıkamaz ancak LasB elastazın elastolitik etkisini artırır. LasB bir çinko metalloproteinazdır ve LasA proteazın yıprattığı elastini parçalar (Mori-hara, 1964; Doring, vd., 1981; Mori-hara ve Homma 1985).

### **2.2.2. PİYOSİYANİN**

*P. aeruginosa* tarafından üretilen mavi renkli bir pigmenttir. Piyosiyanın üretimi gelişme ortamına bağlı olup ortamdaki yüksek fosfat konsantrasyonlarında artarken, stoklanan kültürlerde pigment oluşturma özelliklerini kaybedebilirler (Topçu Albayrak, 2008). *P. aeruginosa*'nın suda eriyen piyoverdin pigmenti ile suda ve kloroformda eriyen piyosiyanın pigmentinin birleşmesi sonucu karakteristik parlak yeşil rengi ortaya çıkar (Topçu Albayrak, 2008).

### 2.2.3. PİYOVERDİN

Piyoverdinin asıl bileşeni, kompozisyonu türe göre değişen siklik peptide bağlı kinolin kromoforudur. Çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlayan bir siderofordur (Meyer ve Hornsperger, 1978).

*P. aeruginosa*'ya ait piyosiyenin, çeşitli flüoresan ve flüoresan olmayan *Pseudomonas*'lar arasında bulunan en belirgin pigment grubudur (Meyer ve Hornsperger, 1978).

### 2.2.4. BİYOFİLM

Costerton ve arkadaşları (1999), bakteri tarafından üretilen ve bakterinin cansız veya canlı yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarit tabiatında "glikokaliks" olarak da adlandırılan polimerik matriks olarak tanımlarken; Elder ve arkadaşları (1995), mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik olarak, Carpentier ve Cerf (1993) ise çok basitçe, bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olarak tanımlamıştır.

Biyofilmin en yeni tanımı ise mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve biyofilm oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (Donlan ve Costerton, 2002).

Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır (Uludağ Altun ve Şener, 2008).

Biyofilmin oluşması; sistem yapısına, mikroorganizma türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak birkaç saat ile birkaç hafta sürebilir.

Biyofilm oluşma basamakları;

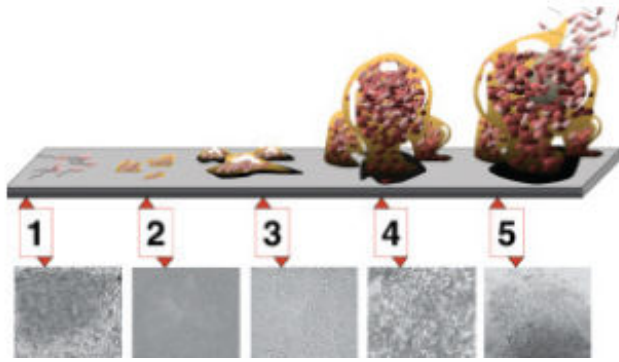
1-Mikroorganizmanın yüzeye tutunması

2-Geri dönüşümsüz tutunma

3- 1. Olgunlaşma evresi

4- 2. Olgunlaşma evresi

5- Dağılıma ęeklindedir.



Şekil.1. Biyofilm gelişim aşamaları ve aşamaların elektron mikroskop görüntüleri: 1) İlk tutunma, 2) Geri dönüşümsüz tutunma, 3) 1. Olgunlaşma devresi, 4) 2. Olgunlaşma devresi 5) Dağılıma (http1)

Biyofilm oluşumu *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilir. Çevreyi algılama sistemi, bakteriyeye oldukça fazla avantaj kazandırır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir (Uludağ Altun ve Şener, 2008). Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, infeksiyon sırasında virülens faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçılabılır (Uludağ Altun ve Şener, 2008).

Ortamda besin kısıtlanması sonucu eksprese olan çevreyi algılama sistemi moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O<sub>2</sub> perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite gibi çevresel faktörler biyofilm gelişiminde çok etkilidir (Sakarya, 2005).

Kistik fibrozis gibi hastalıkların oluşmasındaki en önemli etkenlerden biri *P. aeruginosa* biyofilmidir. Yapılan son çalışmalar, bakteri büyümesi için yeterli demir ile bu metal seviyelerinin biyofilm gelişmesi için bir sinyal olarak görev yaptığını göstermiştir (Singh vd., 2002).

Ortamda mevcut demir miktarının azaltılması *P.aeruginosa* biyofilm gelişimini etkileyebileceği için biyofilm oluşumuna müdahale edilmesinde potansiyel bir araç olarak önerilmiştir (Banin vd., 2006; Musk vd., 2005). Ayrıca demir, *P.aeruginosa* biyofilm gelişimi için çevresel bir sinyal görevi görmektedir (Glick vd., 2010).

## **2.3. ŞELATÖRLER**

### **2.3.1. LİPOİK ASİT**

Vitamin benzeri bir antioksidan olan Alpha lipoik asit, suda ve yağda çözünebildiği için genel antioksidan olarak adlandırılmaktadır. FDA tarafından onaylı olan alfa lipoik asitin, HIV enfeksiyonlarında, karaciğer hastalıklarında, glokom gibi göz hastalıklarında, diyabetli hastaların sinir hasarlarının hafifletilmesinde ve yaşlanma etkilerine karşı beyin hasarlarını hafifletmeye yardımcı olduğu bilinmektedir (Karaca, 2009; <http2>).

### **2.3.2. PİKOLİNİK ASİT**

Pikolinik asit, triptofan katabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak insan vücudu tarafından üretilir (Bosco vd., 2003). Yüksek konsantrasyonlarda toksik değildir ve ferrik pikolinat insanlarda demir eksikliğinin çeşitli formlarda tedavisi için ilave demirin popüler bir formudur (Musk ve Hergenrother, 2008).

### **2.3.3. KOJİK ASİT**

Kojik asit; 1989 yılında Japonya'da keşfedilmiştir ve çeşitli mantar türlerinden, özellikle *Aspergillus oryzae* tarafından üretilen bir şelatördür (Yabuta, 1924; Bentley, 2006). Kojik asitin, kozmetikte pigment açıcı olarak kullanılmasından ziyade antibakteriyel ve antioksidan özellikleri de bilinmektedir. Ayrıca, demir iyonları ile parlak kırmızı bir kompleks oluşturur.

### **2.3.4. 2,2'-BİPİRİDİL**

Pek çok geçiş metali ile kompleks oluşturan bir şelatördür. Genellikle demir tayini için kullanılır.

## **3. MATERYAL METOT**

### **3.1. KULLANILAN BESİYERLERİ VE BAKTERİYEL SUŞLAR**

Tez alışması kapsamında ABT, Müller Hilton II Agar, Müller Hilton Broth ve Luria Bertani (LB) besi yerleri kullanılmıştır.

Çalışma sırasında kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil moleküllerinin çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör etkilerinin test edilmesi basamağında referans olarak QSIS1 biyosensör suő kullanılmıştır. Viyolasin pigment üretimi testinde ise *Chromobacterium violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07 suşları kullanılmıştır.

Çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen virülens faktörleri retimi (Elastaz ve piyosiyanın), biyofilm oluşturma ve kayma hareketi üzerine, kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil moleküllerinin inhibitör etkilerinin araştırıldığı testlerde ise; *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK03 klinik izolatları ile pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PA01 suşu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri suşları Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü bakteri stoğundan temin edilmiştir.

### **3.2. KOJİK ASİT, LİPOİK ASİT, PİKOLİNİK ASİT VE 2,2'-BİPİRİDİL'İN POTANSİYEL ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ İNHİBİTÖRÜ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

#### **3.2.1. QUORUM SENSING SELECTOR STRAIN 1 (QSIS1) TESTİ**

QSIS1 mutant bakterisi, sinyal moleküllerinin bulunduğu ortamda yaşayamayıp, çevreyi algılama sistemi inhibitörlerinin (QSIs) etkinliğini gösterdiği ortamda yaşayabilmektedir (Bjarnsholt, vd., 2010). Bu bakteri *Escherichia coli* 1100'n laktoz

pozitif suşuna *V. fischeri*'nin *luxRI* QS taşıyan pTBR2iB plazmidinin klonlanmasıyla oluşturulmuştur (Rasmussen vd., 2005). *luxI* promotorunun kontrolü altında hücreye eklenen fosfolipaz A proteinini kodlayan gen (*phlA*) sentezlendiği takdirde hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Eğer ortamda toksik olmayan çevreyi algılama inhibitörü mevcut ise *phlA* sentezlenemez ve hücre gelişimine devam eder (Bjarnsholt vd., 2010).

ABT besi yerine %0,5 glikoz, %0,5 kosamino asit (2,5 mg/litre Tiamin içeren AB ortamı) eklenmiş ve 3-Oxo-C6-HSL (Sigma-Aldrich) (200 nM), ampisilin (100 ppm), 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-D-galaktopiranozit (X-Gal, Sigma-Aldrich) (80 ppm), isopropil-D-tiyogalakatozit (IPTG, Sigma-Aldrich) (100 µM) de belirtilen son derişimlerde eklenerek çalışılmıştır. ABT besi yerine gecelik QGIS 1 kültüründen ilave edilerek petrilere dökülmüştür. Besi yeri katılaşınca pastör pipeti ile kuyucuklar açılmış ve kuyucuklara 50 şer µl 2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit yüklenmiştir. 30°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kuyucukların etrafında oluşan yeşil zon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Rasmussen vd., 2005).

### 3.2.2. *Chromobacterium violaceum*'da Viyolasin Üretimine Etkisi

Kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in çevreyi algılama sistemine inhibitör etkileri *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 biyoindikatör suşları kullanılarak incelenmiştir. Bunun için LB Broth içerisinde % 0,5 lik agar olacak şekilde katı besiyeri hazırlanmıştır. Pigment üretimlerini engellemek için ortama sinyal molekülleri eklenmiştir. *C. violaceum* 026 suşu için HHL sinyal molekülü 10 kat, *C. violaceum* VIR07 suşu için ise OdDHL sinyal molekülü 20 kat seyreltilerek kullanılmıştır. LB agar bulunan petrilere her birine hazırlanan besi yerinden 5'er ml dökülmüştür ve sonrasında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklara 50 şer µl 2,2'-Bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit yüklenerek 30°C de bir gece inkübe edilmiştir.

### **3.3. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-Bipiridil'in *Pseudomonas aeruginosa* için Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi**

96'lık mikropkakanın her bir kuyucuğuna, 155µl Müller Broth II besi yeri, 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış *Pseudomonas aeruginosa* PA01 kültüründen 20µl ve son derişimleri 30mM, 15mM, 7,5mM, 3,25mM, 1,625mM 0,8125mM, 0,406mM ve 0,203mM olacak şekilde seyreltilen kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-Bipiridil'den 5'er µl eklenmiştir. 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir (Hammer vd., 1999). İnkübasyon sonrasında MIK değerini tespit etmek için örnek sayısı kadar Müller Agar II katı besi yeri hazırlanmıştır ve petri kaplarının üzerine derişimleri yazılarak bölmelere ayrılmıştır. İnkübasyon sonrası mikropkadaki kültürler hazırlanan petrilerdeki uygun bölmelere 5µl damlatılmış ve 37°C'de 1 gece inkübe edilerek en uygun derişim belirlenmiştir.

### **3.4. BÜYÜME EĞRİSİ OLUŞTURULMASI**

96 kuyucuklu mikropkaka kullanılarak büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Her bir kuyucuğa 172µl LB Broth besi yeri, 5µl (2,2'-Bipiridil, kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit) ve LB Broth besiyerinde üretilen *P. aeruginosa* PA01 bakteri kültürü yoğunluğu 600nm de okunmuş ve 0,05 e seyreltilerek 3µl eklenmiştir. Kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asitin her birinden 8mM, 4mM, 2mM, 1mM derişimlerde ve 2,2'-Bipiridil den ise 1mM, 0,5mM, 0,25mM ve 0,125mM derişimlerde olacak şekilde eklenmiştir. Mikropkaka, 37°C de inkübasyona bırakılmış ve her yarım saatte bir Epoch marka mikropkaka okuyucuda 600nm de okutulmuş, veriler kaydedilmiştir.

### 3.5. BİYOFİLM TESTİ

*P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar LB Broth besiyerinde üretilmiştir. Biyofilm testi için O'Toole ve Kolter (1998) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 0,5 McFarland bulanıklığa eş değer bulanıklıkta kültür 50µl test tüplerine eklenmiştir. Son derişimleri 2,2'-bipiridil 0,125mM, kojik asit 2mM, lipoik asit 4mM, pikolinik asit 2mM ve FeCl<sub>3</sub> 100 µM olacak şekilde test tüplerine eklenmiştir. 37°C'de 1 gece inkübe edildikten sonra 600nm'de hücre yoğunlukları ölçülmüştür. Tüplerin içindeki kültür dökülmüş ve saf su ile 3 kere yıkandıktan sonra %1lik kristal viyole çözeltisi eklenerek 30dk bekletilmiştir. Kristal viyole çözeltisi de saf su ile 3 kere yıkandıktan sonra etanol eklenerek ve 15 dk beklenerek 570nm'de absorbansları ölçülmüştür. Çalışma sırasında 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit eklenmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 3.5.1. Şelatlanan Demir Solüsyonlarının Hazırlanması

2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit şelatörlerinin her birinden 50mM lık ve FeCl<sub>3</sub>'den 50mM lık stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden, şelatör:demir oranı 3:1 (300ml kimyasal+100ml FeCl<sub>3</sub>) oranında karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır (Musk ve Hergenrother, 2008). Biyofilm testi için, hazırlanan solüsyonların son derişimleri 100µM ve 250µM olacak şekilde test tüplerine eklenmiştir. Biyofilm testi O'Toole ve Kolter (1998)'e göre uygulanmıştır.

### 3.6. KAYMA HAREKETİ TESTİ

*P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar LB Broth besiyerinde üretilmiştir. 2,2'-Bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit'in her biri ve kontrol grubu için 45ml saf suya 0,4gr LB Broth ve 0,25gr Noble agar eklenerek besiyeri hazırlanmıştır. Son derişimi %0.5 olacak şekilde glikoz otoklavlandıktan sonra besiyerine eklenmiştir. 2,2-

bipyridyl 0,125mM, kojik asit 2mM, lipoik asit 4mM, pikolinik asit 2mM ve FeCl<sub>3</sub> 100 µM eklenmiştir. Petrilere dökülen besiyeri katılaştıktan sonra santrifüj edilen günlük bakteri kültüründen 5'er µl damlatılmıştır. 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda bakterinin inoküle edildiği noktadan etrafa doğru kayma çapı ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Deney sırasında kimyasal eklenmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır.

### **3.7. ELASTAZ ÜRETİM TESTİ**

Elastin Kongo Red testi uygulanmıştır (Ohman vd., 1980). *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar LB Broth besiyerinde üretilmiştir. Her şişede 10ml besiyeri olacak şekilde LB Broth besiyeri hazırlanmıştır. Bakteri kültürünün yoğunluğu 600 nm de okunarak besiyerinde 0,05 olacak şekilde bakteri süspansiyonundan şişelere eklenmiştir. Her kimyasaldan iki derişim kullanılmıştır. Lipoik asitin son derişimleri 4mM, 2mM, pikolinik asit ve kojik asitin son derişimleri 2mM, 1mM ve 2,2'-Bipiridil' in son derişimleri 0,125 mM, 0,0625mM olacak şekilde hesaplanarak hazırlanan stok çözültiden 50 şer µl eklenmiştir. 37°C de 1 gece 120 rpm de inkübe edilmiştir. Ertesi gün 600 nm de bakteri yoğunlukları okunmuştur ve 1 er ml test tüplerine alınmıştır. Test tüpleri 14500 rpm de 5 dk santrifüj edilerek üst kısımdan 100 µl alınmıştır. Tampon çözülti içerisine (900 µl üzerine) alınan 100 µl eklenerek 37°C de bir gece inkübe edilmiştir ve 495nm de absorbansları okunmuştur. Çalışma sırasında 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit eklenmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır.

Tampon çözültisi için; 0,1 M Tris ve 0,001M CaCl<sub>2</sub> çözültisi pH 7,5 olacak şekilde hazırlanmıştır ve ml ye 10mg Elastin Kongo Kırmızısı eklenmiştir.

### **3.8. PİYOSİYANİN ÜRETİM TESTİ**

*P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar LB Broth besiyerinde üretilmiştir. Piyosiyanın broth besiyeri hazırlanmıştır ve her bir şişede 10ml olacak şekilde dağıtılmıştır. *P. aeruginosa* PA01 ile klinik izolat kültürleri ve son derişimler 2,2'-Bipiridil 0,125mM

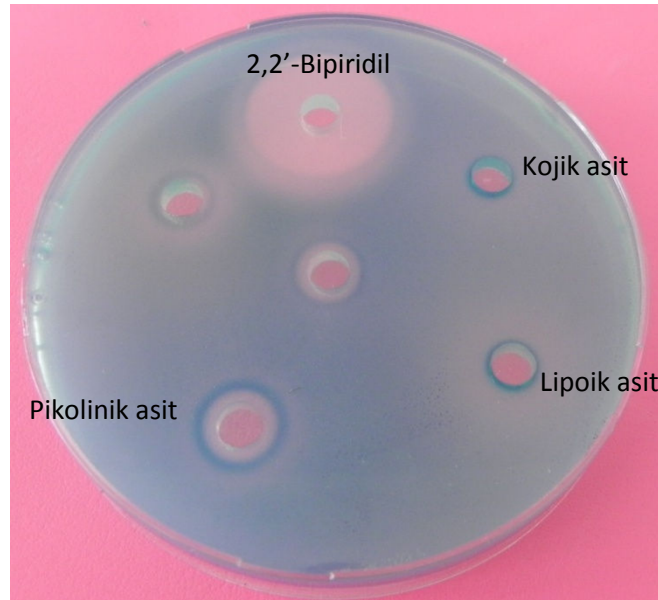
ve 0,0625mM, kojik asit 2mM ve 1mM, lipoik asit 2mM ve 1mM, pikolinik asit 1mM ve 0,5mM, FeCl<sub>3</sub> 100 µM olacak şekilde eklenmiştir. 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün 600nm de bakteri yoğunlukları okunarak üzerine 5er ml kloroform eklenmiştir. Her bir şişe 30sn vorteks ile çalkalanmıştır ve kloroformda çözünen piyosiyenin pigmenti test tüplerine alınmıştır. 0,2M lık HCl den 1ml eklenerek 30 sn vorteks ile çalkalanmıştır. Asitte çözünen pigmentin absorbanısı 520nm de okunmuştur. Test sırasında 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit eklenmemiş örnek kontrol olarak kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit Ve 2,2'-Bipiridil'in QSI1 İle Testi

QSI1 testi ile çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak seçilen şelatörler kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör etkileri incelenmiştir.

İnkübasyon sonunda kuyucuklar etrafında oluşan mavi halkalar (Şekil 2.) test edilen molekülün çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olduğunu göstermektedir. Şekil 2'ye göre test edilen şelatörlerin potansiyel inhibitör molekülleri olduğu tespit edilmiştir.



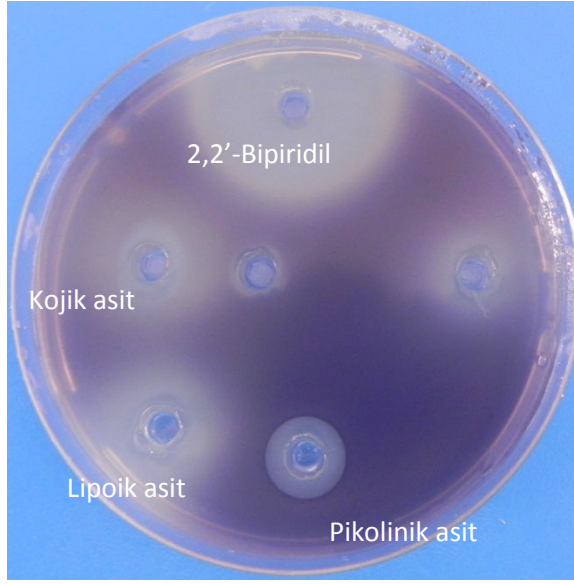
Şekil 2. Kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in QSI1 testi sonucunda besiyeri üzerindeki görüntüsü

### 4.2. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-Bipiridil'in *Chromobacterium violaceum*'da Viyolasin Üretimine Etkisi

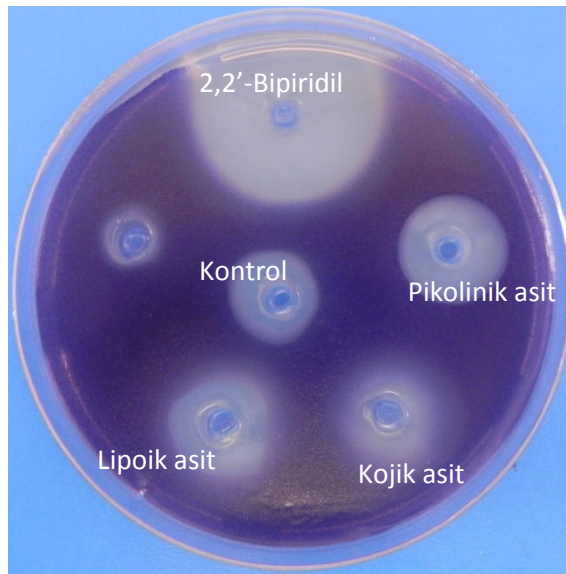
Pigment üretimini engellemek için LB besi ortamına sinyal molekülleri eklenmiştir. *C. violaceum* O26 biyosensör suşu için HHL ve *C. violaceum* VIR07 biyosensör suşu için

ise OdDHL sinyal molekülü besi ortamına eklenmiştir. Viyolasin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in son derişimleri 0,1 M olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir.

Sinyal molekülleri indikatör suşların viyolasin üretimini indüklemiştir. Kuyucuklara yüklenen şelatörler, kuyucuktan difüze oldukça viyolasin üretimini inhibe ederek şeffaf zon oluşturmuştur (Şekil 3., Şekil 4.). Şeffaf zon, viyolasin üretiminin inhibe edildiğini göstermektedir.



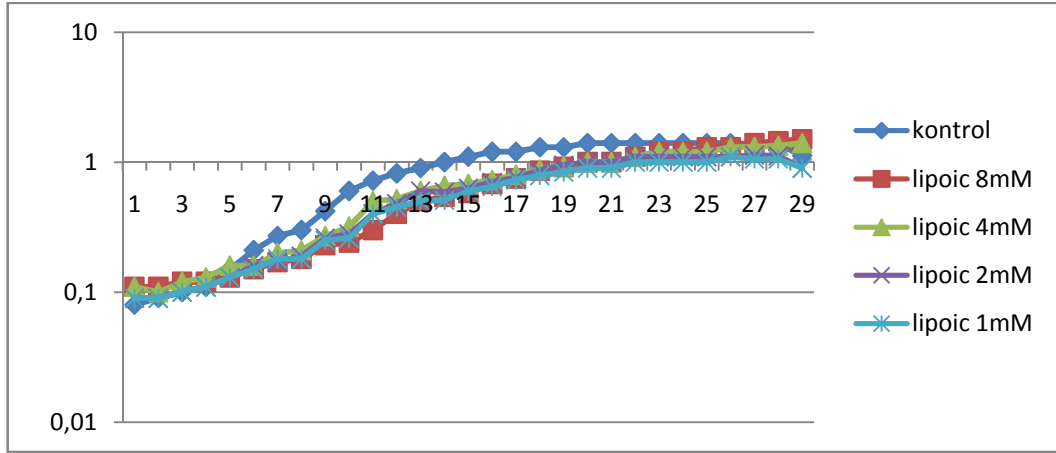
Şekil 3. Agar difüzyon yöntemi ile *C. violaceum* (VIR07)'de viyolasin üretimine kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in inhibitör etkisi



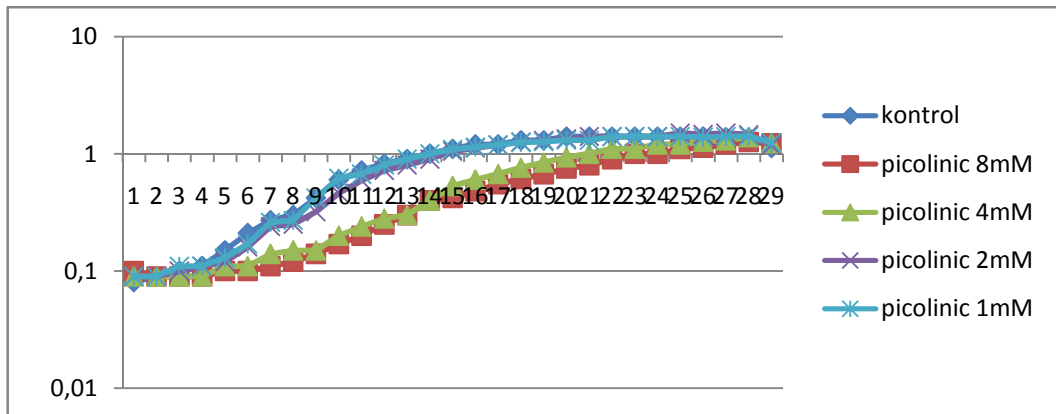
Şekil 4. Agar difüzyon yöntemi ile *C. violaceum* (CV026)'de viyolasin üretimine kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil'in inhibitör etkisi

### 4.3. Büyüme Eğrisi

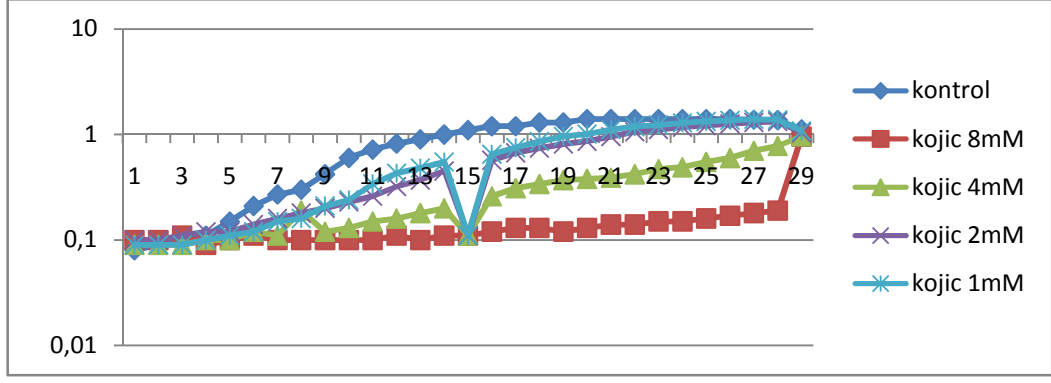
Biyofilm üretimi ve virülens faktörlerinin üretimi sırasında kullanılacak olan derişimin belirlenmesi için Kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit 8mM, 4mM, 2mM ve 1er mM'da, 2,2'-Bipiridil ise 1mM, 0,5mM, 0,25mM ve 0,125mM derişim için büyüme eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 5). Büyüme eğrilerine göre 2,2'- Bipiridil için 0,125mM, kojik asit için 2mM, lipoik asit için 4mM ve pikolinik asit için 2mM çalışma derişimleri olarak belirlenmiştir.



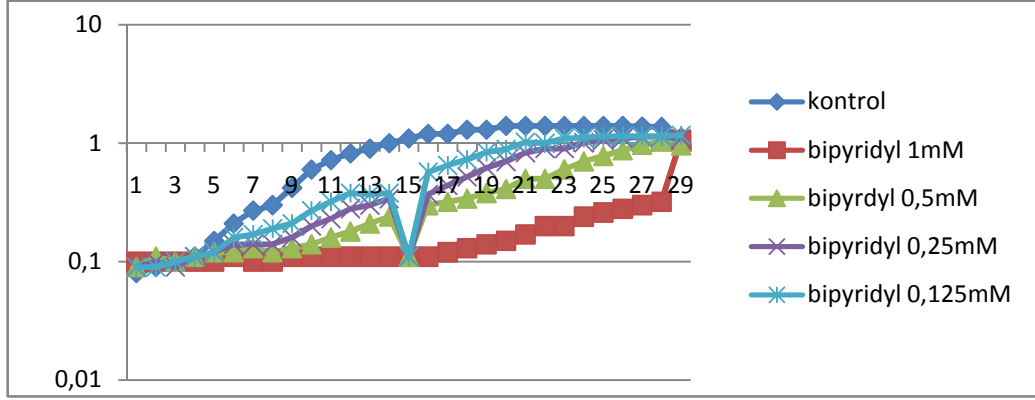
a



b



c

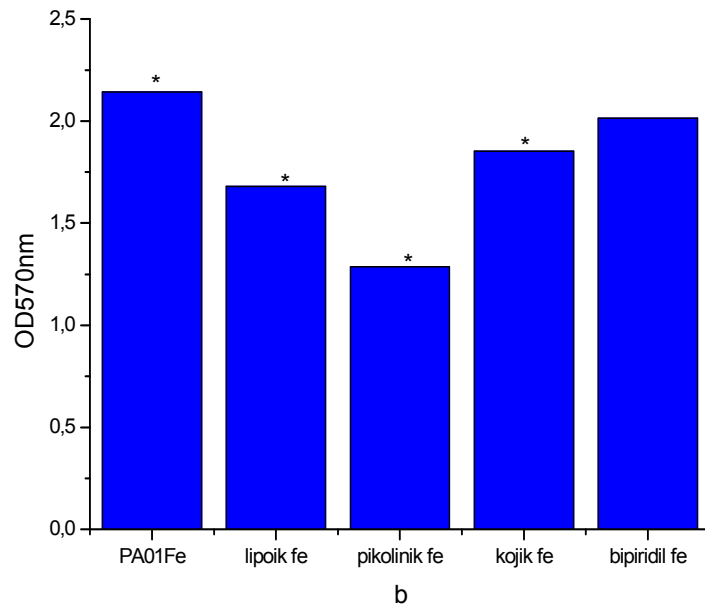
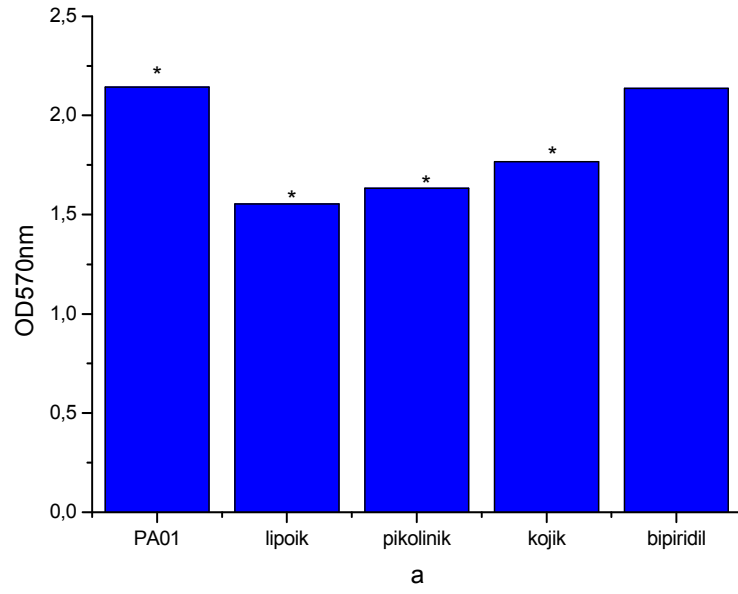


d

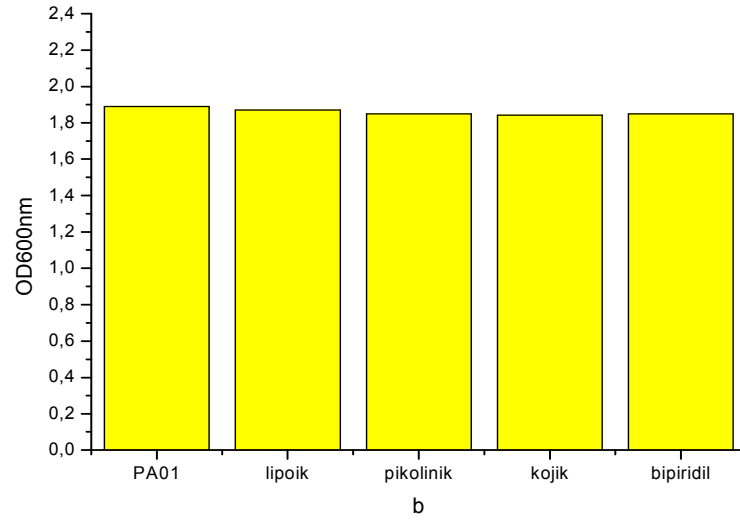
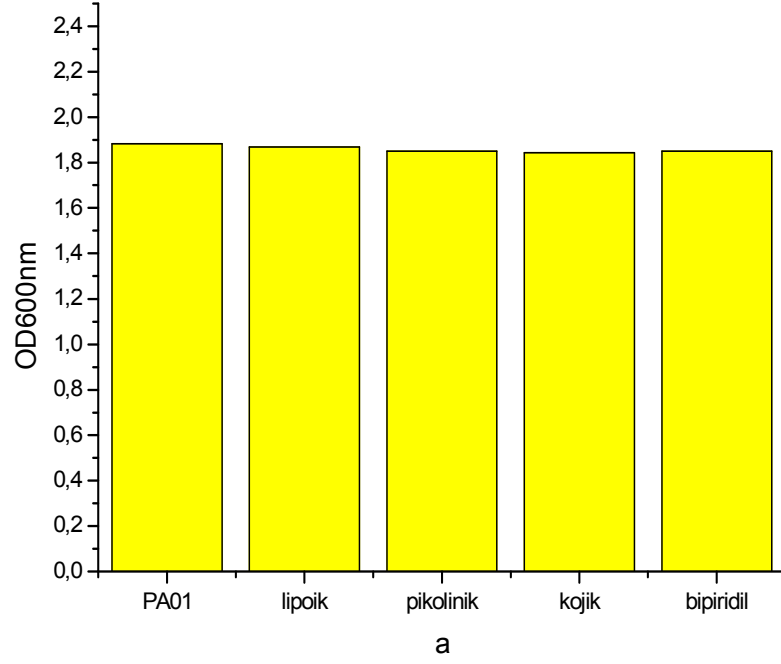
Şekil 5. *P. aeruginosa* PA01 için kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit 8mM, 4mM, 2mM, 1mM, 2,2'-bipiridil için ise 1mM, 0,5mM, 0,25mM ve 0,125mM derişimlerde (a, b, c, d) hazırlanmış büyüme eğrisi

#### 4.4. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit Ve 2,2'-Bipiridil'in Biyofilm Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında, 2,2-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit doğrudan biyofilm test ortamına eklenerek ve ayrıca demir şelatörler ile önce şelatlanarak test ortamına eklenmiş ve *P. aeruginosa* biyofilm oluşumuna etkileri incelenmiştir.



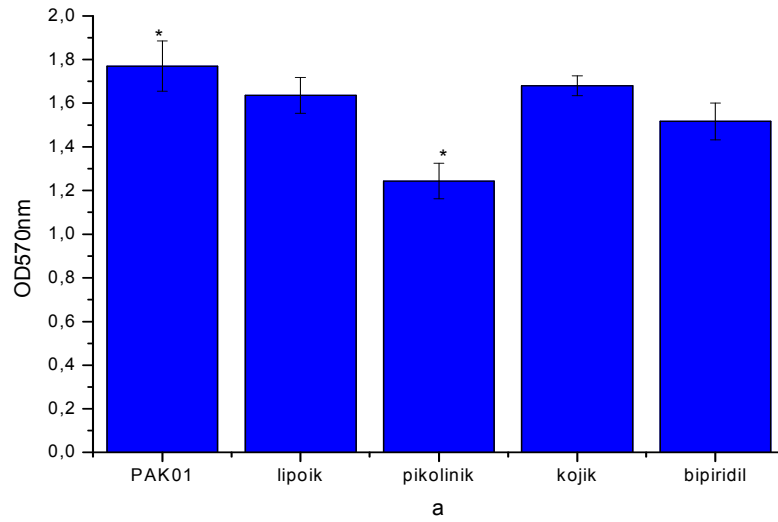
Şekil 6.1. *P.aeruginosa* PA01 için biyofilm oluşumuna 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) etkisi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

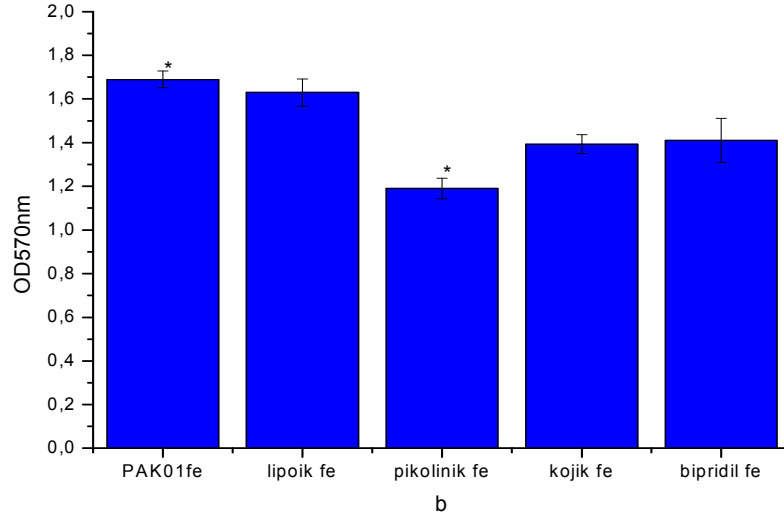


Şekil 6.2. *P.aeruginosa* PA01 suşunun ortamda 2,2-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbans değerleri

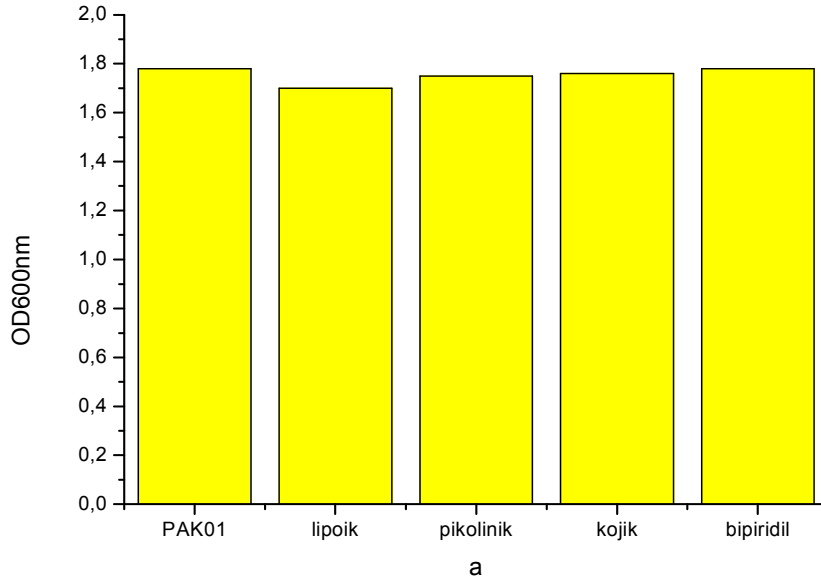
Biyofilm testi için ortama 2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM) olacak şekilde eklenerek *P.aeruginosa* PA01 için biyofilm oluşumuna etkileri incelenmiştir (Şekil 6.1.a). Biyofilm oluşumunu lipoik asit

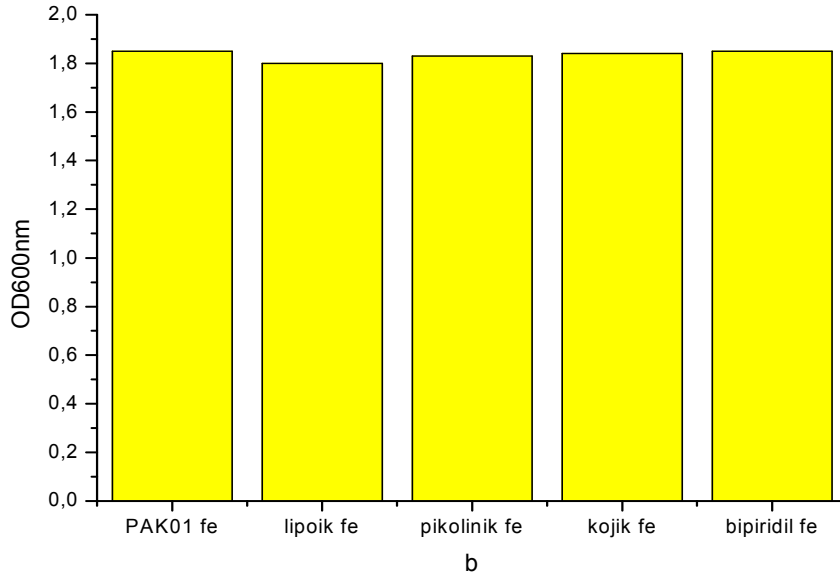
%28, pikolinik asit %24, kojik asit %18 oranında inhibe ettiği tespit edilmiş, 2,2'-bipiridil için inhibisyon tespit edilmemiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman inhibisyon yüzdeleri artmış ve lipoik asit %25, pikolinik asit %41, kojik asit %20, 2,2'-bipiridil için %8 olarak tespit edilmiştir. Lipoik asit, pikolinik asit, kojik asitin inhibisyon değerleri ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 6.1.b) ise biyofilm oluşumunu, lipoik asit %25, pikolinik asit %41 ve kojik asit %20 oranında inhibe etmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşu için test için kullanılan şelatörlerin hücre sayısına etkileri, ortamda FeCl<sub>3</sub> yokluğunda (a) ve ortamda FeCl<sub>3</sub> varlığında 600nm'deki absorbans değerleri Şekil 6.2'de verilmiştir.





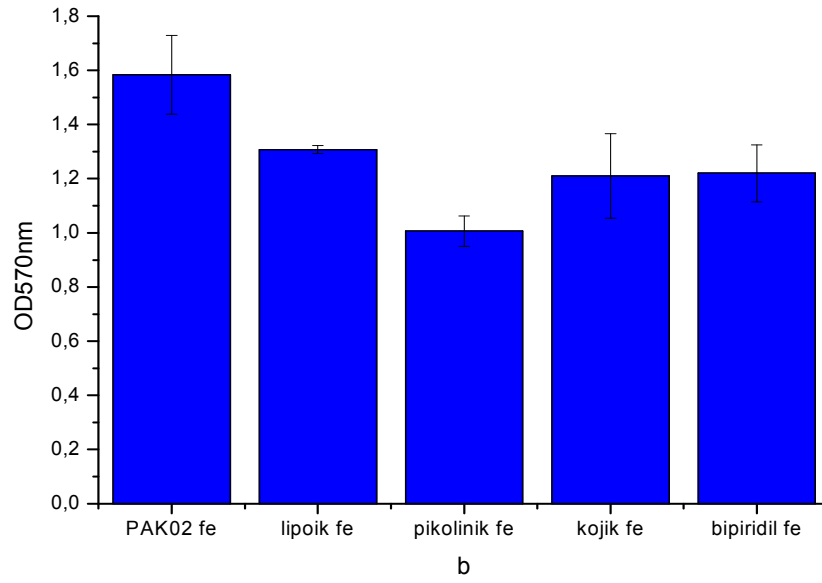
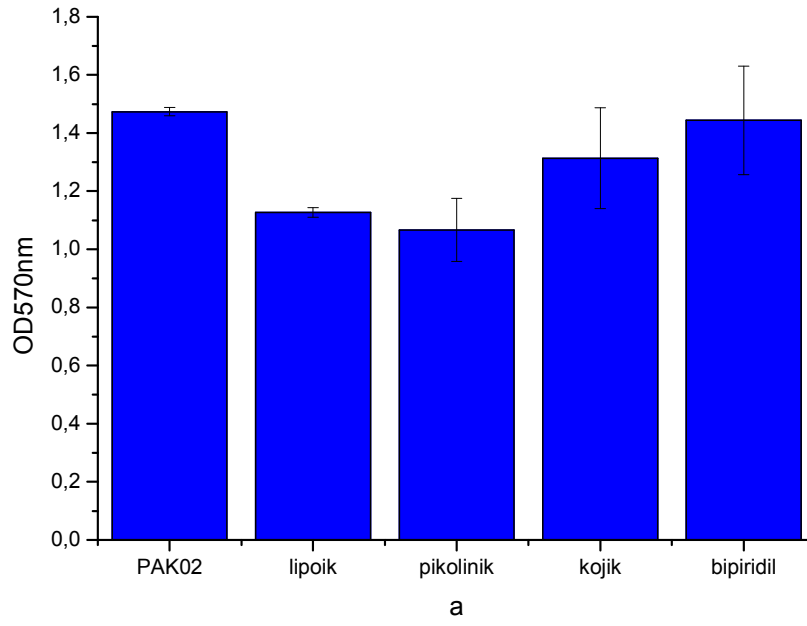
Şekil 6.3. *P.aeruginosa* PAK01 izolatında biyofilm oluşumuna 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)in etkisi(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde biyofilm üretimi. Sonuçlar, One Way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli örnekler ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



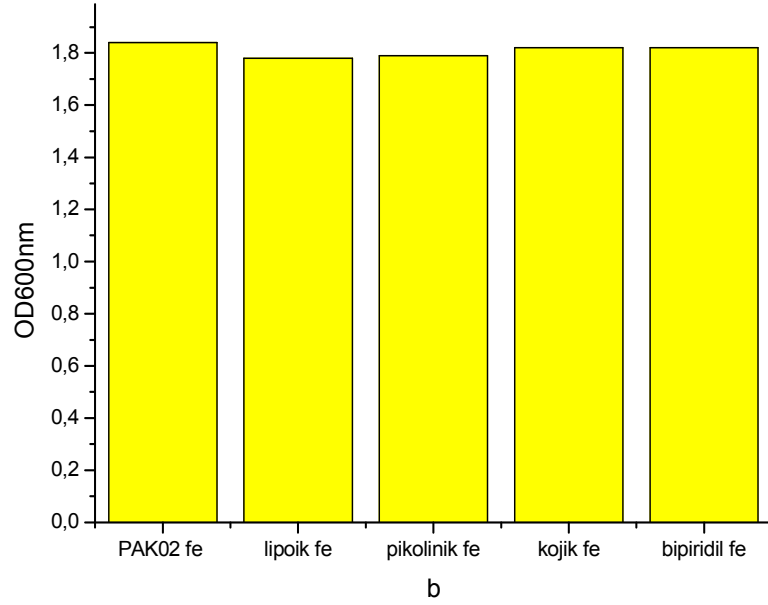
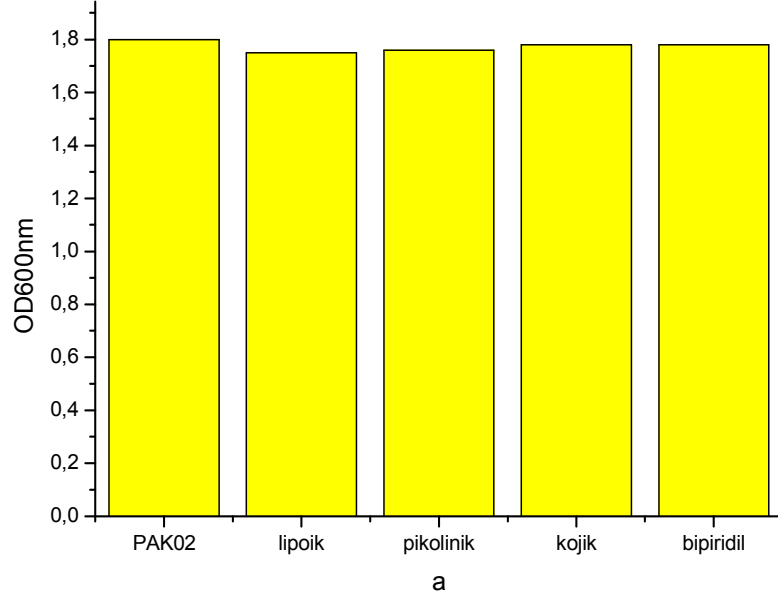


Şekil 6.4. *P.aeruginosa* PAK01 suşunun, ortamda 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbans değerleri

*P.aeruginosa* PAK01 için biyofilm oluşumuna 2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in etkileri incelenmiştir (Şekil 6.3.a). Biyofilm için inhibisyon yüzdeleri lipoik asit %7, pikolinik asit %30, kojik asit %5, 2,2'-bipiridil %14 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde lipoik asit %7, pikolinik asit %30, kojik asit %18, 2,2'-bipiridil %17 oranında inhibisyon tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda ise en etkili şelatörün pikolinik asit olduğu ve inhibisyon oranının %30 olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu için ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 6.3.b) pikolinik asit için inhibisyon oranı değişmemiştir. *P.aeruginosa* PAK01 izolatu için test için kullanılan şelatörlerin hücre sayısına etkileri ortamda FeCl<sub>3</sub> yokluğunda (a) ve ortamda FeCl<sub>3</sub> varlığında 600nm'deki absorbans değerleri Şekil 6.4'te verilmiştir.



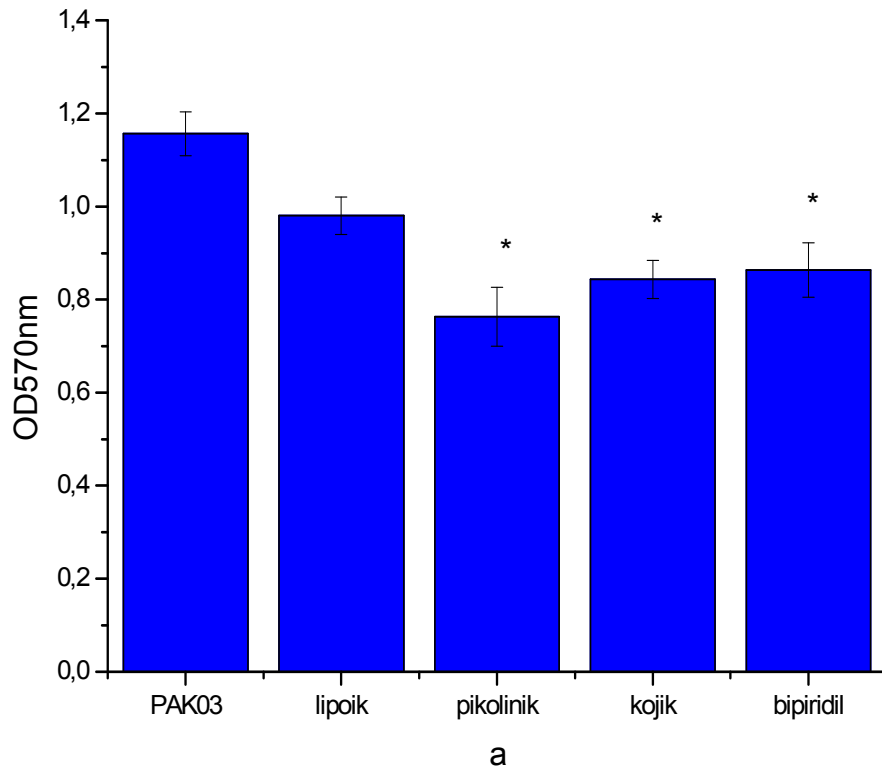
Şekil 6.5. *P.aeruginosa* PAK02 klinik izolatu için biyofilm oluşumuna 2,2'-biperidil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)in etkisi(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde biyofilm üretimi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli örnekler ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

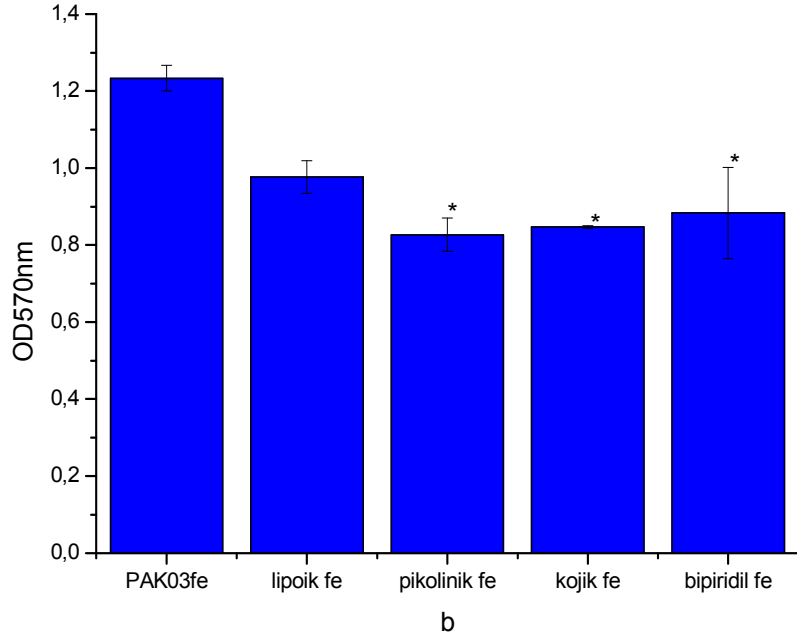


Şekil 6.6. *P.aeruginosa* PAK02 klinik izolatının, ortamda 2,2'-biperidil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbands değerleri

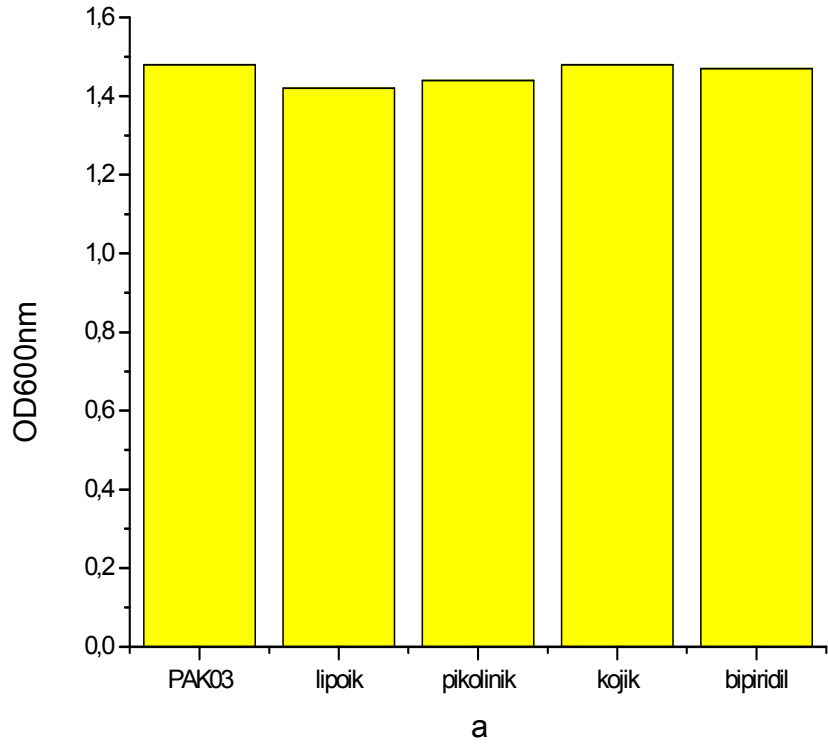
2,2'-biperidil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P.aeruginosa* PAK02 izolatında biyofilm oluşumuna etkileri incelenmiştir

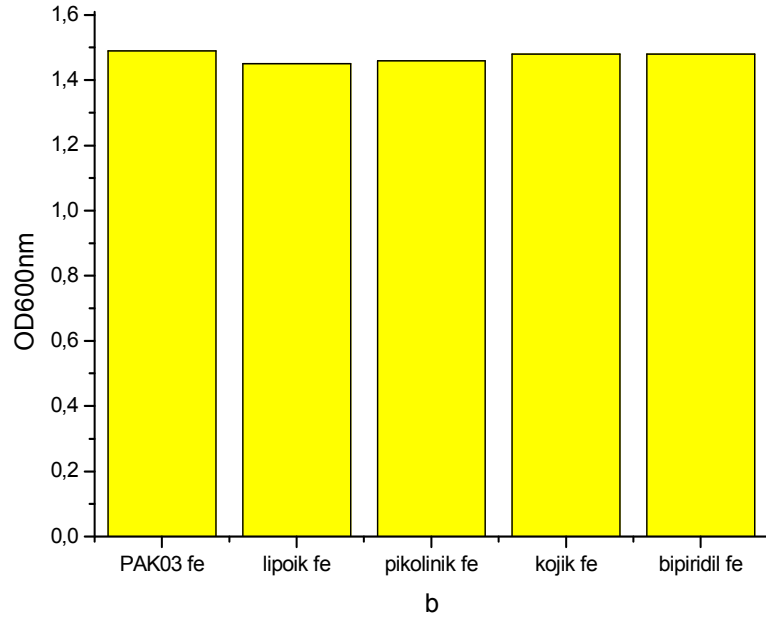
(Şekil 6.5.a). Biyofilm oluşumu için inhibisyon yüzdeleri lipoik asit %24, pikolinik asit %28, kojik asit %11, 2,2'-bipiridil için %2 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde biyofilm oluşumu için lipoik asit %18, pikolinik asit %36, kojik asit %24, 2,2'-bipiridil %23 oranında inhibisyon olduğu tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* PAK02 izolatının test için ilave edilen şelatörler (lipoik asit, pikolinik asit, kojik asit, 2,2'-bipiridil) (a), ortamda şelatörler ve FeCl<sub>3</sub> varlığında 600nm'deki absorbans değerleri Şekil 6.6'da verilmiştir.





Şekil 6.7. Biyofilm testi. *P.aeruginosa* PAK03 klinik izolatu için 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) biyofilm üretimi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

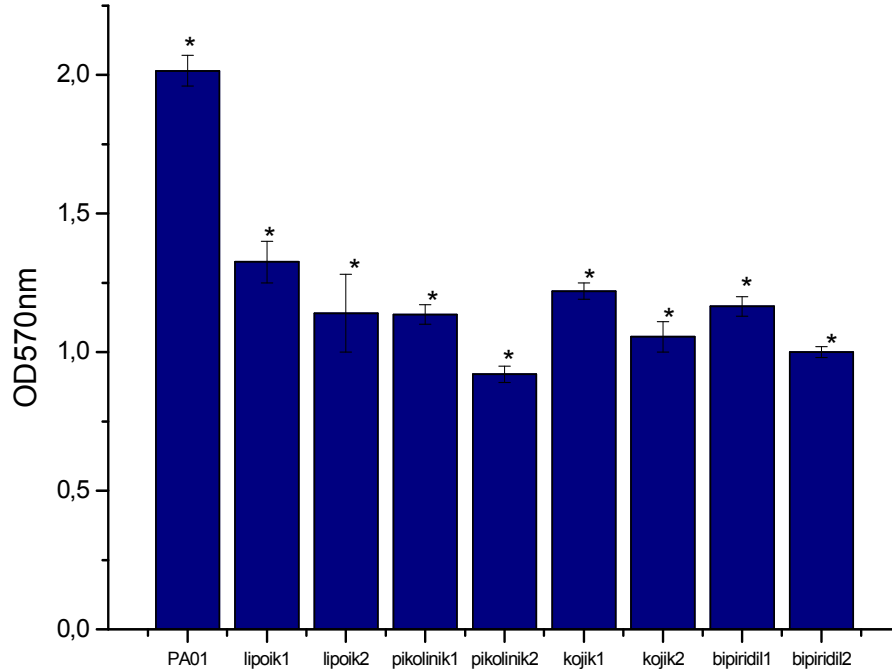




Şekil 6.8. *P.aeruginosa* PAK03 klinik izolatu için 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve FeCl<sub>3</sub> (100µM) eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbans değerleri

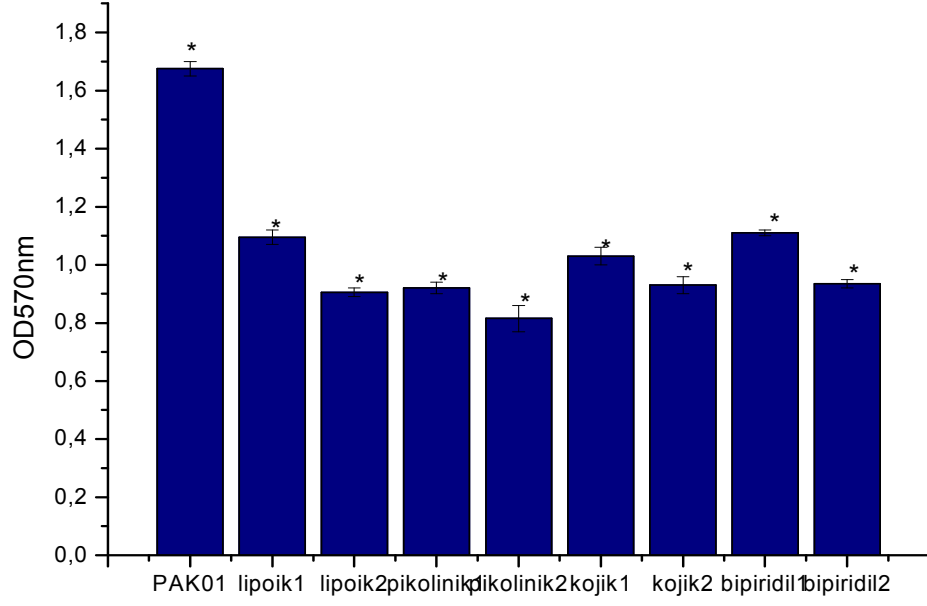
2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P.aeruginosa* PAK03 izolatında biyofilm oluşumuna etkileri incelenmiştir (Şekil 6.7.a). Biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon değerleri lipoik asit %15, pikolinik asit %33, kojik asit %27 ve 2,2'-bipiridil %25 olarak tespit edilmiştir. Şelatörlerle birlikte ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman biyofilm oluşumu için inhibisyon değerleri artmış ve lipoik asit %21, pikolinik asit %34, kojik asit %32 ve 2,2'-bipiridil %28 olarak tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu için en yüksek inhibisyon oranı pikolinik asit için %33, kojik asit için %27 ve 2,2'-bipiridil için %25 şeklinde tespit edilmiştir. Ortama şelatörler ile birlikte FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 6.7.b) en yüksek inhibisyon değeri pikolinik asit %34 ve kojik asit için %32 olarak tespit edilmiştir. Şelatörler ve FeCl<sub>3</sub> test için kullanılan derişimlerde *P.aeruginosa* PAK03 izolatu için hücre sayısı 600nm'de ölçülerek (Şekil 6.8) kontrol edilmiş ve hücre sayısını azaltmadan biyofilm oluşumunun inhibe edildiği tespit edilmiştir.

#### 4.5. FeCl<sub>3</sub>'ün Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-Bipiridil ile Şelatlandıktan Sonra Biyofilm Oluşumuna Etkisi



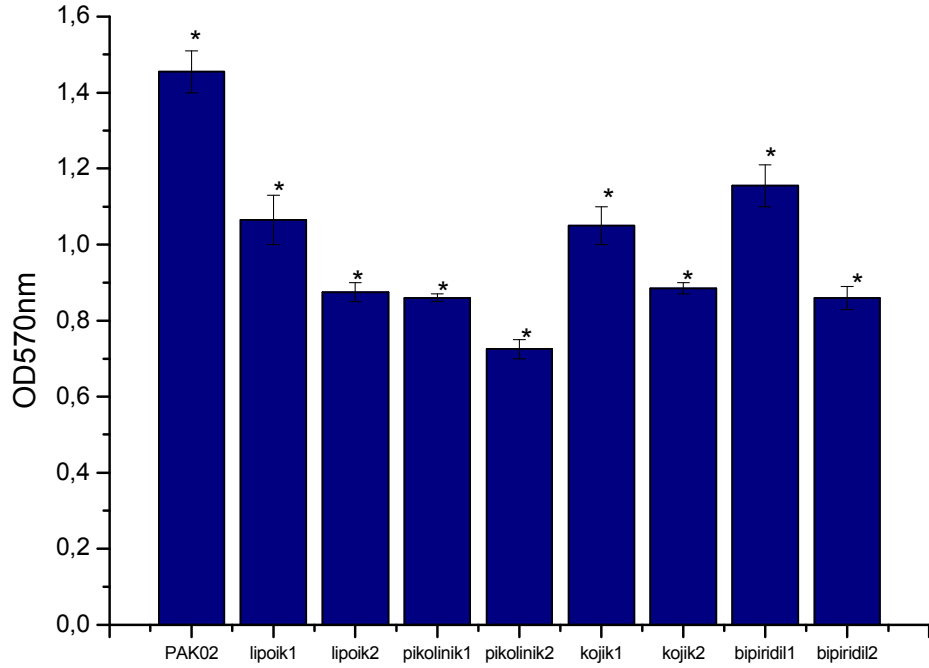
Şekil 7.1. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1) solüsyonlarının *P.aeruginosa* PA01 için biyofilm oluşumuna etkisi ( ilk derişimler (1) 100µM, (2) 250µM olacak şekilde ayarlanmıştır). One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ortamda *P. aeruginosa* için serbest FeCl<sub>3</sub> kalmaması için test ortamına eklenmeden, FeCl<sub>3</sub> ile ayrı ayrı kojik asit, lipoik asit, pikolinik asit ve 2,2'-bipiridil karıştırıldıktan sonra biyofilm testi için kullanılmıştır (Şekil 7.1.). bunun için aynı derişimde şelatör ve FeCl<sub>3</sub> (3:1) oranında karıştırılarak inkübe edilmiştir. İstatistik analiz sonucunda etkili inhibisyon değerleri 2,2'-Bipiridil (100µM) %42, 2,2'-Bipiridil (250µM) %50, lipoik asit (100µM) %33, lipoik asit (250µM) %43, kojik asit (100µM) %40, kojik asit (250µM) %48, pikolinik asit (100µM) %44, pikolinik asit (250µM) %54 olarak tespit edilmiştir.



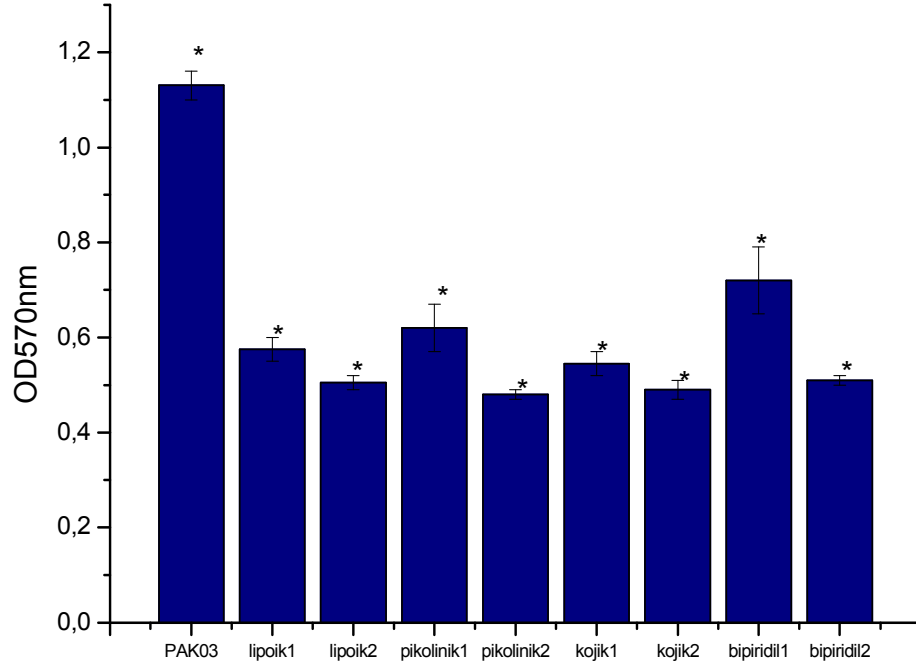
Şekil 7.2. 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1) solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK01 klinik izolatında biyofilm oluşumuna etkisi ( (1) 100µM, (2) 250µM olacak şekilde eklenmiştir). One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark  $p < 0,05$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

3:1 oranında hazırlanan 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK01 suşunda biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir (Şekil 7.2.). Biyofilm oluşumu için inhibisyon değerleri 2,2'-Bipiridil (100µM) %34, 2,2'-Bipiridil (250µM) %44, lipoik asit (100µM) %35, lipoik asit (250µM) %46, kojik asit (100µM) %39, kojik asit (250µM) %45, pikolinik asit (100µM) %45 ve pikolinik asit (250µM) %51 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 7.3. 2,2'-Bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1) solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK02 klinik izolatında biyofilm oluşumuna etkisi ( (1) 100µM, (2) 250µM olacak şekilde ayarlanmıştır). One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

3:1 oranında hazırlanan 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK02 klinik izolatı için biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir (Şekil 7.3.). Biyofilm oluşumu için inhibisyon değerleri 2,2'-bipiridil (100µM) %21, 2,2'-bipiridil (250µM) %41, lipoik asit (100µM) %27, lipoik asit (250µM) %40, kojik asit (100µM) %28, kojik asit (250µM) %39, pikolinik asit (100µM) %41 ve pikolinik asit (250µM) %50 olarak tespit edilmiştir.

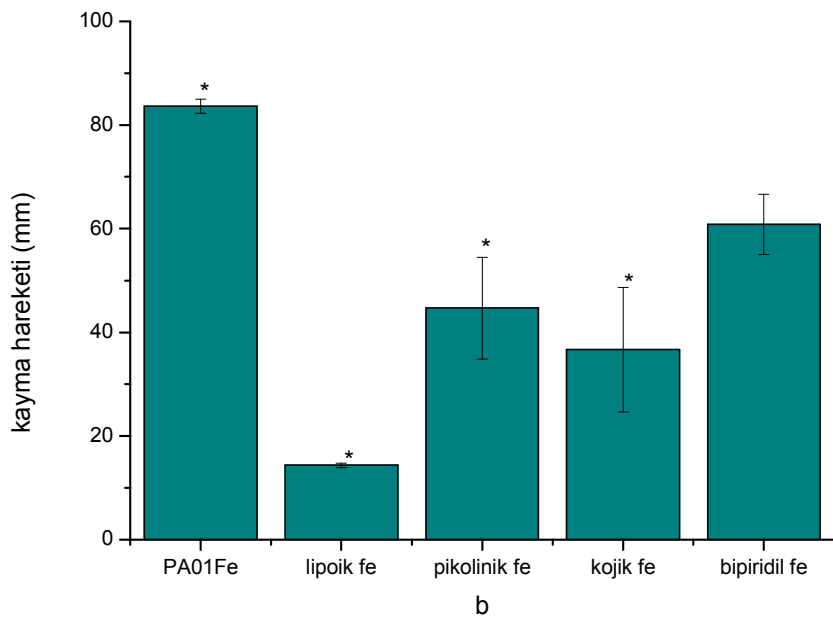
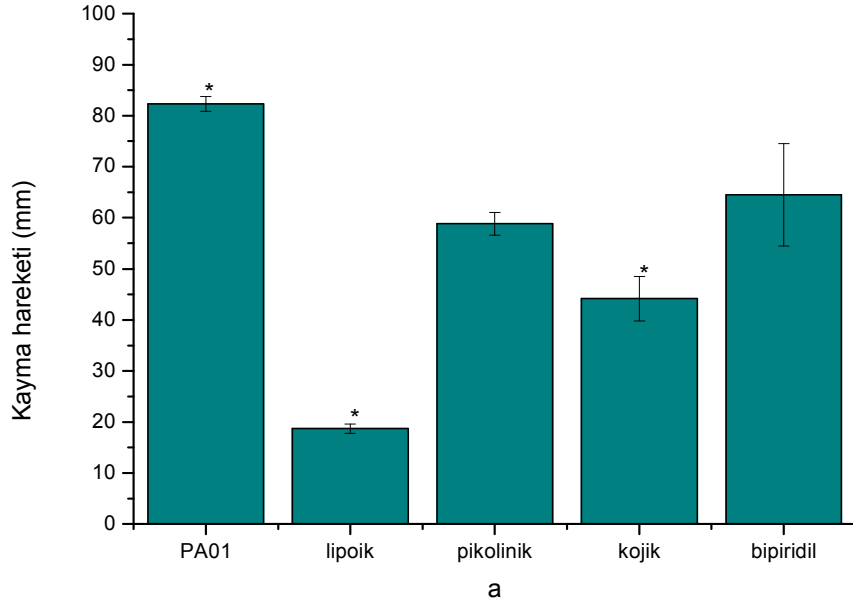


Şekil 7.4. 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit ile şelatlanan demir (3:1) solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK03 klinik izolatında biyofilm oluşumuna etkisi ( (1) 100µM, (2) 250µM olacak şekilde ayarlanmıştır). One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark  $p < 0,05$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

3:1 oranında hazırlanan 2,2'-bipiridil, lipoik asit, kojik asit ve pikolinik asit solüsyonlarının *P.aeruginosa* PAK03 klinik izolatında biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir (Şekil 7.4.). Biyofilm testi sonucunda inhibisyon değerleri 2,2'-bipiridil (100µM) %36, 2,2'-bipiridil (250µM) %55, lipoik asit (100µM) %49, lipoik asit (250µM) %55, kojik asit (100µM) %52, kojik asit (250µM) %57, pikolinik asit (100µM) %45 ve pikolinik asit (250µM) %57 olarak tespit edilmiştir.

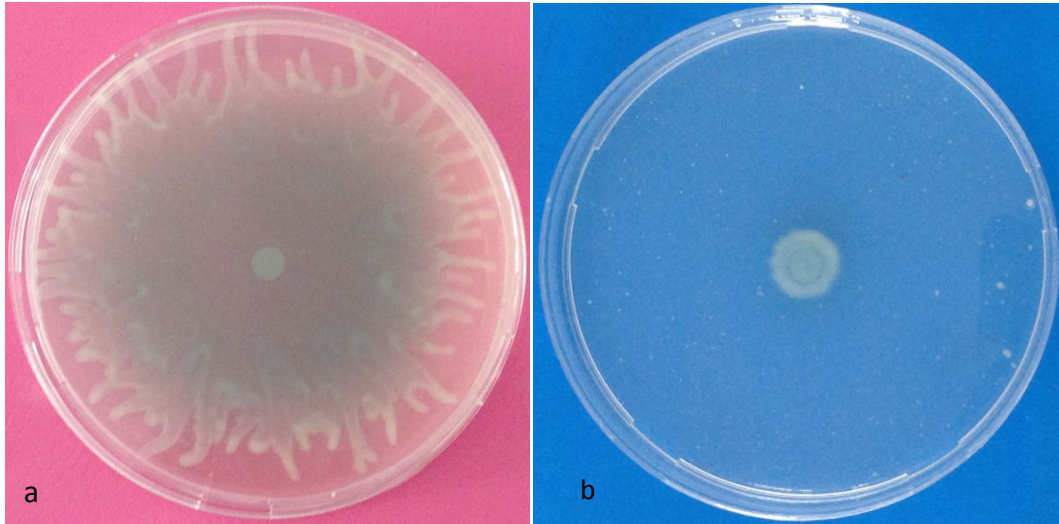
#### 4.6. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in *P. aeruginosa*'da Kayma Hareketine Etkisi

Kayma hareketi için 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlar PAK01, PAK02, PAK03 üzerine etkileri ortama FeCl<sub>3</sub> eklenerek araştırılmıştır (Şekil 8.1.a,b).

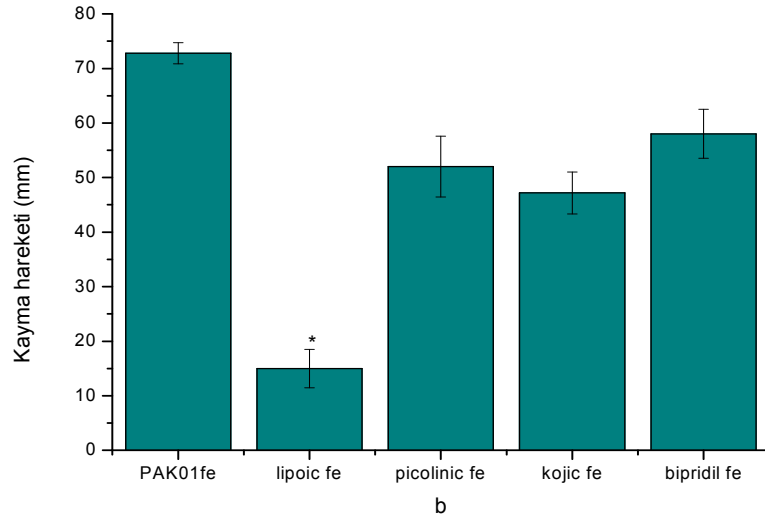
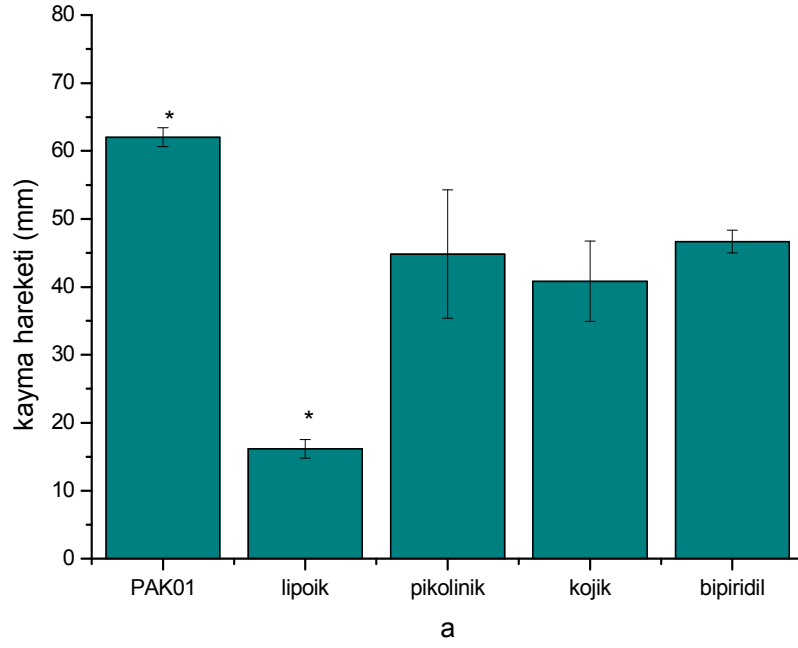


Şekil 8.1. Kayma hareketi testi. *P.aeruginosa* PA01 için 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM)(a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) kayma hareketine etkisi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Kayma testi sonucunda inhibisyon değerleri lipoik asit için %77, pikolinik asit için %29, kojik asit için %46 ve 2,2'-bipiridil için %21 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) eklendiğinde kayma hareketi için inhibisyon oranları lipoik asit %83, pikolinik asit %47, kojik asit %56 ve 2,2'-bipiridil %27 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) eklendiğinde (Şekil 8.1.b) ise inhibisyon oranları lipoik asit %83, pikolinik asit %47 ve kojik asit için %56 olarak tespit edilmiştir. Kayma hareketini en çok lipoik asitin inhibe ettiği (Şekil 8.2.) tespit edilmiştir.



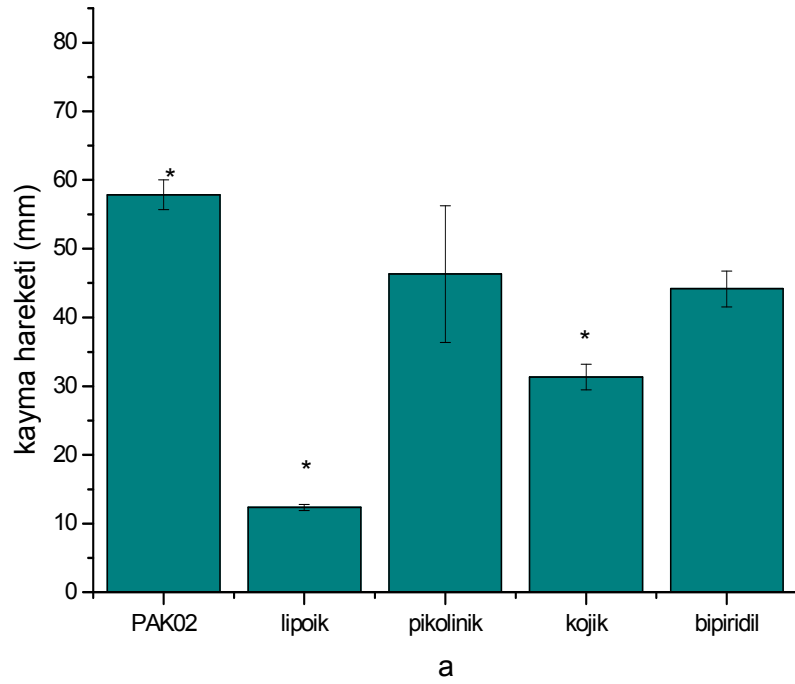
Şekil 8.2. *P.aeruginosa* PA01 suşunda, kontrol (a) ve lipoik asit (4mM) eklenmiş (b) petrilerde kayma hareketi

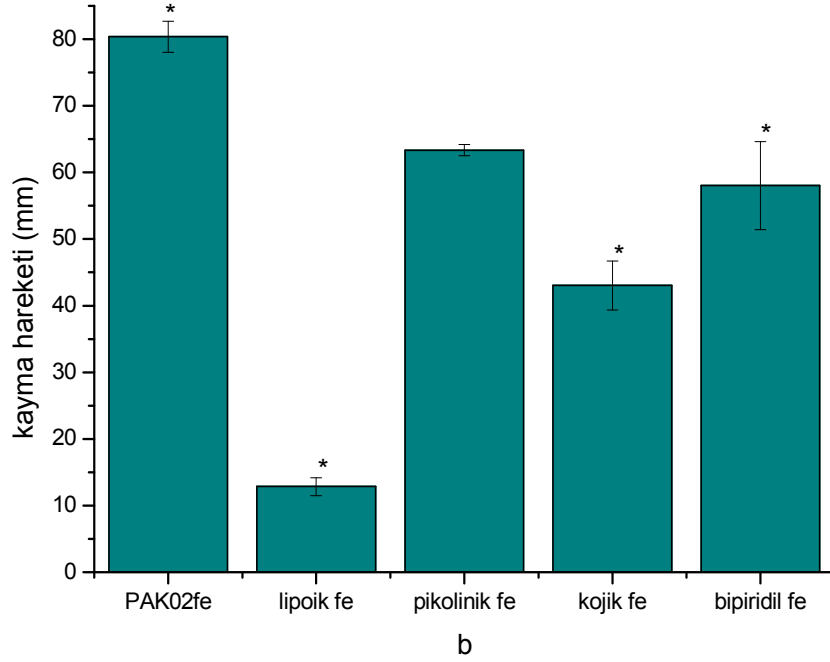


Şekil 8.3. *P.aeruginosa* PAK01 klinik izolatı için ortama  $FeCl_3$  ilave edilmemiş (a) ve  $100\mu M$   $FeCl_3$  ilave edilmiş (b) kayma hareketi çapları. Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark  $p < 0,05$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

2,2'-biperidil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P.aeruginosa* PAK01 izolatında kayma hareketine etkileri incelenmiştir (Şekil 8.3.a). Kayma testi sonucunda inhibisyon yüzdeleri lipoik asit %74, pikolinik

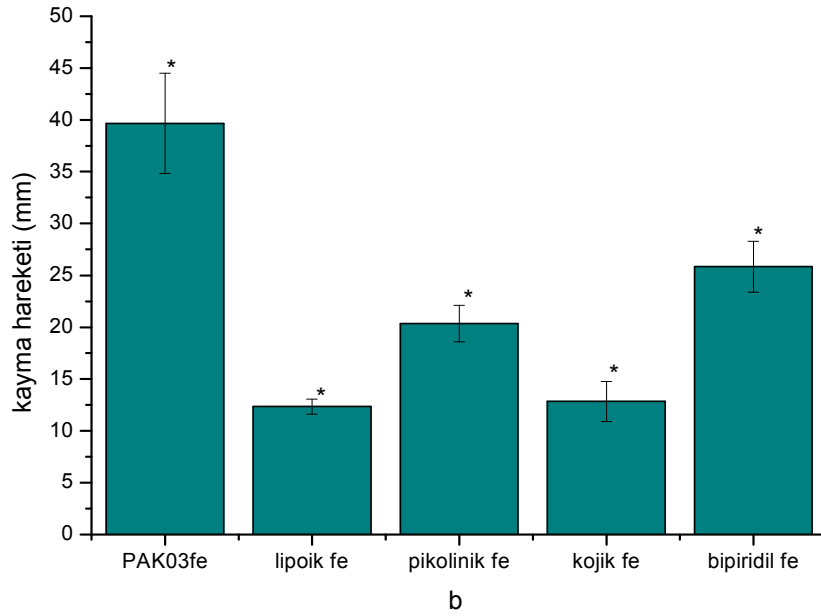
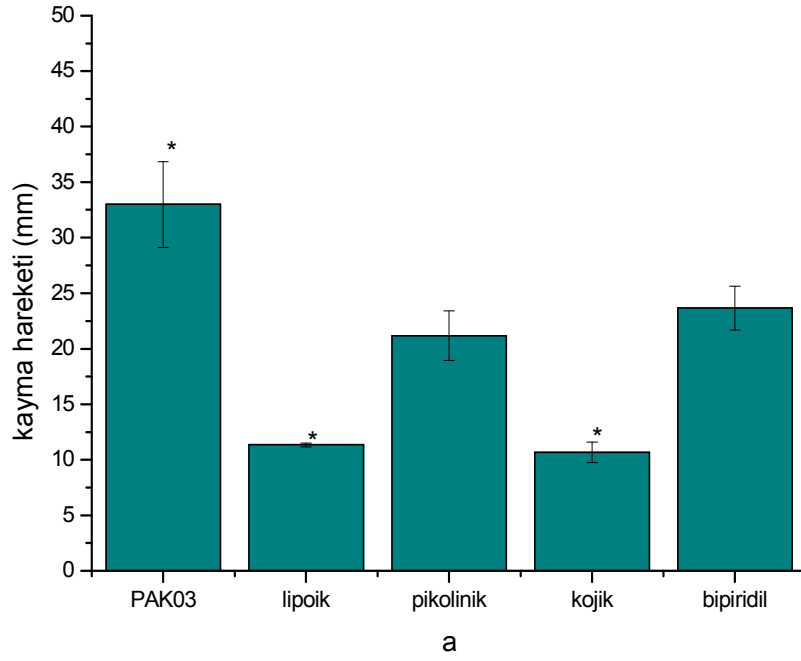
asit %28, kojik asit %34, 2,2'-bipiridil %24 olarak tespit edilmiştir. Ortama şelatörler ile birlikte FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde lipoik asit %79, pikolinik asit %29, kojik asit %35, 2,2'-bipiridil %24 oranında inhibisyon tespit edilmiştir (Şekil 8.3.b). Kayma hareketini en yüksek seviyede inhibe eden molekül lipoik asit olarak tespit edilmiştir.





Şekil 8.4. *P.aeruginosa* PAK02 klinik izolatu için ortama 2,2'-bipiridil (0,125mM), lipoik asit (4mM), kojik asit (2mM) ve pikolinik asit (2mM) (a) ve şelatörler ile 100µM FeCl<sub>3</sub> ilave edildiğinde (b) kayma hareketine etkisi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P.aeruginosa* PAK02 izolatında kayma hareketine etkileri incelenmiştir (Şekil 8.4.a). Kayma hareketi üzerine inhibisyon yüzdeleri lipoik asit için %79, pikolinik asit için %20, kojik asit için %45, 2,2'-bipiridil için %24 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde inhibisyon oranları lipoik asit %84, pikolinik asit %21, kojik asit %47, 2,2'-bipiridil %28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 8.4.b).

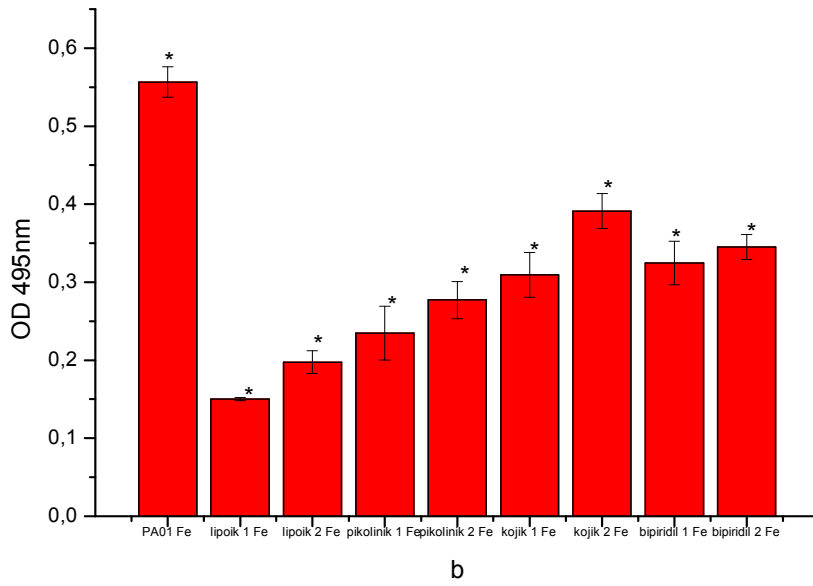
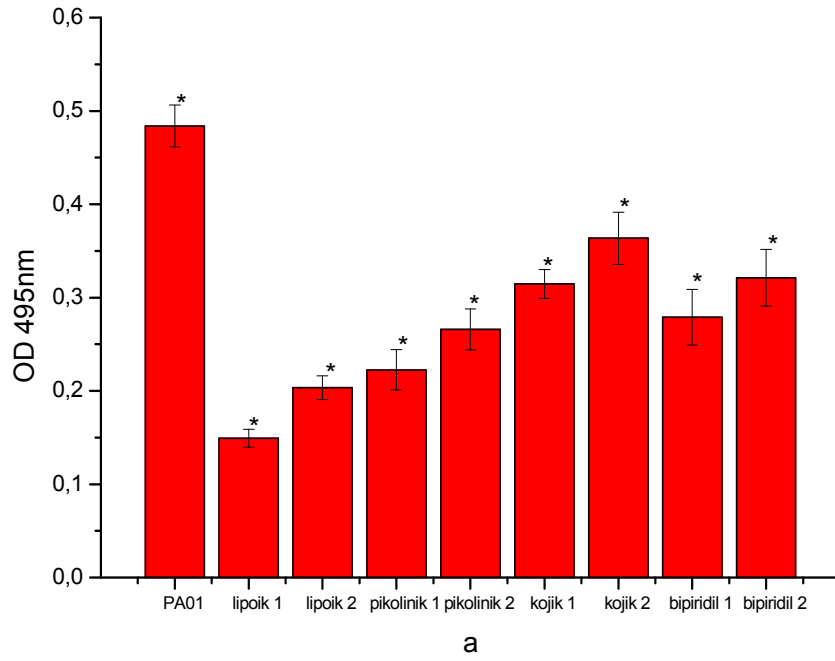


Şekil 8.5. *P.aeruginosa* PAK03 klinik izolatı için kayma besiyerine 2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM), pikolinik asit (2mM) (a) ve ortama şelatörler ile birlikte  $FeCl_3$  eklendiğinde (b) hareketi üzerine etkisi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark  $p<0,05$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

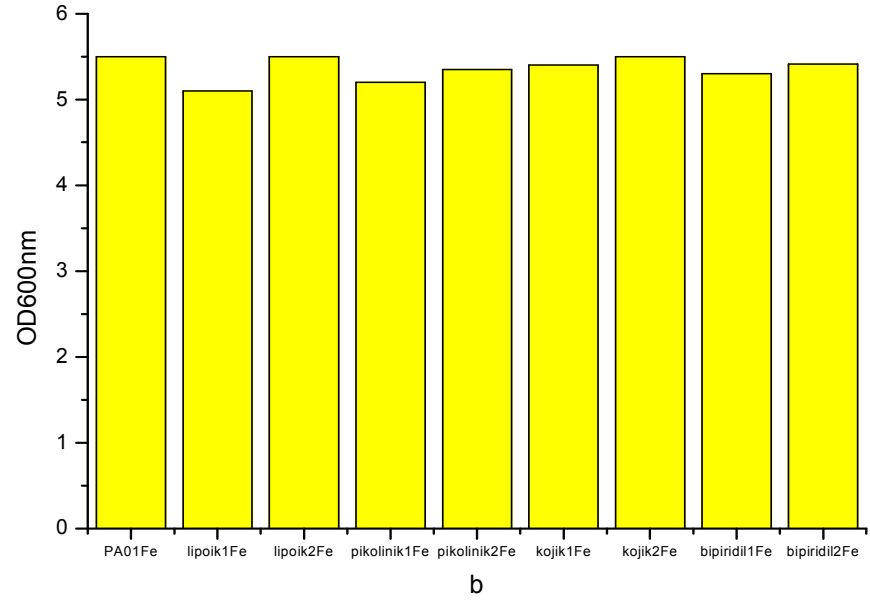
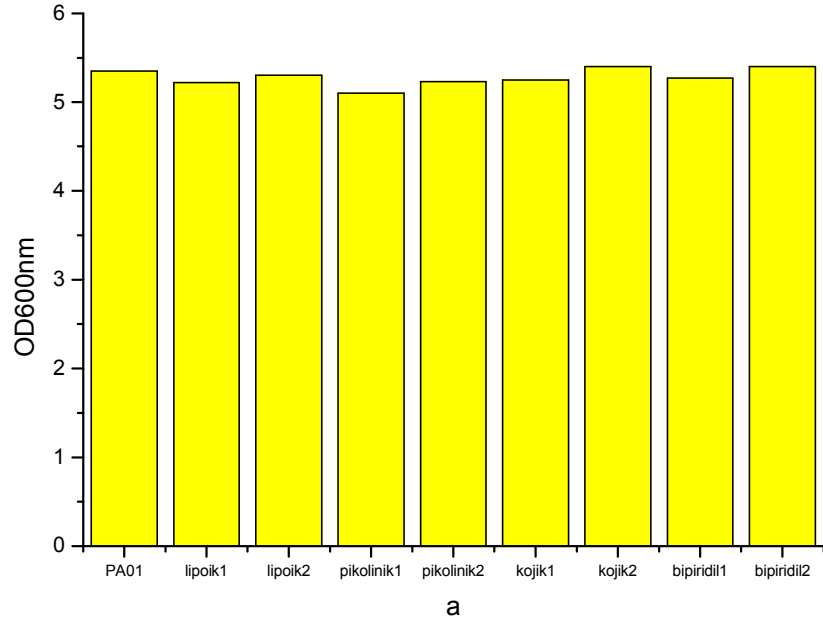
2,2'-bipiridil (0,125mM), kojik asit (2mM), lipoik asit (4mM) ve pikolinik asit (2mM)'in *P.aeruginosa* PAK03 izolatında kayma hareketine etkileri incelenmiştir (Şekil 8.5.a). Kayma testi sonucunda inhibisyon değerleri lipoik asit için %66, pikolinik asit için %36, kojik asit için %68, 2,2'-bipiridil %28 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde inhibisyon oranları artarak lipoik asit %69, pikolinik asit %49, kojik asit %68 ve 2,2'-bipiridil %35 olarak tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK03 izolatındakayma hareketini en yüksek lipoik asit %66 ve kojik asit %68 oranında inhibe etmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 8.5.b) ise yine lipoik asit %69 en yüksek etkiyi göstermiştir.

#### **4.7. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in *P. aeruginosa*'da Elastaz Üretimine Etkisi**

Elastaz, elastin ve kolajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan ve insan immunoglobulin G hücrelerini inaktive eden bir metalloproteazdır (Hamood vd., 1996). Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI cevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir (Passador vd, 1993). *LasB* elastaz gerek tek başına gerekse *Pseudomonas* tarafından üretilen diğer proteazlar ile birlikte işlev göstererek biyolojik olarak önemli birçok substratı parçalar veya inaktive eder (Nicas ve Iglewski, 1985).

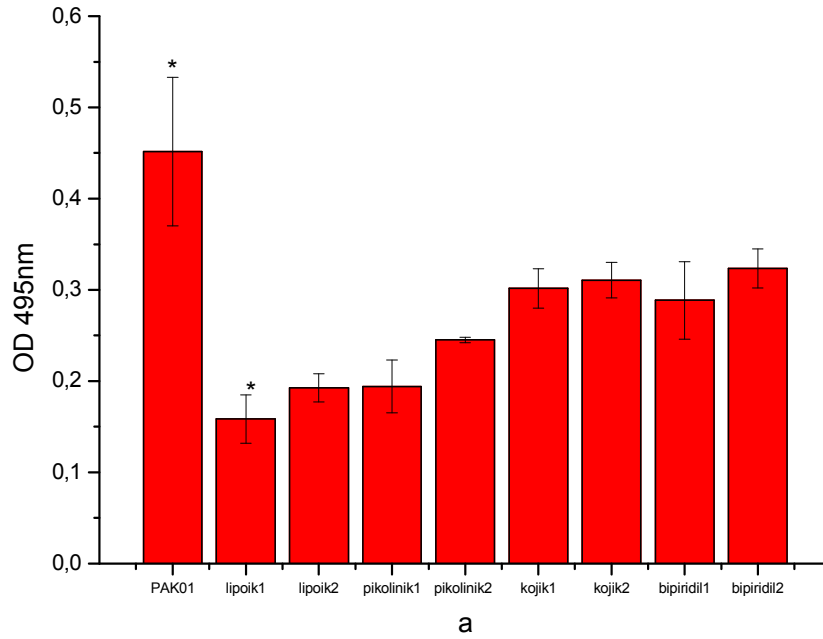


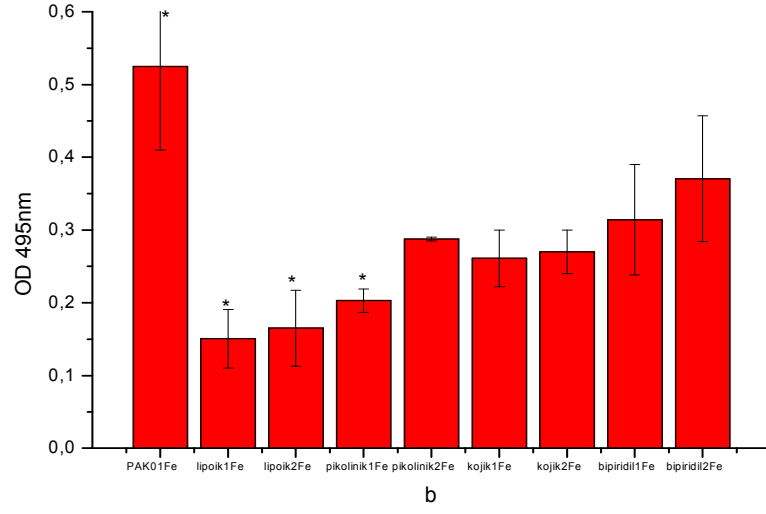
Şekil 9.1. *P.aeruginosa* PA01 için ortamda 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) elastaz üretimine etkisi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



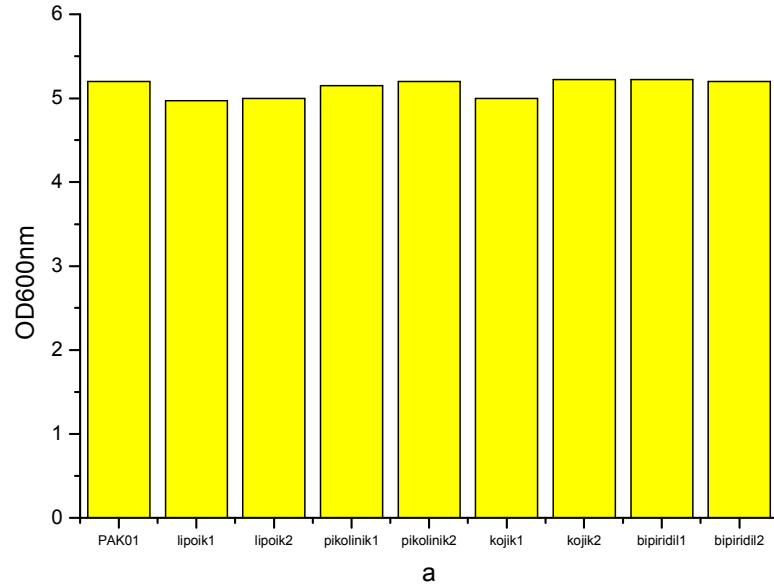
Şekil 9.2. *P.aeruginosa* PA01 suşunun ortamda 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbsans değerleri

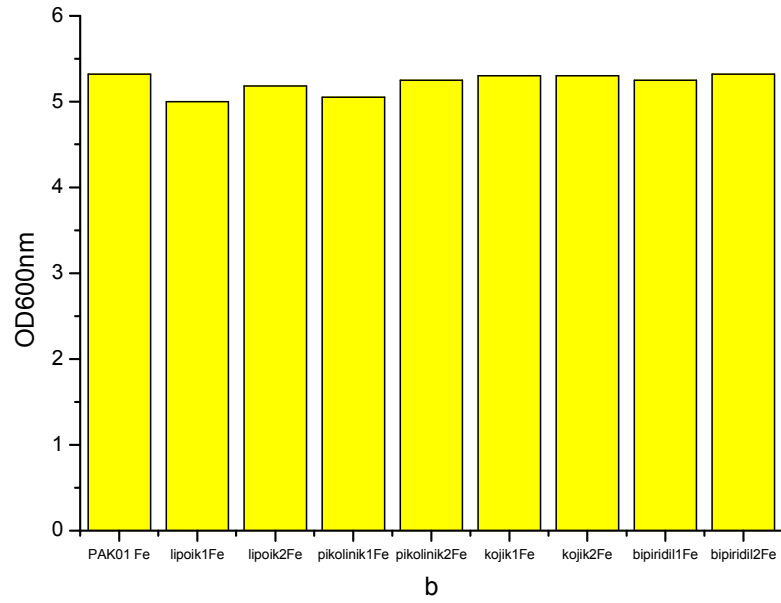
*P. aeruginosa* PA01 suşunda elastaz üretimine 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), pikolinik asit1 (2mM) ve pikolinik asit2 (1mM)'nin etkileri incelenmiştir (Şekil 9.1.a). Test sonucunda inhibisyon değerleri lipoik asit(1) %69, lipoik asit(2) %58, pikolinik asit(1) %54, pikolinik asit(2) %45, kojik asit(1) %35, kojik asit(2) %25, 2,1-'bipiridil(1) %42 ve 2,2'-bipiridil(2) %34 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman elastaz üretimi üzerine inhibisyon oranları lipoik asit1 %73, lipoik asit2 %65, pikolinik asit1 %58, pikolinik asit2 %50, kojik asit1 %45, kojik asit2 %28, 2,2-'bipiridil1 %42 ve 2,2'-bipyridyl2 %38 olarak tespit edilmiştir (Şekil 9.1.a-b). İstatistiksel analiz sonucunda tüm kimyasalların etkisinin kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* PA01 suşunun ortamda FeCl<sub>3</sub> yokluğunda (a) ve ortamda FeCl<sub>3</sub> varlığında OD600nm'deki absorbans değerleri Şekil.9.2'de verilmiştir.





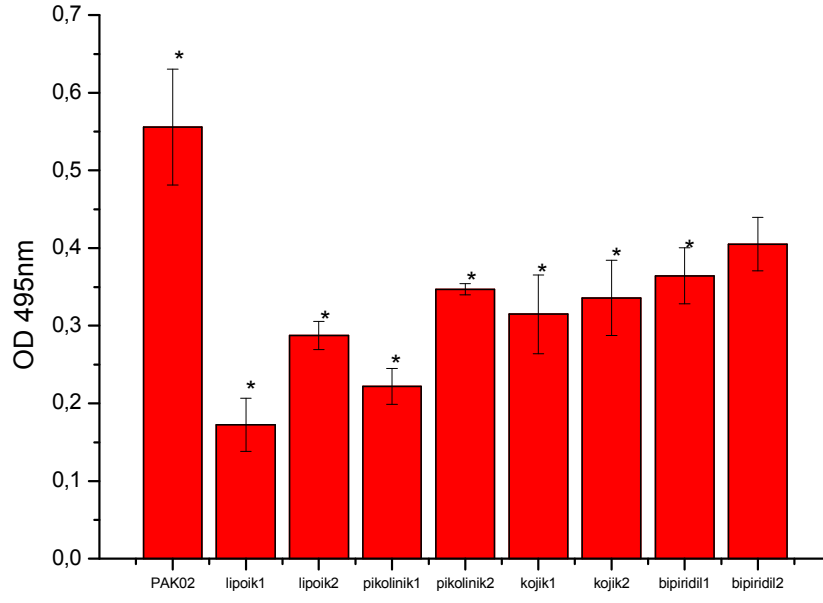
Şekil 9.3. *P.aeruginosa* PAK01 klinik izolatu için 2,2-bipiridil(1) (0,125mM), 2,2-bipiridil(2) (0,0625mM), lipoik asit(1) (4mM), lipoik asit(2) (2mM), kojik asit(1) (2mM), kojik asit(2) (1mM), pikolinik asit(1) (2mM), pikolinik asit(2) (1mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) elastaz aktivitesi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



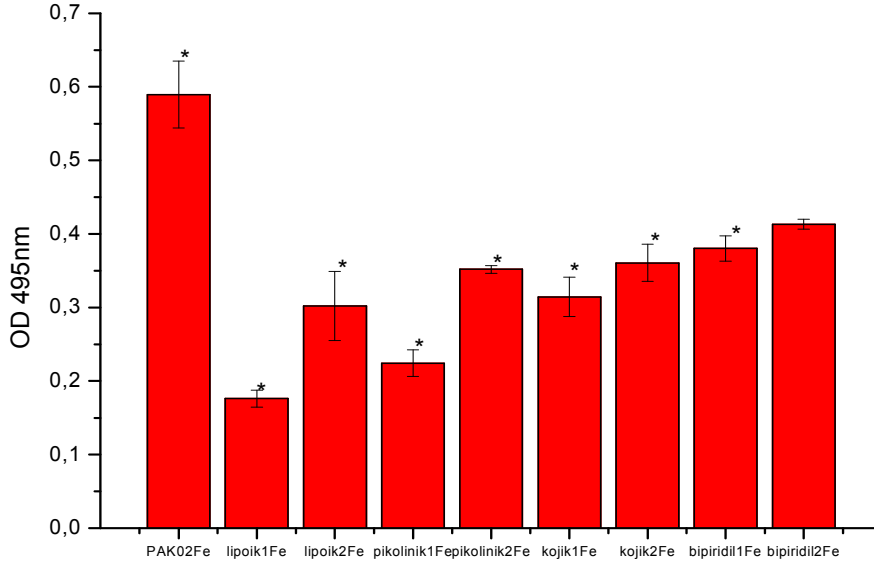


Şekil 9.4. *P.aeruginosa* PAK01 klinik izolatının ortamda 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2' bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbands değerleri

*P. aeruginosa* PAK01 için 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), pikolinik asit1 (2mM) ve pikolinik asit2 (1mM)'nin elastaz üretimine etkileri incelenmiştir (Şekil 9.3.a). Test sonucunda elastaz üretimi için inhibisyon değerleri lipoik asit1 %65, lipoik asit2 %57, pikolinik asit1 %57, pikolinik asit2 %46, kojik asit1 %33, kojik asit2 %31, 2,1'-bipiridil1 %36 ve 2,2'-bipyridyl2 %28 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman ise inhibisyon oranları lipoik asit1 %73, lipoik asit2 %69, pikolinik asit1 %61, pikolinik asit2 %45, kojik asit1 %50, kojik asit2 %49, 2,2'-bipiridil1 %40 ve 2,2'-bipiridil2 %29 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyonunun lipoik asit için %65 olduğu tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 9.3.b) ise en etkili inhibisyona yine lipoik asitin (%73) neden olduğu bulunmuştur. *P.aeruginosa* PAK01 klinik izolatının her iki test ortamı için OD600nm'deki absorbands değerleri Şekil.9.4.'de verilmiştir.

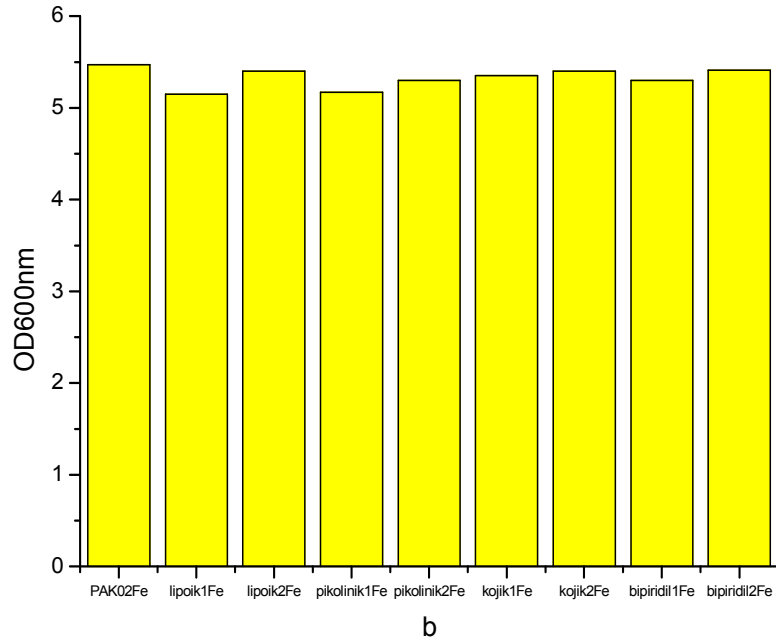
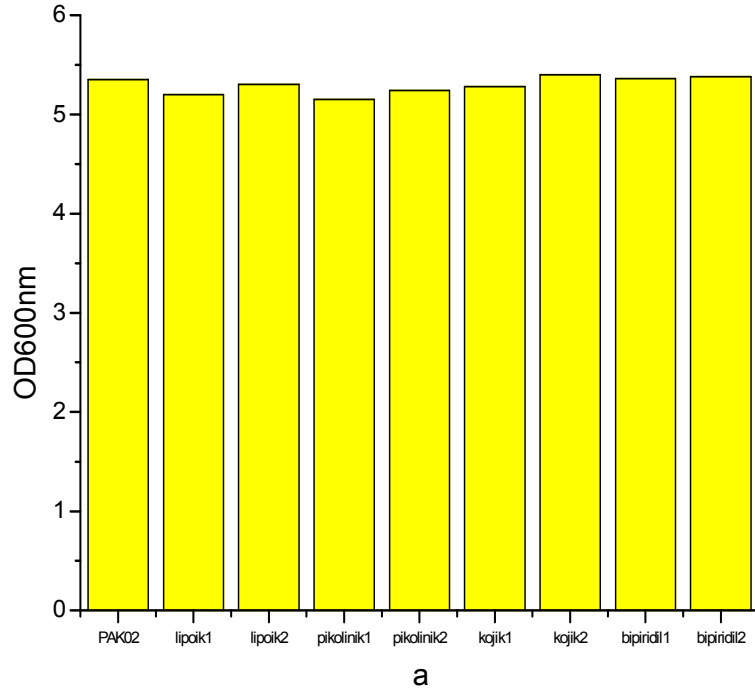


a



b

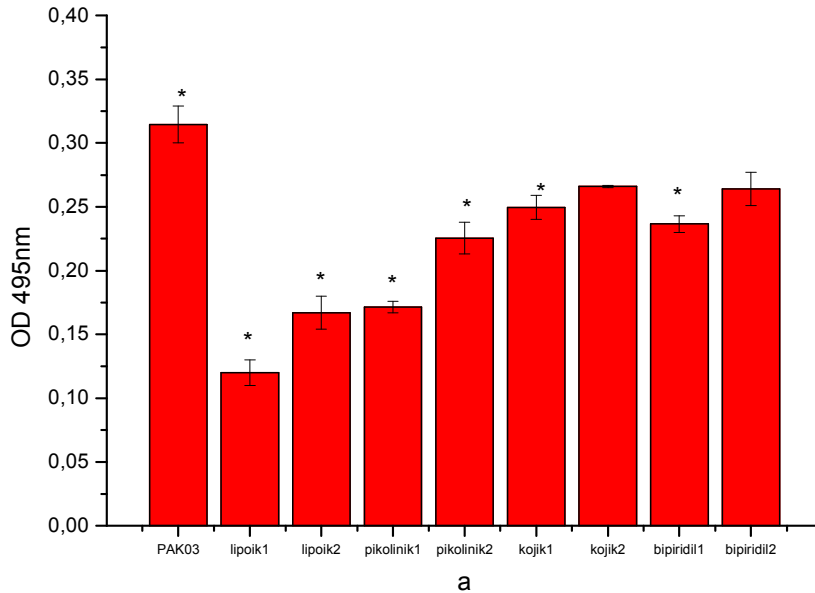
Şekil 9.5. *P.aeruginosa* PAK02 izolatu için ortama 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) elastaz üretimine etkisi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

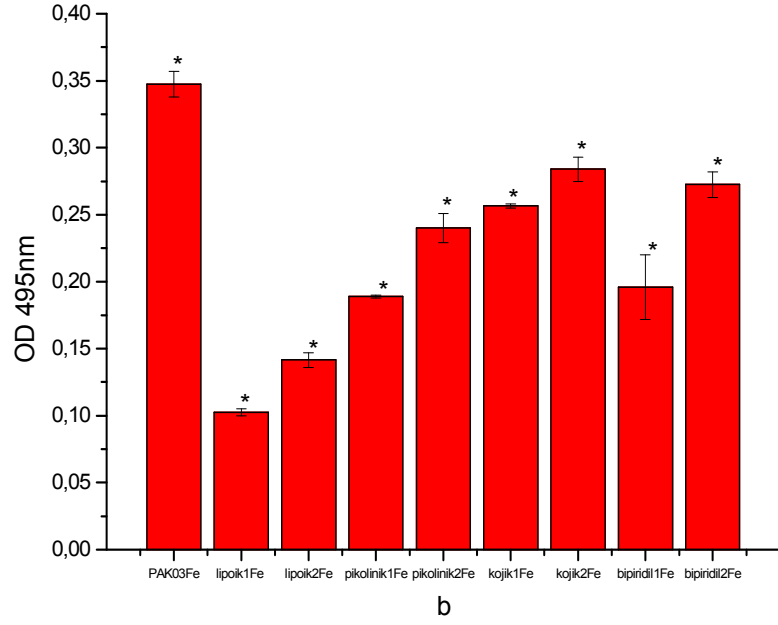


Şekil 9.6. *P.aeruginosa* PAK02 izolatu için ortamda 2,2-biperidil1 (0,125mM), 2,2-biperidil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2

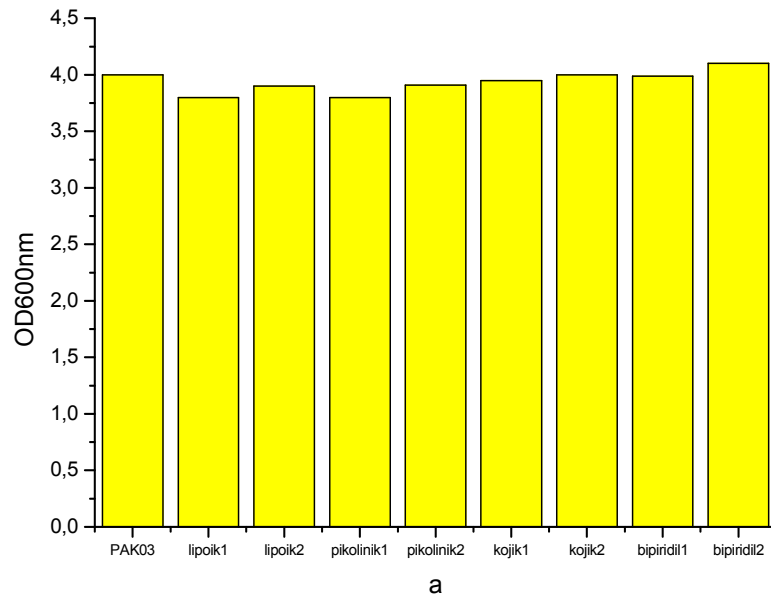
(1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbans değerleri

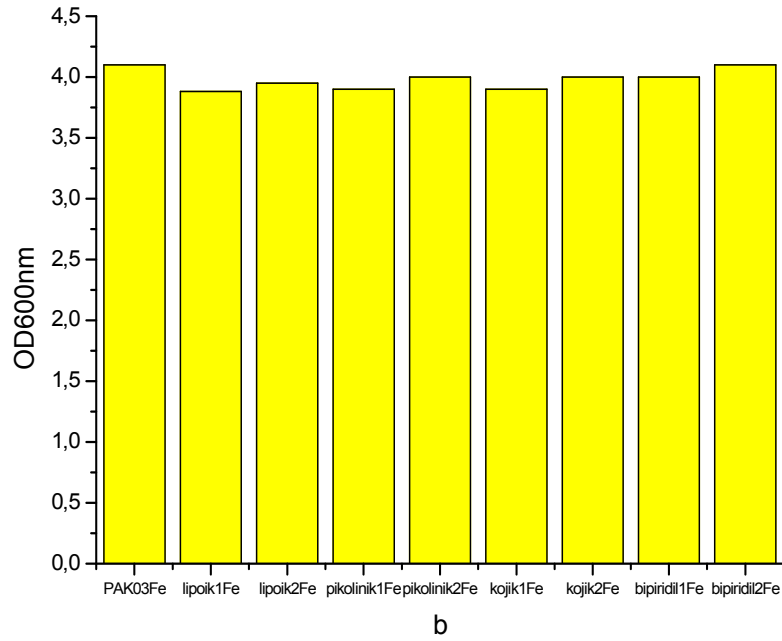
*P. aeruginosa* PAK02 için 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), pikolinik asit1 (2mM) ve pikolinik asit2 (1mM)'nin elastaz üretimine etkileri incelenmiştir (Şekil 9.5.a). Test sonucunda inhibisyon değerleri lipoik asit1 %69, lipoik asit2 %48, pikolinik asit1 %60, pikolinik asit2 %38, kojik asit1 %43, kojik asit2 %40, 2,2'-bipiridil1 %34 ve 2,2'-bipiridil2 %27 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman inhibisyon oranları lipoik asit1 %70, lipoik asit2 %49, pikolinik asit1 %62, pikolinik asit2 %40, kojik asit1 %47, kojik asit2 %39, 2,2'-bipiridil1 %35 ve 2,2'-bipiridil2 %30 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerlerinin; lipoik asit1 %69, pikolinik asit1 %60 olduğu, ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiğinde (Şekil 9.5.b) ise en etkili inhibisyon değerleri; lipoik asit1 %70, pikolinik asit1 %62 olarak tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* PAK02 izolatının her iki test ortamı için OD600nm'deki absorbans değerleri Şekil.9.6.'da verilmiştir.





Şekil 9.7. *P.aeruginosa* PAK03 izolatu için 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) elastaz üretimine etkisi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.





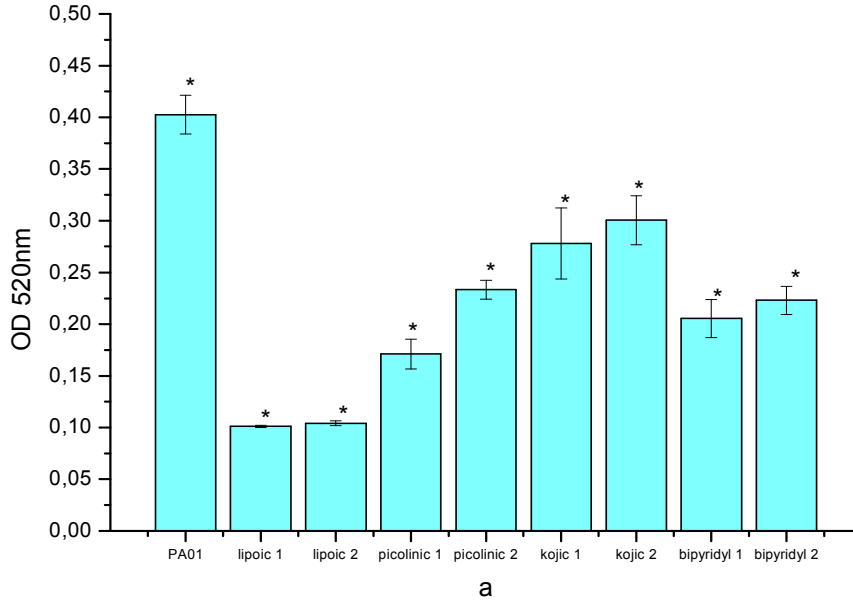
Şekil 9.8. *P.aeruginosa* PAK03 izolatı için 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (2mM), pikolinik asit2 (1mM) (a) ve 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) 600nm'deki absorbans değerleri

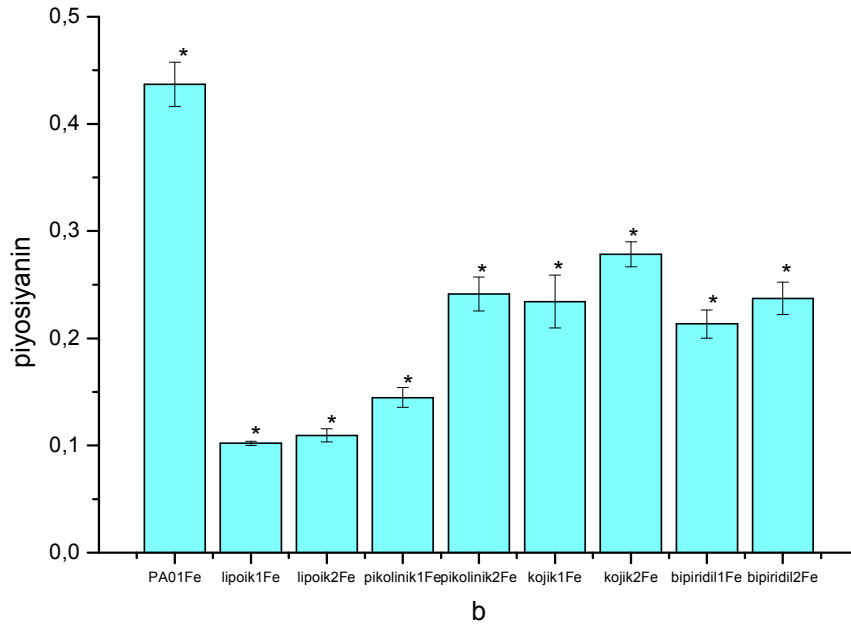
*P.aeruginosa* PAK03 izolatı için elastaz üretimine 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), lipoik asit1 (4mM), lipoik asit2 (2mM), pikolinik asit1 (2mM) ve pikolinik asit2 (1mM)'nin etkisi incelenmiştir (Şekil 9.7.a). İstatistiksel analiz sonucunda inhibisyon değerleri lipoik asit1 %62, lipoik asit2 %47, pikolinik asit1 %45, pikolinik asit2 %28, kojik asit1 %21, kojik asit2 %15, 2,2'-bipiridil1 %25 ve 2,2'-bipiridil2 %16 olarak tespit edilmiştir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100µM) ilave edildiği zaman ise inhibisyon oranları lipoik asit1 %71, lipoik asit2 %59, pikolinik asit1 %46, pikolinik asit2 %31, kojik asit1 %26, kojik asit2 %18, 2,2'-bipiridil1 %44 ve 2,2'-bipiridil2 %22 olarak tespit edilmiştir (Şekil 9.7.b). İstatistiksel analiz sonucunda en yüksek inhibisyon yüzdesine lipoik asit1 %62, pikolinik asit1 %45 neden olduğu tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* PAK03 izolatı için her iki test ortamı OD600nm'deki absorbans değerleri Şekil.9.8.'de verilmiştir.

#### 4.8. Kojik Asit, Lipoik Asit, Pikolinik Asit ve 2,2'-bipiridil'in Piyosiyenin Üretimine Etkisi

Piyosiyenin, *P. aeruginosa*'nın mavi-yeşil pigment metabolitidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, piyosiyenin hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır (Karatuna ve Yağcı, 2008). Piyosiyenin ayrıca  $\alpha$ 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara neden olur (Karatuna ve Yağcı,2008).

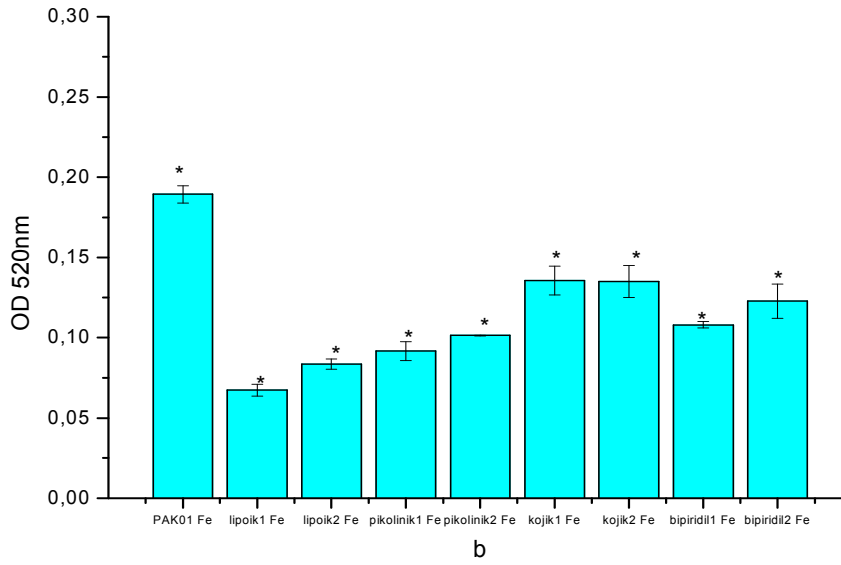
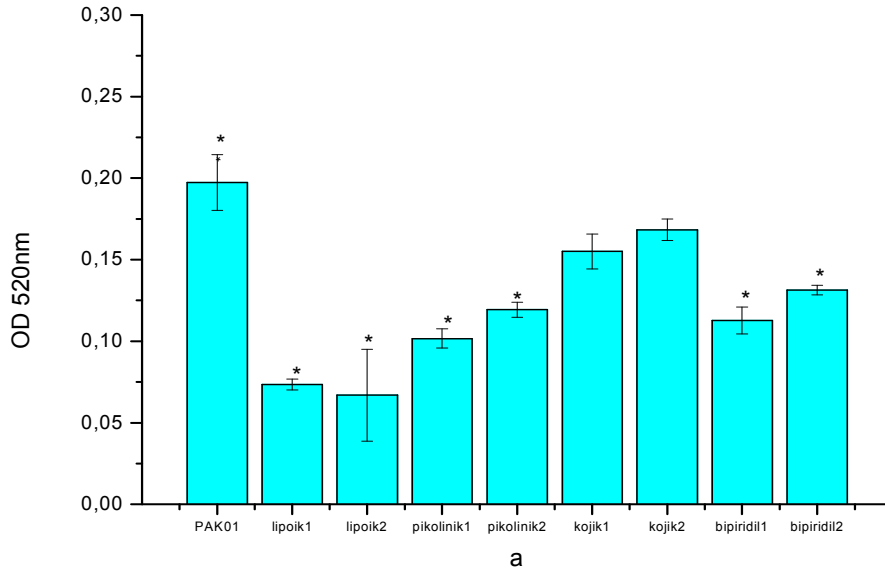
*P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatları için 2,2'bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asitin piyosiyenin üretimine etkileri araştırılmıştır.





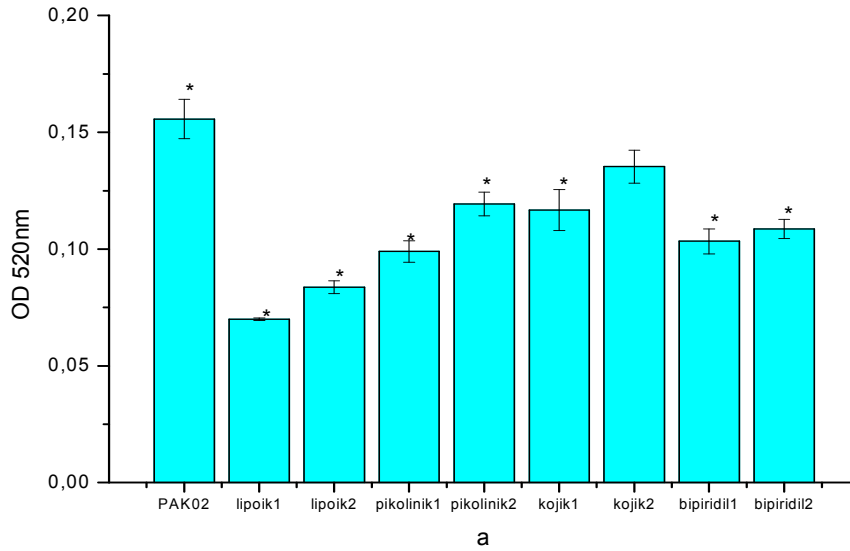
Şekil 10.1. *P.aeruginosa* PA01 için ortamda 2,2'-bipiridil1 (0,125mM), 2,2'-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (2mM), lipoik asit2 (1mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (1mM), pikolinik asit2 (0,5mM) varlığında (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) piyosiyenin üretimi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

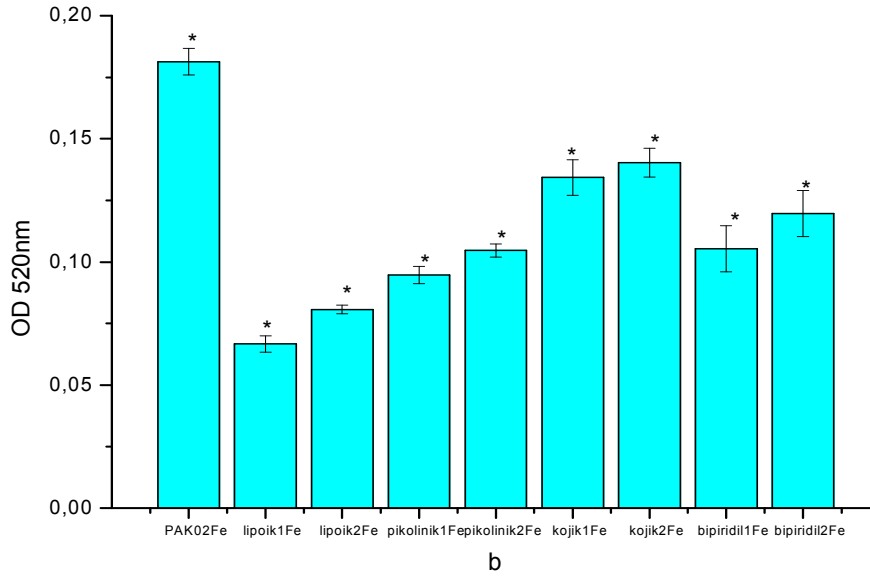
Piyosiyenin testinde 2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit iki farklı derişimde çalışılmıştır. *P. aeruginosa* PA01 de piyosiyenin üretimini lipoik asit 1 (2mM) %75, lipoik asit 2 (1mM) %74, pikolinik asit 1 (1mM) %58, pikolinik asit 2 (0,5mM) %42, kojik asit 1 (2mM) %31, kojik asit 2 (1mM) %25, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %49, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %45 oranında inhibe etmiştir (Şekil 10.1.a). Ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> ilave edildiğinde inhibisyon oranları artarak, lipoik asit 1 (2mM) %77, lipoik asit 2 (1mM) %75, pikolinik asit 1 (1mM) %67, pikolinik asit 2 (0,5mM) %45, kojik asit 1 (2mM) %46, kojik asit 2 (1mM) %36, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %51, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %46 olarak tespit edilmiştir (Şekil 10.1.b).



Şekil 10.2. *P.aeruginosa* PAK01 izolatu için, ortamda 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (2mM), lipoik asit2 (1mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (1mM), pikolinik asit2 (0,5mM) varlığında (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) piyosiyanın üretimine etkisi One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

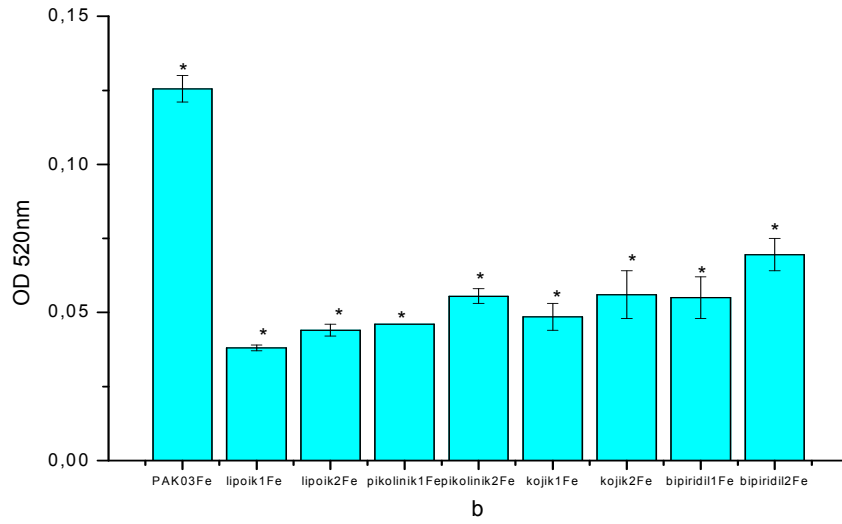
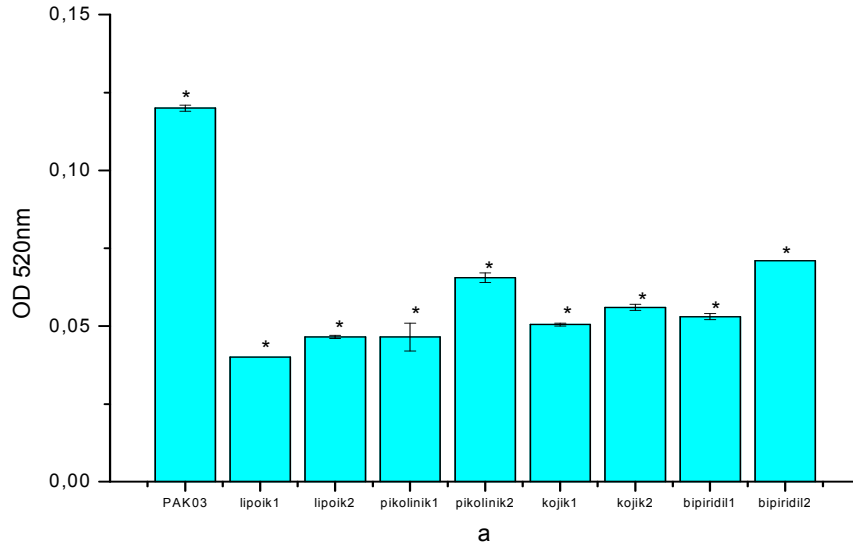
*P. aeruginosa* PAK01 izolatu için lipoik asit 1 (2mM) %63, lipoik asit 2 (1mM) %49, pikolinik asit 1 (1mM) %48, pikolinik asit 2 (0,5mM) %40, kojik asit 1 (2mM) %21, kojik asit 2 (1mM) %15, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %43, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %33 oranında piyosiyenin üretimini inhibe etmiştir (Şekil 10.2.a). Ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> ilave edildiğinde inhibisyon oranları, lipoik asit 1 (2mM) %64, lipoik asit 2 (1mM) %56, pikolinik asit 1 (1mM) %52, pikolinik asit 2 (0,5mM) %46, kojik asit 1 (2mM) %28, kojik asit 2 (1mM) %25, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %43, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %35 olarak tespit edilmiştir ve kontrol ile uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 10.2.b).





Şekil 10.3. *P.aeruginosa* PAK02 izolatu için ortamda 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (2mM), lipoik asit2 (1mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (1mM), pikolinik asit2 (0,5mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) piyosiyenin üretimi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

*P. aeruginosa* PAK02 izolatında piyosiyenin üretimini lipoik asit 1 (2mM) %55, lipoik asit 2 (1mM) %46, pikolinik asit 1 (1mM) %36, pikolinik asit 2 (0,5mM) %23, kojik asit 1 (2mM) %25, kojik asit 2 (1mM) %13, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %34, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %30 oranında inhibe etmiştir (Şekil 10.3.a). Ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> ilave edildiğinde inhibisyon oranları, lipoik asit 1 (2mM) %63, lipoik asit 2 (1mM) %56, pikolinik asit 1 (1mM) %48, pikolinik asit 2 (0,5mM) %42, kojik asit 1 (2mM) %26, kojik asit 2 (1mM) %23, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %42, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %34 olarak tespit edilmiştir ve kontrol ile uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 10.3.b).



Şekil 10.4. *P.aeruginosa* PAK03 izolatu için, ortamda 2,2-bipiridil1 (0,125mM), 2,2-bipiridil2 (0,0625mM), lipoik asit1 (2mM), lipoik asit2 (1mM), kojik asit1 (2mM), kojik asit2 (1mM), pikolinik asit1 (1mM), pikolinik asit2 (0,5mM) (a) ve ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde (b) piyosiyenin üretimi. One way Anova ile analiz edilmiş (\*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

*P. aeruginosa* PAK03'te lipoik asit 1 (2mM) %67, lipoik asit 2 (1mM) %61, pikolinik asit 1 (1mM) %61, pikolinik asit 2 (0,5mM) %45, kojik asit 1 (2mM) %25, kojik asit 2 (1mM) %58, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %56, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %40 oranında piyosiyenin üretimini inhibe etmiştir (Şekil 10.4.a). Ortama 100µM FeCl<sub>3</sub> ilave edildiğinde inhibisyon oranları, lipoik asit 1 (2mM) %70, lipoik asit 2 (1mM)

%65, pikolinik asit 1 (1mM) %63, pikolinik asit 2 (0,5mM) %56, kojik asit 1 (2mM) %61, kojik asit 2 (1mM) %55, 2,2'-bipiridil 1 (0,125 mM) %56, 2,2'-bipiridil 2 (0,0625 mM) %45 olarak tespit edilmiştir (Şekil 10.4.b). Kontrol ile uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde, bakterilerde hücreler arası iletişimi sinyal molekülleri aracılığı ile sağladıkları bilinmektedir. Pek çok bakteride bu hücreler arası iletişim sistemi çevreyi (çoğunluğu) algılama sistemi aracılığı ile düzenlenir ve virülens faktörlerinin üretimi, biyofilm oluşturulması, pigment üretimi ve antibiyotik üretimi gibi özellikler bu sistem tarafından genetik olarak kontrol edilir. *P. aeruginosa* fırsatçı bir insan patojenidir ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa*'nın hastalık oluşturmak için gerekli virülens faktörlerinin (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin, piyoverdin, fosfolipaz, ekzotoksin A üretimi) üretimi ve biyofilm oluşumu çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilir. Hastalık oluşturulması sırasında çevreyi algılama sistemini kullanan patojenlerde bu sisteminin modifiye edilmesi veya yönlendirilmesiyle virülens azaltılabilmektedir (Bjorn vd., 1979; Jhonson ve Boese-Marrazzo, 1980; Pearson vd., 1997). Bu nedenle bu iletişim sistemini kullanan bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için önemli bir alternatif sunmaktadır.

Bu tez çalışması sonucunda daha önce çevreyi algılama sistemi üzerine inhibitör etkileri rapor edilen bazı şelatörlerin (Lamont vd., 2002; Manning vd., 2009) dışında lipoik asit ve kojik asitin de *P. aeruginosa*'da elastaz ve piyosiyenin üretimi, kayma hareketi ve biyofilm oluşumunu bakteri gelişimini engellemeden inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu durum özellikle biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için ilaç geliştirilmesinde ortaya çıkabilecek antibiyotik direncinin engellenmesi açısından önem taşımaktadır (Moriyama ve Homma, 1985).

2,2'-bipiridil, kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit biyofilm oluşumunu sırasıyla en fazla %25, %27, %33 ve % 28 oranında inhibe etmişlerdir. Ortama FeCl<sub>3</sub> (100μM) eklendiğinde ise biyofilm oluşumu için inhibisyon oranları sırasıyla %28, %31, %33 ve % 28 şeklindedir.

Musk ve Hergenrother (2008), tarafından yapılan çalışmada 250 μmol l<sup>-1</sup> pikolinik asit:FeCl<sub>3</sub> karışımının biyofilm oluşumu üzerine %50 ve daha fazla inhibitör etkisini bulunduğunu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise aynı derişimde pikolinik asit:FeCl<sub>3</sub> karışımının test edilen tüm izolatlar ve *P. aeruginosa* PA01 suşu için benzer şekilde %50-57 oranında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca lipoik asit %40-55, kojik asit %39-57 ve 2,2'-Bipiridil %41-55 oranında inhibisyona neden olduğu tespit edilmiş olup, lipoik asit için *P. aeruginosa* da biyofilm oluşumu için inhibitör etki ilk kez rapor edilmiştir.

Ayrıca, *P.aeruginosa* PA01 suşunda elastaz aktivitesi için inhibisyon yüzdeleri, lipoik asit (4mM) %69, pikolinik asit (2mM) %54, , kojik asit (2mM) %35 olarak tespit edilmiştir. Test ortamına 100μM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde elastaz aktivitesi için inhibisyon yüzdeleri, lipoik asit (4mM) %73, pikolinik asit (2mM) %58, kojik asit (2mM) %45 olarak tespit edilmiştir. Klinik izolatlardan *P. aeruginosa* PAK01'de lipoik asit (4mM) elastaz üretiminde %65 oranında inhibisyona neden olmuştur. Test ortamına 100μM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde ise lipoik asit (4mM)'te inhibisyon oranınının %73 olduğu tespit edilmiştir.

Kayma hareketi için araştırıldığında ise yine en yüksek inhibisyona (test ortamına 100μM FeCl<sub>3</sub> eklendiğinde *P.aeruginosa* PA01 ve *P.aeruginosa* PAK01 suşlarında sırasıyla %83 ve %79 oranında) lipoik asit (4mM) neden olmuştur.

Demir şelatörlerinin ortamdaki demiri bağlayarak *P. aeruginosa* için kullanımını kısıtlaması biyofilm oluşumu için inhibitör etki oluşurmaktadır. Bu çalışmada demir şelatörlerinden özellikle kojik asit, lipoik asit ve pikolinik asit *P.aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlarda biyofilm oluşumunu önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Pikolinik asit, triptofan katabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak vücut tarafından

üretilmektedir, yüksek konsantrasyonlarda toksik değildir ve ferrik pikolinat insanlarda demir eksikliğinin tedavisi için kullanılmaktadır (Manning vd., 2009).

Kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde diğer insanlara göre 400 kat daha fazla demir bulunması (Morihara, 1964), *P. aeruginosa*'nın daha kolay biyofilm oluşturmasına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle özellikle *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde şelatörlerin kullanımı, yeni bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Dahası FDA onaylı bazı şelatörlerin (deferoksamin ve deferasiroks) kistik fibrozisli hastalarda, tobramisin ile kombine kullanıldığı zaman, antibiyotik dirençli biyofilm oluşumunu % 90 civarında azalttığı rapor edilmiştir (Morihara, 1964).

Lipoik asitin *P. aeruginosa* için biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkisi bu çalışma ile ilk defa rapor edilmektedir. Lipoik asitin FDA tarafından kullanımına izin verilen, suda ve yağda çözünebilen vitamin benzeri bir antioksidan olması, Pseudomonal biyofilm enfeksiyonlarının engellenmesi için yapılacak çalışmalarda şelatör olarak veya diğer antibiyotiklerle kullanımını konu alacak çalışmalar için potansiyel taşımaktadır. Aynı zamanda *P. aeruginosa* için elastaz ve piyosiyenin üretimi ve kayma hareketi üzerine güçlü inhibitör etkisi ilk defa tespit edilmiş olup bu konu ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar için ışık tutabilecek niteliktedir.

Bu alanda yapılacak daha detaylı çalışmalar ile *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için özellikle lipoik asitin tek başına veya ilaçlarla kombine olarak destekleyici özelliğini ortaya çıkarmak için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P., 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11076-11081.
- Banin, E., Brady, K.M. & Greenberg, E.P., 2006. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 72, 2064-2069.
- Bentley, R., 2006. "From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid", *Nat. Prod. Rep.*, 23, 1046-1062.
- Berktaş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Yaman, G., Güdücüoğlu, H., 2011. Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotiklere direnç. *Van tıp dergisi* 18(4):192-196.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J., 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *Journal of Bacteriology* 191(11): 3517-3525.
- Braun, V., & Hantke, K., 1997. Receptor-mediated bacterial iron transport. In *Transition Metals in Microbial Metabolism*. Edited by G. Winkelmann & C. J. Carrano. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. pp.81-101.
- Braun, V., 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:67-79.
- Bjarnsholt, T., Gennip, M.V., Jakobsen, T.H., Christensen, L.D., Jensen, P.Ø., Givskov, M., 2010. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature Publishing Group*, 5(2), 282-293.
- Bjorn, M.J., Sokol, P.A., and Iglewski, B.H., 1979. Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol* 138: 193-200.
- Bosco, M. C., Rapisarda, A., Reffo, G., Massazza, S., Pastorino, S., Varesio, L., 2003. Macrophage Activating Properties of The Tryptophan Catabolite Picolinic Acid. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 527, pp 55-65.
- Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol*; 75(6): 499-511.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284(5418): 1318-22.

- Çiftçi, İ.H., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F., Altındış, M., 2005. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg. 35(2): 98-102.
- De Kievit, T.R., 2008. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol 11: 279–288.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiology 149: 2005–2013.
- Drechsel, H., & Winkelmann, G., 1997. In Transition Metals in Microbial Metabolism, eds. Winkelmann, G. & Carrano, C. J. (Harwood Academic, Amsterdam), pp. 1-49.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev; 15(2):167-93.
- Doring, G., Obernesser, H.J., and Botzenhart, K., 1981. Extracellular toxin of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA. Zentrabl. Bacteriol. Mmicrobiol. Hyg. 1 Abt. Orig. Reihe A 249:89-98.
- Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K., 1995. Biofilm-related infections in ophthalmology. Eye; 9(Pt 1): 102-9.
- Gazi, H., Özkütük, N., Akçalı, S., Ecemiş, T., Sürücüoğlu, S., Şanlıdağ, T., Özbakkaloğlu, B., 2006. Çeşitli dezenfektanların *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı etkinliklerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol. Cemiyet Dergisi, 36(1):5-8.
- Glick, R., Gilmour, C., Tremblay, J., Satanower, S., Avidan, O., Deziel, E., Greenberg, E. P., Poole, K. and Banin E., 2010. Increase in Rhamnolipid Synthesis under Iron-Limiting Conditions Influences Surface Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. American Society for Microbiology, 192, no. 12, p.2973-2980.
- Griffiths, E., 1987. In Iron and Infection, eds, Bullen, J. J. & Griffiths, E. (Wiley, Chichester, U.K), pp. 1-25.
- Guerinot, M. L., 1994. Microbial Iron Transport. Annu. Rev. Microbiol. 48, 743-772.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86(6), pp: 985-990.
- Hamood, A.N., Griswold, J., Colmer, J., 1996. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. Infect Immun, 64, 3154-3160.

- Huston, W. M., Potter, A. J., Jennings, M. P., Rello, J., Hauser, A. R., McEwan, A. G., 2003. Survey of Ferroxidase Expression and Siderophore Production in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No.6, p. 280-2809.
- Jiricny, N., Molin, S., Foster, K., Diggle, SP., Ghoul, M., Johansen, HK., Santorelli, LA., Popat, R., West, SA., Griffin, AS., 2014. Loss of Social Behaviours in Populations of *Pseudomonas aeruginosa* Infecting Lungs of Patients with Cystic Fibrosis. *Plos one* Vol:9 Issue:1 1-10.
- Johnson, M.K., and Boese-Marrazzo, D., 1980. Production and properties of heat stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29: 1028-1033.
- Karaca, G. E., 2009. Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 8(1):231-245.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* Vol. 99, no. 10, 7072-7077.
- Manning, T., Kean, G., Thomas, J., et al., 2009. Iron Chelators in Medicinal Applications – Chemical Equilibrium Considerations in Pharmaceutical Activity. *Current Medicinal Chemistry*; 16: 2416-2429.
- Meyer, JM., and Hornsperger, JM., 1978. Role of pyoverdine, the Iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in Iron transport. *J Gen Microbiol* 107:329
- Morihara, K., 1964. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. bacteriol*; 88:745-757.
- Morihara, K., and Homma, J.Y., 1985. *Pseudomonas* proteases, p. 41-79. In Holder IA (ed.), *Bacterial enzymes and virulence*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Musk, D.J., Banko, D.A. & Hergenrother, P.J., 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol* 12, 789 796.
- Musk, D.J., and Hergenrother, P.J., 2008. Chelated iron sources are inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and distribute efficiently in an *in vitro* model of drug delivery to the human lung. *Journal of Applied Microbiology* 105, 380-388.
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-26726.

- Nicas, T.I., Iglewski, B.H., 1985. The contribution of exoproducts to virulence of *P. aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 31, 387-392.
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., and Reiser, J., 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176: 2044-2054.
- Oglesbay, A.G., Farrow III, J.M., Lee, J., et al., 2008. The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa*. *Physiology. The Journal of Biological Chemistry* 283( 23): 15558-15567.
- Ohman, D.E., Cryz, S. J., Iglewski, B. H., 1980. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PA0 Mutant That Produces Altered Elastase. *Journal of Bacteriology* Vol: 142 (3), p. 836-842.
- O'Toole, G. A., and Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* Vol: 30(2) pp 295-304.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Türk Dağı, H., Baykan, M., Baysal, B., 2009. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg*; 23:122-126.
- Parsek, M.R., and Singh, P.K., 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57: 677-701.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H., 1993. Expression of *P. aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260, 1127-1130.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H., 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18): 5756-5767.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005. Screening for quorum sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.*, 187, 1799–1814.
- Sakarya, S., 16-20 Kasım 2005. Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. In: Çavuslu S, Oral Ö, editors. 12.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi; Antalya-Belek. 3-8.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, P.E., and Welsh, M.J., 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417: 552-555.

Topçu Albayrak, G., 2008. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde çift disk sinerji ile metallo-betalaktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Şefliği.

Uludağ Altun, H., ve Şener, B., 2008. Biyofilm Enfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Hacettepe tıp Dergisi; 39:82-88.

Ulusoy, S., 2007. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında N-Acil Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Van Delden, C., and Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infection. Emerg Infect Dis 4: 551-560.

Wooldridge, K. G., and Williams, P. H., 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:325-348.

Yabuta, T., 1924. "The constitution of kojic acid, a gamma-pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates". Journal of the Chemical Society 125: 575–587.

http1: <http://www.suvecevre.com/?pid=28529> Erişim tarihi 08.10.2014

http2: [www.beslenmedestegi.com/dogal-urun/alfa-lipoik-asit-nedir](http://www.beslenmedestegi.com/dogal-urun/alfa-lipoik-asit-nedir)

## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Kübra ÇEVİK

Doğum Yeri ve Yılı : Antalya, 1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : kubracevik-88@hotmail.com

## **Eğitim Durumu**

Lise : (Y.D.A.) Manavgat Lisesi, 2006

Lisans : SDÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü