



TC.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZİSDE OLUŞAN SOLUNUM
ENFEKSİYONLARINDA BAKTERİ FENOTİPİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. Meryem Özlem ERSOY

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serhan SAKARYA

AYDIN - 2013

TC.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZİSDE OLUŞAN SOLUNUM
ENFEKSİYONLARINDA BAKTERİ FENOTİPİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. Meryem Özlem ERSOY

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serhan SAKARYA

AYDIN – 2013

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince beni hayat ve iş disiplini konusunda yönlendiren ve eğiten, mesleki bilgi ve tecrübelerini aktaran, uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım ve yetişmemde büyük emeği olan, sayın hocalarım Prof. Dr. Serhan Sakarya, Prof. Dr. Serkan Öncü, Doç. Dr. M. Bülent Ertuğrul, Yrd. Doç. Dr. Ş. Barçın Öztürk ve Yrd. Doç. Dr. Güliz Uyar Güleç'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, eğitimim boyunca becerilerimin gelişmesinde rol alan, çalışkanlığı ve sabrına hayran olduğum tez danışmanım sayın Prof. Dr. Serhan Sakarya'ya ayrıca minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin yapım aşamasında yardım ve önerileriyle katkılarını esirgemeyen Biyolog Necati Günay'a da ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlığım süresince daima desteklerini gördüğüm, tüm zamanımı paylaştığım asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin bütün çalışanlarına ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, özveri ve sabır abidesi eşime, gülümsemesi ile tüm stresimi alan canım oğluma ve tüm aileme teşekkür ederim.

Dr. Meryem Özlem ERSOY

AYDIN-2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. KİSTİK FİBROZİS.....	2
2.3. GENETİK.....	3
2.4. MUTASYONLAR	4
2.5. PATOGENEZ.....	5
2.6. AKCİĞER HASTALIKLARININ PATOGENEZİ.....	6
2.7. KİLİNİK BULGULAR	8
2.8. MİKROBİYOLOJİ	10
2.9. TANI	11
2.10. TEDAVİ	13
2.11.KF'TE YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI	15
2.12. PSEUDOMONAS AERUGİNOSA	15
2.12.1. TARİHÇE	15
2.12.2. EPİDEMİYOLOJİ.....	16
2.13. PSEUDOMONAS AERUGİNOSA ÖZELLİKLERİ	16
2.13.1. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri.....	18
2.13. 2. Quorum Sensing ve <i>P.Aeruginosa</i> Pato Genesindeki Önemi.....	21
2.14. BİYOFİLM	22
2.14.1. Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturmaktadır	24
2.15.KİSTİK FİBROZİS VE P.AERUGİNOSA İLİŞKİSİ	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Hücre ve Bakteriler	26
3.2.Klinik İzolatın Tiplendirilmesi	27
3.3.Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.4.Adherans Yöntemi	27
3.5.Büyüme oranları ve Slime üretim oranlarının bakılma yöntemi	28

3.6.İstatistik Yöntem.....	28
4.BULGULAR	29
4.1.Aderans.....	29
4.2.Bakteri büyüme oranları	30
4.3.Slime Oluşumu.....	31
5.TARTIŞMA.....	34
6.SONUÇ	38
ÖZET	39
SUMMARY	40
KAYNAKLAR.....	41

TABLO LİSTESİ

TABLO 1 KFTR protein aktivitesinin fenotipik etkisi.....	3
TABLO 2 Toplumumuzdaki KFTR mutasyon oranlar.....	5

ŞEKİL LİSTESİ

- ŞEKİL 1. *P. aeruginosa* nın normal (açık renkli bar) ve CF (koyu renkli bar) trakeal ve bronşiyal epitelyum hücrelerine adherans oranı karşılaştırılması.....29
- ŞEKİL 2. Normal ve CF li trakeal ve bronşiyal epitellere GFP *P. aeruginosa* aderansı.....30
- ŞEKİL 3. Farklı zaman dilimlerinde tüm hücrelerin büyüme oranları kontrol grubu ve kendi aralarında karşılaştırılması.....31
- ŞEKİL 4. Normal ve CF li trakeal epitelyum hücrelerinde slime üretimi kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.....32
- ŞEKİL 5. Normal ve CF li trakeal epitelyum hücrelerinde slime üretimi kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.....32
- ŞEKİL 6. GFP *P.aeruginosa*'nın 1HEA, CFTE, BEAS, IB3-1 hücrelerindeki slime üretimine bakılması ve slime oluşturma oranları kontrol grubu ve hücrelerin kendi arasında karşılaştırılması.....33

KISALTMALAR

KF: Kistik Fibrozis

CF: Kistik Fibrozis

KFTR: Kistik Fibrozis Transmembran Regulator

NBD: Nükleotid bağlama bölgesi

ABC: ATP binding cassette

IL: İnterlökin

TNF alfa: Tümör nekrozis faktör alfa

Cl: Klor

SFT: Solunum Fonksiyon Testi

FEV: Forced Expiratory Volume

NTM: Nontüberkülozis bakteriler

mmol/L: Milimol/litre

TSI: Triple sugar iron

LPS: Lipopolisakkarit

kDa: Kilodalton

IgG: İmmunglobulin G

EF-2: Elongasyon faktörü

PMNL: Polimorfonükleer lökosit

QS: Quorum Sensing

GFP: Green Floresan Transfer edilmiş *Pseudomonas aeruginosa*

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kistik Fibrozis (KF), sindirim sistemi, endokrin ve solunum sistemi gibi birçok sistemi ilgilendiren yüksek mortaliteye sahip otozomal resesif genetik bir hastalıktır. Epitelyumda çözünmüş madde transportunun bozulmuş olması en karakteristik patolojidir. Bu patolojiye bağlı olarak hava yollarında oluşan dehidratasyon ve artmış mukus sekresyonu özellikle kronik bakteriyel enfeksiyonların oluşması için çok elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* gibi aynı veya yakın türlerden oluşan Gram negatif bakterilerin bu hastalarda sıklıkla izole edilmesi ve KF' li hastalardan izole edilen izolatlarda biyofilm oluşturma gibi fenotipik farklılıklar akla biyofilm yapının kistik fibrozis akciğer enfeksiyonlarında enfeksiyonun eradike edilememesi ve antibiyotik direncinde en etkili virülans faktör olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmanın amacı *In vitro* koşullarda KF li ve normal insan epitelyumunun *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilmesi sonrasında bakterinin fenotipik yapı (biyofilm oluşumu, aderans oluşumu, büyüme oranları, morfolojik değişiklikler) özelliklerindeki değişimlerinin tespit edilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KİSTİK FİBROZİS

KF beyaz ırkın sık rastlanan, ölümcül bir hastalığıdır [1]. Klinik olarak kronik akciğer enfeksiyonları bunun yanısıra gastrointestinal, nutrisyonel ve diğer anomalilerle karakterizedir [2]. Hastalığın kalıtım modeli otozomal resesif olup, görülme sıklığı 1/2000-3500 canlı doğumda bir, taşıyıcılık oranı ise 1/25 olarak bildirilmektedir [3]. Hastalığın insidansı popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla beraber toplumumuzda KF sıklığının 3000 de 1 olduğu görülmektedir. Ancak akraba evliliklerinin sık olması ve 5 yaşın altındaki çocuklarda altta yatan neden bilinmeksizin ishal ve solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle kaybedilen çocukların oranının yüksek olması göz önüne alınırsa, bu oranın daha yüksek olduğu açıktır [1,4]. Hastaların ortalama yaşam süresi 1940-1950'li yıllarda yaklaşık 5 yıl iken, yeni tedavi yöntemlerinin kullanılması ile yaşam süresi 31 yaşa kadar uzamıştır [4]. Özellikle 1989 yılında KF geninin klonlanmasından sonra yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesi hız kazanmıştır [5]. Önceden bir çocukluk hastalığı olarak tanımlanırken artık erişkinleri de ilgilendiren bir hastalık haline gelmiştir.

1938'den önce KF sindirim ve solunum sisteminin farklı klinik sendromlarının toplamı olarak değerlendiriliyordu [2]. KF genetik temelini büyük ölçüde anlamamız 1938 yılında Dorothy Anderson tarafından 49 kistik fibrozisli hasta üzerinde yapılan detaylı çalışma ile olmuştur [5]. Bu çalışmada hastalar ölüm yaşlarına göre 3 kategoriye ayrılmış. Grup 1, 1 haftadan önce ölen bebekleri kapsıyor, grup 2, 1 hafta ile 6 ay arasında yaşayanlar, grup 3, 6 ay ile 14.5 yaş arasında yaşayan bebekleri kapsıyor. Grup 2 ve 3' teki hastalar solunumsal komplikasyonlardan dolayı hayatını kaybederken grup 1'deki hastalar intestinal obstrüksiyon nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Ancak geniş bir alanda yapılan bu araştırmalar bu sınıflamalara rağmen benzer patolojik durumların (pankreas lezyonları, malnütrisyon her hastada olabileceğini gösterdi. Bu araştırma KF' i çeşitli klinik sendromların birleşmesi olarak görmek yerine çeşitli etkileri olan tek bir hastalık olarak görmeyi sağladı. Yapılan otopsilerde, enfeksiyonun daha çok solunum yollarında meydana geldiği ve solunum yolu luminallerinin yeşil-gri renkte, yapışkan bir iltihapla tıkalı olduğu görülmüştür [5]. Bu durum KF hastalarında karşılaşılan önemli sorunlardan biri olan solunum yolu enfeksiyonunu işaret etmektedir [6]. Bin dokuzyüz ellilerin başlarında ise hastalığın, epitel hücrelerindeki tuz transportunda meydana gelen anormallikten kaynaklandığı saptanmıştır. Di Sant'Agnese ve diğerleri 1953 yılında hasta çocukların terinde ileri derecede tuz kaybı olduğunu

göstermişlerdir [7]. Bin dokuzyüz seksenli yıllarda yapılan çalışmalarla, ter bezlerinde ve solunum yollarındaki klorür iyonu transportunda meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

2.3. GENETİK

Klinik olarak iyi tanımlanmış KF aileleri ile yapılan çalışmalar sonucunda ilk olarak 1989 yılında hastalıktan sorumlu olan gen tanımlanmıştır [8]. KF geni 250 kilobaz uzunluğunda olup 7. kromozomun uzun kolunda, q31.2 bölgesinde bulunmaktadır [9]. KF geninden 1.480 amino asitlik Kistik Fibrozis Transmembran Regulator (KFTR) olarak adlandırılan bir protein sentezlenmektedir [10]. KFTR proteini, havayolu epiteli, submukozal bezlerde, pankreas, karaciğer, ter bezleri ve üreme organları gibi birçok hücre tipinde bulunmaktadır. KFTR proteini; iki transmembran bölgesi, iki nükleotid bağlama bölgesi (NBD) ve bir düzenleyici R bölgesi olmak üzere beş bölge içermektedir. KFTR proteini epitel dokuda sıvı ve elektrolit transferi yapan ABC (ATP-Binding Cassette) transporter ailesinin üyelerinden birisidir [11]. Solunum yolu epitel hücre membranlarında klor kanalı olarak işlev yapmakta ve diğer iyonların transportunu düzenlemektedir. KFTR proteininin nükleotid bağlama bölgesine bağlanan ATP'nin hidrolizi ile R bölgesi fosforlanmakta böylelikle kanalın açılıp kapanması sağlanmaktadır. KFTR proteininin kanal aktivitesine göre hastalığın fenotipik ifadesinde farklılıklar görülmektedir (Tablo 1) [12,13].

Tablo 1. KFTR protein aktivitesinin fenotipik etkisi

KFTR Aktivitesi	Kistik Fibrozisin Fenotipik İfadesi
≤%1	Klasik KF hastalığı
≤%4.5	İlerleyici akciğer hastalığı
≤%5	Ter testi bulgularında değişiklik
≤%10	Erkek infertilitesi (Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu)
%10-49	Bilinen anomali yok
%50-100	Bilinen anomali yok (asemptomatik taşıyıcı)

2.4. MUTASYONLAR

KFTR geninde günümüze kadar 1604 mutasyon tanımlanmıştır (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). İlk kez tanımlanan ve Kuzey Avrupa ile Amerika'da en yüksek oranda görünen mutasyon tipi olan $\Delta F508$ 'dir. KFTR proteininin sentezlenip sentezlenmemesi veya sentezlenen proteinin klor kanalı aktivitesine göre KFTR geni üzerinde tanımlanan mutasyonlar 5 ana grupta toplanmıştır.

- I. Grup mutasyonlar:** Bu grupta yer alan KFTR mutasyonları durdurucu kodonlarının oluşmasına neden olduklarından kısa KFTR protein sentezine neden olurlar. Tam olmayan KFTR proteininin klor kanal aktivitesi ya çok azdır ya da hiç yoktur.
- II. Grup mutasyonlar:** Bu grupta yer alan mutasyonlar KFTR proteininin sentezlendikten sonra hücre içindeki trafiğinin bozulmasına neden olurlar. KFTR proteini membranın apikal yüzeyine ulaşamadığı için klor kanalları oluşmamaktadır.
- III. Grup mutasyonlar:** Bu grupta yer alan mutasyonlar KFTR proteininin hücre içindeki trafiğinin aksamasına neden olurlar. KFTR proteinleri hücrenin apikal yüzeyine ulaşabilmektedir.
- IV. Grup mutasyonlar:** KFTR proteini hücrenin apikal yüzeyine ulaşmakta fakat kanal aktivitesi tam değildir.
- V. Grup mutasyonlar:** Azalmış KFTR kanal aktivitesine neden olmaktadır.

Kistik fibrozlu hastalarda en sık görülen mutasyon olan $\Delta F508$ alleli, KFTR geninin 10.egzondaki 3-baz çiftlik delesyon sonucunda 508. pozisyonda bir fenilalaninin kaybıyla ortaya çıkar [9]. $\Delta F508$ mutasyonu kistik fibrozis hastalarının %50'sinde homozigottur ve bitişik iki kodonu etkilediği için kodonun okunma çerçevesi değişmektedir. Onuncu ekzondaki 3 baz çiftlik TTT delesyonu ile füzyon kodonu olan ATT oluşur. Delesyon ile ortadan kalkan fenilalanin yerine 508. pozisyonda izolösün kodlanmaktadır. Ülkemizde bu mutasyonun sıklığı ancak %25 kadardır ve mutasyonlarda görülen çeşitlilik artmaktadır. $\Delta F508$ mutasyonundan sonra en sık 1677delta mutasyonu görülmekte, bunu sırasıyla G542X ve 2183AA→G takip etmektedir[14]. Türkiye'de, bilinen 15 mutasyona ek olarak

3172delAC, P1013L ve M1028I gibi üç yeni mutasyon daha saptanmıştır [15]. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Tanı laboratuvarlarında 36 KFTR mutasyonunun taranması ile yapılan bir çalışma sonucunda toplumumuzda sık görülen mutasyonların oranları Tablo 2’de verilmiştir [16,17].

Tablo 2. Toplumumuzdaki KFTR mutasyon oranlar

Mutasyonlar	Sıklığı
delF508	25.22
1677delTA	5.22
N1303K	4.25
2789+5G-A	3.05
G85E	3.82
G542X	2.62
2183AA-G	2.07
R334W	1.4
W1282X	1.0
Diğerleri	≤1

2.5. PATOGENEZ

Tüm ekzokrin epitelleri etkileyebilen bir hastalık olan kistik fibrozis (KF), epitel hücresi membranındaki KF Transmembran Regülatör (KFTR) adlı klor kanalının defekti sonucunda ortaya çıkar[18]. KFTR’deki yapısal ve fonksiyonel bozukluk, akciğer, pankreas, karaciğer, barsaklar, ter bezleri ve epididim gibi organların epitelyum hücre plazma membranında klor (Cl) transportunun bozulmasına neden olur [19].

Sağlıklı kişilerde normal solunum yolu epitelyumunda klor dışarı salgılanır ve sodyum yavaş olarak absorbe edilir. Bu olay sırasında su, submukozadan salınarak solunum yolu epitelindeki mukus tabakanın hidrate olması sağlanır. KF’de ise defektif KFTR genine bağlı olarak klor salınamaz ve sodyum hızla absorbe edilir. Sodyum absorpsiyonu sırasında submukozaya su çekilir ve böylelikle solunum yolu salgıları dehidrate hale gelir. Aynı zamanda bu salgıların sulfat ve fukoz konsantrasyonları da artar. Böylelikle musin salgısı

anormal glikoproteinler içerir ve viskoelastik yapısı bozulduğundan mukosilier disfonksiyon gelişir. KF patogenezinde primer sorumlu olarak bu disfonksiyonel musin ileri sürülmektedir [20,21].

Özellikle enfeksiyon kontrolü, immünite ve inflamasyon ile ilişkili genler KF'in klinik gidişini etkileyebilir [22]. Hava yolu yanıtını düzenleyenler (beta 2 adrenoreseptör) ve fibrozis sitokini olan "transforming" büyüme faktörü beta-1 düzenleyici genler arasında yer alır [22]. Mannoza bağlayıcı lektin-2 enfeksiyonlara yatkınlığı artırır; tümör nekrozis faktör alfa hepatobiliyer komplikasyonlar ile ilişkilidir, antiproteazlar (alfa 1 anti-tripsin) ve detoksifikasyonda rol alan enzimler (glutatyon-S-transferaz) de KF'de klinik gidişi etkileyebilir.

Sonuç olarak, KF'te ekzokrin kanallar koyu mukus tarafından tıkanır. Bunun sonucunda, akciğerlerde kronik bakteriyel enfeksiyonlar ve inflamasyon sonucu gelişen hava yolu obstrüksiyonu ve malabsorpsiyona neden olan pankreas ve safra yolları tıkanıklığı görülür.

2.6. AKCİĞER HASTALIKLARININ PATOGENEZİ

KF'te ölüm oranı %90 akciğer enfeksiyonlarına bağlıdır ancak şu unutulmamalıdır ki KF'li hastaların akciğerleri doğum sırasında tamamen normaldir. Akciğer enfeksiyonlarının oluşum mekanizması aşağıda verilmiştir.

Mukus Bozuklukları: KF'teki akciğer hastalığını açıklamada öne sürülen hipotezlerden birisi düşük hacim hipotezidir [23]. Hava yolunu kaplayan sıvı sisteminin üst tabakasını oluşturan mukus, yüksek molekül ağırlıklı musinler tarafından oluşturulur [24]. KF'de mukus hipersekresyonu olduğu da gözlenmiştir ve epidermal büyüme faktör reseptörü bunda rol oynar [25]. Bu tabakanın viskoelastik özellikleri musinlere, musinlerin yapıştırıcı proteinler ile ilişkisine ve bu tabakanın hidrasyonuna bağlıdır. Hidrasyon ENaC ve KFTR tarafından belirlenen sodyum emilimi ve klor sekresyonu dengesine bağlıdır. Bu tabakanın altında bulunan perisilyer sıvı katmanı, polianyonik jel tabaka özellikleri gösterir. Hidrasyon durumu, iki katman arasındaki ilişkide ve etkin silyer aktivitede önemlidir. KF'deki dehidrate mukus nedeniyle mukus tabakasının viskozitesi artar, perisilyer tabaka çöker ve mukus tabakası epitel hücre yüzeyi ile doğrudan temas eder. İmmobilize olan mukus plaklarına musin hipersekresyonu ise, plağın daha da kalınlaşmasına neden olarak hava yolu

obstrüksiyonunu ağırlaştırır. Ek olarak koyu ve yapışkan mukus kalıcı biofilm oluşumuna neden olur ve konsantre mucusun ikincil savunma mekanizmalarının etkinliğini azaltır. KF'teki akciğer hastalığını açıklamada öne sürülen diğer bir hipotez de "tuz fazlalığı hipotezi"dir. Bu hipoteze göre, KFTR'daki bozukluk sonucunda, solunum yolu sıvısında sodyum ve klor miktarı artmıştır. Solunum yolları sıvısındaki beta defensin, lizozim, laktoferrin gibi antibakteriyel koruyucu proteinlerin fonksiyonları, bu sıvıdaki tuz miktarına bağlıdır. KF'te solunum yolu sıvısındaki tuz miktarı artmış olduğu için, bu proteinlerin fonksiyonlarında bozulma olur; bu da kronik bakteriyel enfeksiyona yol açar [26].

Persistan İnflamatuar Sürecin Etkisi: KF'te gösterilebilir enfeksiyon yokluğunda bile bronkoalveoler lavaj sıvısında inflamatuvar hücreler ve IL-8 artar, IL-10 ve lipoksinler gibi anti-inflamatuar ürünler azalır [27]. IL-6 ve IL-8 gibi inflamasyon sitokinlerinde artış ve bunun sonucunda enfeksiyondan bağımsız olarak ortaya çıkan inflamasyon KF akciğer hastalığının önemli komponentlerindedir [28,29]. Ayrıca, oksidan ve anti-oksidanlar arasındaki dengesizliğin neden olduğu oksidatif stres bu inflamasyona katkıda bulunur [28,29]. KF'deki artmış nötrofil aktivitesi ve birikiminden IL-17'nin sorumlu olduğu öne sürülmektedir [30]. KF'li kişilerin hava yolu makrofajlarında artmış olan TNF alfa, kaşeksi ve kilo kaybı nedenidir ve düzeyleri FEV1 ile ters ilişkilidir.

Nötrofil kemotaksisi ve adheransını engelleyen lipoksinlerde KF'li hastaların havayolunda azalmıştır [31].

Artmış Nötrofil Aktivitesi ve Proteazların Etkisi: KF'de ortaya çıkan inflamatuvar yanıt, hem süre hem de ağırlık olarak patojenin yok edilmesi için gerekenden çok fazladır.

Bunun nedenlerinden biri, hava yolunda fazla miktarlarda bulunan IL-8 ve lökotrien B4'ün fazla sayıda nötrofilin bölgeye göçüne neden olmasıdır [32].

KF'de nötrofiller fagositozu gerçekleştiremez ve sekonder nekroza uğrayarak, serin proteazlar gibi hücre içindeki medyatörler ortama salınır [32]. Proteazlar, fizyolojik koşullarda intraselüler ve ekstraselüler bakteriyel öldürmede önemli olmasına karşın, kronik hastalık durumunda proteaz-antiproteazlar arasındaki dengesizlik nedeni ile akciğer hasarı ve amfizem ortaya çıkar [32].

KF ilişkili kronik akciğer hastalığındaki uzamış endobronşial proteaz aktivitesi akciğere özgü immün yanıtın birçok basamağına zarar verir [32]. Artmış lökosit elastaz aktivitesi doğumsal ve adaptif immunitenin birçok elemanını olumsuz etkileyerek, hava yolunda pulmoner defansı azaltır. Bu nedenle KF’i sadece epitelyal değil aynı zamanda bir nötrofil hastalığı olarak da değerlendirmek gerekir [33].

Pseudomonas Enfeksiyonunun Etkisi: *P. aeruginosa*’nın virulans etmenleri arasında olan piyosiyenin siliyer hareketleri ve mukosiliyer transportu olumsuz etkiler. Ayrıca, oksidatif stresi arttırıp KFTR aracılı klor transferini bozarak KF’li kişilerde akciğer hastalığı bulgularının artışına neden olabilir [34].

2.7. KLİNİK BULGULAR

Ergen ve erişkin dönemdeki hastaların sistemlere göre bulgularını gözden geçirecek olursak [35,36,37].

Üst solunum yolu bulguları: Üst solunum yolu bulguları anormal, yapışkan sekresyonlara ve müköz membranlardaki hipertrofi ve ödeme bağlıdır. Tekrarlayan nazal polipler, tedaviye yanıt vermeyen ve tekrarlayan tüm yüz sinüslerini tutan sinüzit hali sık görülür. Erişkin hastalarda yapılan bazı çalışmalarda Kulak Burun Boğaz kliniklerinde tekrarlayan düzelmeyen sinüzit ve nazal polip tanılarıyla izlenen ve diğer bulguları ön planda olmayan hastalarda KF araştırılmış ve tanımlanmıştır.

Frontal ve sfenoid sinüslerin aplazik veya hipoplazik olması KF’te sık rastlanan bulgudur [38]. Mukosel varlığında çocuklarda nadir bir bulgudur ve KF düşündürmelidir.

KF’te sıklıkla pansinüzit görülür [38,39]. Kronik rinosinüzitte sıklıkla burun akıntısı, burun tıkanıklığı, koku alma duyusunda azalma ve sinüslerde dolgunluk vardır.

Alt Solunum Yolu Bulguları: Kronik veya tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, bronşit, atelektaziler, bronşektazi, kronik öksürük görülebilir. Erken çocukluk döneminde önceleri yapışkan balgam çıkartmak için kuru nitelikte olan öksürük; ileri yaşlarda giderek enfeksiyon etkenleri ile renkli, kötü kokulu, pürülan balgamli hale gelir. Kronik süperatif akciğer hastalığı ve hipoksi ile parmaklarda çomaklaşma sık görülür. Akciğer grafisinde erken dönemde aşırı havalanma ve bronş duvarında kalınlaşma görülürken; erişkin yaş grubunda genellikle yaygın bronşektazi vardır. Üst loblarda ve özellikle sağ üst lobda olan

bronşektaziler KF hastalığı için tipiktir. Akciğer grafilerindeki bu görünüm nedeniyle erişkin KF'li hastalara ülkemizde defalarca tüberküloz tedavisi uygulandığı gözlenmiştir. Akciğer hasarının artması ile solunum yetmezliği bulguları görülebilir. KF'li hastalarda solunum fonksiyon testlerinin (SFT) izlenmesi hastalığın ağırlığını belirlemede ve prognozu öngörmeye oldukça değerlidir. FEV1 değeri, prognoz ve mortalite ile doğrudan ilgili bir parametredir. FEV1'de %10'dan fazla düşme olması akut pulmoner alevlenme açısından anlamlıyken, FEV1'in beklenenin %30'undan daha az bulunması hastanın son dönem akciğer hastalığında olduğunun ve akciğer transplantasyonuna ihtiyacı olduğunun bir göstergesidir

KF'de akciğer tutulumunun önemli bir özelliği de özel patojenlerle kolonizasyon/enfeksiyon oluşumudur. Bu mikroorganizmalar akciğerlerde kolonize olup, kronik dönemde hasar yaratabilir ya da zaman zaman akut pulmoner alevlenme bulgularına (öksürükte, balgam miktarında artış, ateş yüksekliği, dispne artış...vb) neden olabilirler.

Bronşektatik alanda yerleşen *Aspergillus fumigatus*'a bağlı allerjik bronko-pulmoner aspergillosis (ABPA) ve buna bağlı akciğer bulgularının kötüleşmesi ergen ve erişkin dönemdeki KF'li hastalarda görülebilir. Spontan pnömotoraks sıktır ve erişkin KF'li hastalarda sıklığı %19 oranında bildirilmiştir. KF'li hastaların solunum fonksiyon testlerinde önce küçük hava yollarının obstrüksiyonu ile giden obstrüktif bulgular ön planda iken, akciğer hasarının ilerlemesi ile restriktif ve obstrüktif bulgular oluşmaya başlar.

Gastrointestinal sistem bulguları: KF'li hastaların %85'inde pankreas yetmezliği sonucu malabsorbsiyon görülür. Malabsorbsiyon sonucunda steatore ve yağda eriyen vitaminlerin eksiklikleri görülebilir. Protein malabsorbsiyonu sonucu hipoproteinemik ödem görülebilir. Çok miktarda, sık, yağlı, kötü kokulu gaita yaparlar. Karınları gaz nedeniyle şişkindir ve kötü kokulu gaz çıkarırlar. Rektal prolapsus ve barsaklarda bazen koyulaşmış gaitanın yaptığı "distal intestinal obstrüksiyon sendromu" görülebilir. Gastroözofageal reflü KF'li hastalarda sıktır. Pankreas fonksiyonları tam kaybedilmemiş hastalarda pankreasın kendi enzimleriyle inflamasyonu sonucu pankreatit görülebilir. Malabsorbsiyona bağlı değişik bulgular ortaya çıkabilir. Bu yaşlarda karaciğerde bulguların ilerlemesiyle fokal biliyer siroz ortaya çıkabilir.

Multilobüler siroz ve karaciğer yetmezliği görülebilir. Terden fazla miktarda tuz kaybı olması nedeniyle oral tuz alımının yeterli olmadığı durumlarda dehidratasyon, hipokloremik, hiponatremik metabolik alkaloz (Psödo- BartterSendromu) gelişebilir.

Endokrin sistem: Ergen yaşta pankreas hasarı sonucu adacık hücreleri zarar görür ve diabetes mellitus ortaya çıkabilir. Kronik infeksiyon ve malabsorbsiyon sonucu gecikmişpuberte siktir. Malabsorbsiyon, kronik infeksiyon, hareketsizlik ve kullanılan ilaçlara bağlı osteoporoz da sık görülür.

Ürogenital sistem: KF'li erkeklerin %98-99'u infertildir. Obstrüktif azospermi vardır. Azosperminin nedeni, iki taraflı gelişmemiş vas deferens'e sahip olmalarındandır. Bazendiğer bulguları önplanda olmayan ve sadece infertilite ile Üroloji kliniklerine başvuran ve değerlendirilen hastalarda yapılan testis biyopsileriyle vas deferens agenezisi gösterildikten sonra araştırılarak KF tanısı konulmuştur. KF'li kadınlarda da fertilitte koyu kıvamdaki servikal mukus ve kronik hastalık nedeni ile azalmıştır.

2.8. MİKROBİYOLOJİ

Solunum yolu enfeksiyonları KF olgularında morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir. KF'de görülen solunum yolu enfeksiyonları sıklıkla polimikrobiyal özellikte olup, tedavi ile eradikasyon her zaman mümkün olmamaktadır. KF'de solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan ve esas önemli olan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleks olup, ikinci derecede öneme sahip olanlar ise solunum sinsityal virus, influenza virus ve *Aspergillus fumigatus* olarak sıralanabilir. Non-tüberküloz mikobakteriler (NTM), *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter xylosoxidans* bu olgularda son yıllarda gittikçe artan sıklıkta izole edilmekle birlikte, bu mikroorganizmaların patojenik rolleri henüz kesinlik kazanmamıştır [23,40,41,42,43]. Birinci nokta KF'de farklı türde bakteri veya bakteri, virus ve mantarların sıklıkla koenfeksiyon yapması; ikinci nokta ise koenfeksiyon yapan bu türlerin birbirlerine karşı sinerjistik ve/veya antagonistik özellikte olmasıdır. Dikkati çeken son nokta ise bu patojenlerin KF akciğerlerinde ortaya çıkan seçici baskı ortamında evrimleşmeleri ve bu nedenle bazı farklılık ve avantajlar kazanmalarındır [44]. Koenfeksiyon aynı tür bakterinin tamamen farklı fenotip ve genotipteki suşları ile de gerçekleşebilmektedir. Kronik enfeksiyon ortamında gerçekleşen evrimleşme sırasında bakteri doğal olarak genetik değişikliklere uğrayabilmektedir.

Bu genetik değişiklikler bakterinin antibiyotiklere ve konağın savunma mekanizmalarına direnç göstermesini sağlayarak bakterinin yaşam şansını arttırmakta ve enfeksiyonun kalıcılığına neden olmaktadır. KF mikrobiyolojisinde uzun süredir kabul gören

bir gerçek hastalığın erken dönemlerinde gelişen. *Staphylococcus aureus* kolonizasyonu enfeksiyonunun solunum yollarını *P. aeruginosa*'ya duyarlı hale getirmesidir

2.9. TANI

Kistik fibrozis hastalığının tanısında, hastanın yukarıda sözü edilen hastalığın tipik klinik bulgularının bir veya birkaçını taşıması esastır. Hastanın aile öyküsünde, KF tanısı almış veya benzer bulguları taşıyan başka aile bireylerinin, özellikle kardeşlerin olması tanıda önemlidir.

Tanı Koydurucu Testler

Ter Testi

Ter testi ilk kez 1959'ta tanımlanmıştır ve bugün de tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir. Altı aylıktan küçük çocuklarda ≤ 29 mmol/L ter klor değerleri normal olarak kabul edilir. 6 aylıktan büyük çocuklarda terdeki klor konsantrasyonunun 60 mmol/L üzerinde olması KF için tanı koydurucudur ve bu değer 40 mmol/L altında olması durumunda KF hastalığı düşük olasılıklıdır. 40 ve 60 mmol/L arasındaki değerler atipik KF hastalarında görülebilir. KF dışı bazı hastalıklarda da terde klor değeri yüksek olabilir ve ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Kan elektrolitlerinin düşük olduğu durumlarda, ciltte ödem olduğunda terde klor ölçümleri yanlış olarak düşük bulunabilir [45,46].

Mutasyon Analizi

Günümüzde KF hastalığında 1600'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Ülkeler kendi toplumlarında en sık görülen mutasyonlardan geliştirdikleri tarama panellerini kullanmaktadırlar. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika ülkeleri için, 20-25 mutasyonu içeren bu paneller ile KF allellerinden %80-85'ni tanımlamak mümkündür. Ülkemizde ise durum daha farklıdır. Toplumumuzda yapılan çalışmalarda en sık görülen mutasyon $\Delta F508$ mutasyonu olmakla birlikte, bunun sıklığı %18-20'dir. Aynı derecede veya daha çok görülen bir başka mutasyon saptanamamıştır. Bu nedenle ülkemizde kullanılan tarama panelleriyle, vakaların yarısından çoğunda mutasyon gösterilememektedir [17].

Nazal potansiyel farkı ölçümü

KF'de epitelden iyon transportu bozuk olduğu için, hücrelerde transepiteliyal elektriksel potansiyel farkında normale göre değişiklik söz konusudur. Bu, KF hastalığında bir tanı testi olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. Burna yerleştirilen elektrotlarla bu ölçümün yapılması mümkündür.

KF'li hastalarda;

- 1- Bazal değer olarak nazal potansiyel farkı daha fazladır;
- 2- Burun içi hücreye sodyum girişini engelleyen bir sıvıyla yıkandıktan sonra (amilorid) KF'li hastalarda daha fazla inhibe olur;
- 3- Klor kanalı çalışmadığı için klor salgılanmasını normalde değiştirecek bir solüsyon olan isoprotorenolün, klor içermeyen bir solüsyon içinde burna verilmesinden sonra, potansiyel farkı etkilenmez [47] .

KF tanısındaki genel öneriler aşağıda sıralanmıştır [48]

1. Eğer ter testi ≥ 60 mmol/L ise KF tanısı konur. Mutasyon analizinde iki tane KF'e neden olan mutasyon saptanmazsa ter testi tekrar edilir. İki ter testi pozitif olan veya bir testi pozitif olup mutasyon analizinde iki tane KF'e neden mutasyon saptanan hastalar herhangi bir yaşta başvurabilirler ve bu hastalarda KF akciğer hastalığı görülme olasılığı yüksektir.
2. 6 aylıktan büyük çocukta ter testi ≤ 39 mmol/L ise bu hastada KF hastalığı olma olasılığı düşüktür. Ancak 2 tane KF'e neden olan mutasyon saptanırsa bu hastalara KF tanısı konur ve hastalar KF merkezinde izlenmelidirler.
3. Ter testinde ara değer (6 aylıktan küçük bebeklerde 30-59 mmol/L, 6 aylıktan büyük çocuklarda 40-59 mmol/L) saptanan hastalarda ayrıntılı KFTR analizi önerilir:
 - a) İki KF'e neden olan mutasyon saptanırsa KF tanısı konur.
 - b) KF'e neden olabilecek mutasyon saptanmaz veya tek bir mutasyon saptanır ise ve KFTR ile ilişkili hastalık düşündürülen klinik bulgu varsa KFTR ile ilişkili hastalık tanısı konabilir. Bebeklerde 2-6 aylıkken, daha büyük hastalarda hemen ter testi tekrar edilmelidir ve yine ara değer saptanırsa hasta KF merkezinde değerlendirilmelir. KF merkezinde klinik durum

değerlendirilmesi, ileri genetik analiz, ekzokrin pankreas fonksiyon testi ve Pseudomonas açısından kültürlerin alınması önerilir. Ek olarak pankreatik görüntüleme, yüksek çözünürlüklü akciğer tomografisi, bronkoalveolar lavaj kültürü, solunum fonksiyon testi (süt çocuklarında rutin olarak önerilmez), nazal potansiyel farkı ölçümü, primer siliyer diskinezi ve bağışıklık yetmezliği tanılarının dışlanması ve erkeklerde genital değerlendirme (genital muayene, rektal ultrason, semen analizi) önerilebilir.

2.10. TEDAVİ

Solunum Sistemine Yönelik Tedaviler

Hava yollarından sekresyonların temizlenmesine yönelik tedaviler

Fizik tedavi ve egzersiz programları: KF'li hastaların solunum yollarındaki koyu, yapışkan sekresyonları temizlemek için düzenli olarak uygulanması çok önemlidir [49].

N-asetil sistein: Uzun süreden beri kullanılan bu ilaç, balgamdaki sülfid bağlarını kopararak etkisini gösterir. Ayrıca glukuronat sistemi üzerinden bir prekürsör rolü oynayarak antioksidan etki gösterir. Oral, inhale veya bronkoalveoler lavaj sıvılarına katılarak lokal olarak da kullanılabilir. İnhalasyon yoluyla ya da doğrudan verilmesi sırasında görülen bronkokonstrüksiyon en önemli yan etkisidir. Bu nedenle uygulama öncesi bronkodilatör verilmesi uygun olur [50].

Rekombinant insan DNase (Dornase a): KF'li hastaların özellikle infeksiyon dönemlerinde akciğerlere nötrofil göçü sonucunda parçalanmış nötrofillerden ortaya çıkan çok miktardaki DNA büyük molekül ağırlığı nedeniyle balgamın koyuluğunu daha da artırır. İnhalasyon yolu ile günde bir veya iki kez uygulanan dornase a'nın balgamın akışkanlığını artırdığı, solunum fonksiyonlarında düzelme sağladığı ve hastaneye yatış sayısını azalttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [51].

Hipertonik sodyum klorür: %6-7 konsantrasyonlarda inhalasyon yoluyla uygulanan hipertonik sodyum klorürün KF'li hastalarda balgamın akışkanlığını artırdığı gösterilmiştir [52].

Bronkodilatörler: KF'li hastalarda solunum yollarında hiperreaktivite sık görülen bir bulgudur. Solunum fonksiyon testleriyle hiperreaktivite saptanan hastalarda ve infeksiyon dönemlerinde balgamin atılmasına yardımcı özellikleri nedeniyle kullanılmaktadırlar [53].

Antiinflamatuvar ve oluşan immün yanıtıa yönelik tedaviler

Oral steroidler: Alerjik bronkopulmoner aspergillozis ve astımı olan KF'li hastalarda kullanılmaktadır. Oral steroidlerin kullanımının KF'li hastaların solunum fonksiyon testlerini iyileştirdiği, hastane yatışı gerektiren atak sayısını azalttığı, ancak eşzamanlı olarak büyüme geriliği, glukoz intoleransı, osteoporoz, katarakt gibiyan etkilere yol aıtığı gösterilmiştir [54]

İbuprofen: Bir non-steroidal antiinflamatuvar olan ibuprofenin kullanılmasının akciğer hasarının ilerlemesi üzerinde önleyici etki yaptığı gösterilmiştir [55].

Pentoxiphyllin: Antisitokin etkisi olan bu maddeyle ilgili çalışmalar halen araştırma aşamasındadır [56].

Antiproteazlar: KF'li hastalarda balgamda ve bronş yıkama sıvılarında nötrofil elastazın yüksek bulunmasından sonra proteaz-antiproteaz dengesinin sağlanması için α -1-antitripsin ve sekretuar antiproteaz inhibitörlerinin inhalasyonu tedavisi ile denendiği hastalarda başarılı sonuçlar alınmıştır [57].

Gastrointestinal Bulguların Tedavisi: KF'de gastrointestinal bulguların tedavisinde temel nokta pankreatik enzimlerin öğünlerden hemen önce ya da birlikte alınmasını sağlamaktır. Pankreatik enzimleri içeren proteaz, amilaz ve lipazdan oluşan kapsüller (Kreon) bu biçimde alındığında malabsorbsiyon bulguları ortadan kalkar, gaita görüntüsü ve sayısı normale döner, hasta hızla kilo almaya başlar. Hastalara yüksek kalorili diyet önerilmeli ve özellikle yağda eriyen vitaminler düzenli olarak verilmelidir. Antihiperglisemik ilaçlar diyabet komplikasyonu ortaya çıkmışsa önerilebilir. Kistik fibrozis ile birlikte olan hepatobilyer hastalıklar için son yıllarda safra asit tedavisi önem kazanmıştır. Kolestaz sırasında endojen, hidrofobik hepatotoksik safra asitlerinin karaciğer hücre zedelenmesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir, tedavide ursodeoksikolik asit (UDKA) kullanılmaktadır.

2.11.KF'TE YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Gen Terapisi

Gen tedavisi teorik olarak KF için en ideal tedavi gibi görünmektedir. Normal KFTR proteinini taşıyan genin virüsler ya da lipozomlar ile etkilenmiş dokulara iletilmesi ile yapılmaktadır. Adenovirüs ile yapılan çalışmalarda adenovirusa bağlı enfeksiyon önemli sorun yaratmıştır. Lipozomlar kullanıldığında ise beklenen etki sağlanamamıştır; çalışmalar sürmektedir.

Defektif Protein Yapı ve Fonksiyonunun Düzeltilmesi

Membran Sodyum / Klor Transportunun Restorasyonu

RNA-interferansı (Gene Silencing = Genin Susturulma Yöntemi)

2.12. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonadaceae ailesindeki *Pseudomonas* cinsinde, suda ve toprakta yaşayan, gram negatif, non-fermentatif, aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türler yer almaktadır. Çoğu türler bitki ve hayvan için patojendir. *Pseudomonas* cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni, *P. aeruginosa*'dır. *P.aeruginosa*, özellikle immün sistemi baskılanmış bireyler için önemli bir fırsatçı patojendir.

2.12.1. TARİHÇE

Modern medikal mikrobiyoloji bulunmadan önce *P. aeruginosa*'nın yara ve cerrahi alan enfeksiyonlarında etken olduğuna dair kanıtlar mevcut [58]. 1850 yılında Sedillot tarafından bazen cerrahi pansumanlarda enfeksiyon ile ilişkili olarak mavi yeşil renk değişikliği olduğu bildirilmiş. 1862 yılında Luke mavi yeşil renkli akıntı içinde basiller olduğunu göstermiştir. 1882 yılında Gessard mikroorganizmaları izole etmiştir ve *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırmıştır.1960 yılında *P. aeruginosa* immunosuprese, yanıklı hastalarda ve medikal tedavi ile daha uzun süre hayatta kalabilecek olan KF'li hastalarda enfeksiyona yol açma kabiliyeti çok yüksek olduğu için önemli bir insan patojeni olarak bildirilmiştir. O zamandan beri *P. aeruginosa* özellikle kan, akciğer ve üriner sistem kaynaklı nazokomiyal bakteriyel enfeksiyonların en ciddi nedenlerinden biri haline gelmiştir. Ayrıca çoğu antibiyotiğe dirençli hale gelebilecek önemli bir potansiyeli olduğu için artık klinik

izolatlardan daha dirençli suşlar izole edilmekte ve hekimlerin elinde efektif tedaviyi sağlayacak çok fazla seçenek kalmamaktadır.

2.12.2. EPİDEMİYOLOJİ

Pseudomonas farklı çevresel yerleşim gösteren fırsatçı bir patojendir. Erişkinlerde *P. aeruginosa* öncelikli olarak nazokomiyal patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastane dışında *P. aeruginosa* genellikle toprak, su ve bitkilerde bulunur ve bu durum sağlıklı bireylerin ve hayvanların bu mikroorganizma ile kolonize olması ile ilişkili olabilir. Çok az besine gereksinim duyar ve geniş ısı aralıklarını tolere eder. Mikroorganizma 45-50 °C 'ye kadar olan sıcaklıklara dayanıklıdır. Birçok antibiyotiğe ve dezenfektana dirençlidir. Ayrıca çözülmüş karbondioksit, fosfor, demiri kullanarak distile suda üreyebilir. Hastane içinde *P. aeruginosa* hastaların koltukaltı, kulak, perine gibi nemli bölgelerinden izole edilebilir ayrıca lavabo, kanalizasyon, duş gibi diğer nemli cansız ortamlardan da izole edilebilir. Hastalardan *Pseudomonas* izolasyonu enfeksiyona yol açmadığı sürece tedavi gerektirmez

2.13. PSEUDOMONAS AERUGINOSA ÖZELLİKLERİ

Pseudomonas türleri aerop, sporsuz, düz veya hafif kıvrılmış 0.5-1 mikrometre'ye 1.5-5 mikrometre boyutlarında gram negatif çomaklardır [59]. Tek veya çoklu polar flagelları ile genellikle hareketlidirler. Son oksijen alıcısının oksijen olduğu zorunlu aerop solunuma dayalı metabolizmaları olmakla birlikte, bazı durumlarda nitratın son elektron alıcısı olarak kullanılmasına bağlı olarak anaerop olarak da üreyebilirler. Klinik öneme sahip çoğu tür oksidaz pozitifdir (*Pseudomonas luteola* ve *Pseudomonas oryzihabitans* dışında).

Pseudomonas türleri ayrıca katalaz pozitiflerdir. KF hastalarından, kronik obstrüktif pulmoner hastalığı olan hastalardan izole edilen suşlar sıklıkla mukoid koloni (M koloni) şeklindedir. Çevreden veya diğer enfeksiyonlardan izole edilenler ise genellikle beta-hemoliz yapan S tipinde veya düşük miktarda aljinat üretmeleri nedeniyle R tipinde kolonilerdir. Tipik koloniler metalik bir görünüm vererek tüm plağa düz bir biçimde yayılır ve özellikle üremenin yoğun olduğu bölümlerde jelatinöz bir görünüme sahip olabilir.

En karakteristik morfolojik özelliği besiyerinde pigment oluşturmalarıdır; özellikle mavi renkli fenazin pigmenti piyosyanin olarak adlandırılır. Bazı suşlar kırmızı veya siyah pigment oluşturabilir bu sırasıyla piyorubin ve piyomelanin sentezine bağlıdır. *Pseudomonas* piyoverdin ile sarı- yeşil veya sarı- kahverengi renk oluşturur ancak piyosyanin ile birlikte

sentezlenirse mavi- yeşil renk oluşur. *Aeruginosa* ismi klinik izolatlardan elde edilen kolonilerin oluşturduğu mavi- yeşil renkten kaynaklanmaktadır.

İzolasyon için besiyerlerinde 24-48 saat inkübe edilirler [60]. Kùltürlerde triptofan 2-aminoasetofenon üretiminden kaynaklanan ve petri kutusu açıldığında hissedilen karakteristik üzüm kokusu *P.aeruginosa'* yı ayırt etmede kullanılır [61]. *P. aeruginosa* en basitinden en kompleksine kadar hemen hemen her besiyeride üreyebilir. Karbonhidratları fermente etmez ancak glukoz, fruktoz ve ksilozdan asit oluşturabilirken laktoz ve sukrozdan oluşturamaz. TSI besiyerinde hiçbir değişikliğe neden olmaz yani alkali reaksiyon verir Simmon's sitrat ve L arginin dehidrolaz pozitifdir. L- lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz negatifdir ayrıca hidrojen sülfür üretmez. Hemen hemen tüm suşlar ekstrasellüler polisakkarit olarak bilinen alginat üretmek için genlere sahiptir. Yapılan çalışmalarda alginat üretiminin KF'li hastalardan elde edilen mukoid kolonilerle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

P. aeruginosa son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç infeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. İnfeksiyonların ilk basamağı kolonizasyondur, konak savunmasının bozulduğu ve immunsupresyon durumlarında kolonizasyon genellikle enfeksiyona ilerler. Bakterinin virülans faktörlerini hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak inceleyebiliriz.

Kirpik: *P. aeruginosa'nın* yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar. Kirpik Toll-benzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile etkileşerek inflamatuvar yanıtı uyarır ve kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile IL-8 sentezinin başlatılmasına yol açar. Kirpiğin güçlü immunojen olması sebebiyle, kronik *P. aeruginosa* infeksiyonlarında konak bağışık yanıtından kaçmak için kirpiksiz mutantlar seçilmektedir [62].

Pili (Fimbriae): Bakterinin kısa, filamentöz yüzey yapılarıdır. Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa'da* pili seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur [63,64].

Lipopolisakkarit (LPS): Bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan LPS; fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. *P. aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında O-özgül polisakkarid zincirleri tanınan özelliktedir. LPS'nin lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder ve asialoGM1'e bağlanarak adezyonda etkin rol oynar. TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanıma özellikleri ile ve KFTTR'ye bağlanarak virülansta önemli etki gösterir. KF hastalarında *P. aeruginosa*'nın farklı lipid A mutantları bulunur ve bunlardan bazıları konağın antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gösterir ve TLR4 aktivasyonunun artmasına neden olurlar [65].

Aljinat: Aljinat mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. Her ne kadar aljinat hücre dışına salınan bir ekzopolisakkarit olsa da, hücre ile ilişkili kalması sebebiyle bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında incelenmiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarında aljinat üretimi çok önemli rol oynar. Aljinat üretimi olmayan kökenlerin sıçan akciğerine verildiğinde hızla aljinat üreten kökenlere dönüşmesi bunun göstergesidir [65]. Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epitelyumu üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır. Kistik fibroz hastalarının solunum yollarında gözlenen kökenler genellikle aljinat aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipe kökenlerdir. Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdir. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşüm (genetik dönüşüm, faz değişimi) algS ve algT genleri yardımıyla gerçekleşir [65]. Her ne kadar kistik fibroz hastalarındaki biyofilm yapısında yer aldığı kabul edilse de yakın tarihli çalışmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için şart olmadığı gösterilmiştir [66].

2.13.1. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

Elastaz: Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA bir serin metalloproteinazdır ve *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan pentaglisinpeptidoglikan köprülerini yıkar. LasA proteaz, elastini yıkamaz ancak LasB elastazın elastolitik aktivitesini artırır. LasB 33 kDa ağırlığında bir çinko

metalloproteinazdır, LasA proteazın yıpratdığı elastini parçalar. LasB elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır. Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar [65]. Damar duvar yapısında da bol miktarda elastin bulunduğu için, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur. IgG'yi, fibrini, kollajeni, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalar. Ayrıca solunum yolu epitellerindeki sıkı-bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar [65]. Elastaz IL-8 üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki gösterir.

Alkali Proteaz: *P. aeruginosa*'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. 49-kDa ağırlığındaki enzim apr geni tarafından kodlanır, enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir [67]. Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kornea enfeksiyonlarının patogeneizinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir [68].

Piyosiyanın: *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir. Öncü molekül olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenirken phzABCDEFG operonu ve phzH, phzM, phzS genleri görev alır [69]. *P. aeruginosa* enfeksiyonları birçok virülans faktörünü içeren çok etkenli süreçler olduğu için akciğer enfeksiyonlarında tek başına piyosiyanın etkilerinin saptanabilmesi için saflaştırılmış piyosiyanın ile *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, piyosiyanın hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır. Piyosiyanın ayrıca α 1-proteaz inhibitöründe etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur.

Piyosiyanın ve ara metaboliti fenazin-1-karboksilik asit RANTES ve IL-8 seviyelerini değiştirerek konak bağışıklık yanıtını etkiler [70]. Hem doğrudan etkiyle katalaz aktivitesini engeller, hem de katalazı kodlayan genin transkripsiyonunu azaltır [71]. MnSOD eklenmesiyle katalaz aktivitesinin geri kazanımı piyosiyanın neden olduğu hasarda O₂-radikallerinin rolünün büyük olduğunu gösterir. Piyosiyanın oksitlenmiş glutatyon seviyesini artırır, nötrofillerde apoptozisi uyarır [72].

Piyoverdin: Bir siderofordur. Çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynar [73,74] .

Proteaz IV: Yakın zamana kadar özellikle *P. Aeruginosa* keratiti patogenezindeki rolüyle bilinirken, son çalışmalarla proteaz IV'ün sürfaktan proteinleri A, D ve B'yi yıktığı ve akciğer infeksiyonları patogenezinde de rol oynadığı gösterilmiştir [75,76].

Fosfolipaz C: Hemolitik aktiviteleriyle ayrılan iki tipte fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. Fosfolipaz C hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salınır. Ökaryotik hücre membranı bileşeni olan fosfolipidleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogenezinde rol oynar [77]. Elastazda olduğu gibi patojenik etkisinin bir kısmını sürfaktan inaktivasyonuna borçludur. Ek olarak konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılar.

Rannolipid: Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder [65].

Ekzotoksin A (ExoA): İnfeksiyon etkeni çoğu *P. aeruginosa* kökeni ekzotoksin A sentezler. Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan bir toksindir. ExoA *P. aeruginosa*'nın virülansında önemli rol oynar. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir [78] . İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur [79]. Konak yanıtını baskılayıcı özelliği de gösterilmiştir [80]. ExoA üretimi olmayan mutant ile sokak tipi *P. aeruginosa* kökeninin karşılaştırıldığı bir çalışmada toksin üretmeyen kökenin 20 kat daha az virülan olduğu hayvan deneyi ile gösterilmiştir.

Tip 3 Salgı Sistemi: *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Pseudomonas* türlerinde saptanmıştır. Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur [63]. Ekzoenzim S (ExoS): İki aktif bölgesi [C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP)

bölgesi] bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'nin patojenik etkilerinden esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozan ADPriboziltransferaz aktivitesi sorumludur. Ek olarak C-terminal bölgesinin TLR2'ye, N-terminal bölgesinin de TLR4'e bağlandığı ve böylece konak bağışık yanıtını etkilediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. Akciğer infeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açan ve bakterinin yayılmasında rol oynayan bir toksindir [81]. Ekzoenzim T (ExoT): ExoT de ExoS gibi ikili etki gösterir. *Pseudomonas*'ın internalizasyonunu rol alan bir enzimdir. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiş olan bu enzim minör virülans faktörleri arasında yer alır [82]. Ekzoenzim Y (ExoY): ExoY bir adenilat siklazdır, konak sitozolüne verilince sitozolik cAMP'yi artırır. Bu artış pulmoner vasküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumunun artmasına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına neden olur [83]. Ekzoenzim U (ExoU): ExoU tip 3 salgı sistemi ile konak hücresi içine salındığında fosfolipaz/lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar. ExoU majör virülans faktörü olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde tek başına ExoU salgılanmasının sepsise ilerleyen akciğer hasarına yol açtığı gösterilmiştir [84].

2.13.2. Quorum Sensing ve *P.Aeruginosa* Patogenezindeki Önemi

P. aeruginosa'da birçok hücre dışı virülans faktörünün üretimi bakteri hücre yoğunluğunu izleyen ve bakteriler arasında iletişime olanak sağlayan bir mekanizma ile kontrol edilir. Bakteriler çevre koşullarını algılayabilir ve bu bilgiyi işleyerek uygun şekilde cevap verebilir. Hücreler arası iletişim, ya da QS olarak adlandırılan bu mekanizma birçok gram negatif ve gram pozitif bakteride tanımlanmıştır [85,86]. Gram pozitif bakterilerde QS sistemlerinin sinyal molekülleri peptid feromonlar iken, gram negatif bakterilerde oto-uyaran adı verilen küçük moleküllerdir. Otouyaranlar LuxI-tipinde oto-uyaran sentaz ve LuxR-tipinde transkripsiyonel aktive edici protein (R-protein) tarafından sentezlenir [87]. Gram negatif bakterilerde tanımlanmış çeşitli oto-uyaranlar açıl homoserin lakton (AHL) yapıdadır ve birbirlerinden açıl yan zincir uzunlukları ve içerikleriyle ayrılırlar. Düşük hücre yoğunluğunda oto-uyaran bazal seviyelerde sentezlenir ve bakteriyi çevreleyen ortama yayılır ve yayıldıkça yoğunluğu azalır. Hücre yoğunluğu arttıkça, hücre içi oto-uyaran yoğunluğu da belirli bir eşik değere dek artar, kritik konsantrasyona ulaşıldığında, oto-uyaran kendi özgül R-proteinine bağlanır. R-protein oto-uyaranı olmadığı sürece etkin değildir, R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül DNA dizilerine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır

(*P. aeruginosa*'da tanımlanmış iki ana QS sistemi vardır; birbirleriyle hiyerarşik ilişkileri olan bu sistemler las ve rhl sistemleridir.

las QS Sistemi: *P. aeruginosa*'da tanımlanan ilk QS sistemi ile LasB elastaz ifadesini düzenleyen sistem aydınlatıldığı için las QS sistemi olarak adlandırılmıştır. Sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentaz geni olan lasI, sentaz geninin ürünü N-(3-oksododekanoyl)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan lasR genidir [88]. Las sistemi lasB ifadesini düzenler ve diğer hücre dışı virülans faktörlerinden LasA elastaz ve ekzotoksin A sentezi için gereklidir. Las sistemi sinyal molekülü olan 3-okso-C12-HSL'nin immunomodülatör olduğu ve konak yanıtını baskıladığı da gösterilmiştir [89].

rhl QS Sistemi: Ramnolipid sentezini kontrol ettiği için rhl adını alan bu ikinci QS sisteminde oto-uyaran sentaz geni rhlI, sinyal molekülü olan N-bütiril-L-homoserin lakton (C4-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan rhlR geni rol alır [90]. Bu sistem ramnolipid sentezi için gerekli bir enzim olan ramnoziltransferazı kodlayan rhlAB operonunun ifadesini düzenler. Sistem ayrıca LasB elastazın, LasA proteazın, piyosyaninin, siyanürün ve alkali proteazın üretimleri için de gereklidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar las ve rhl sistemlerinin etkileşim içinde olduğunu göstermiştir.

Las sistemi rhl sistemini hem transkripsiyonel seviyede, hem de translasyon sonrası aşamalarda kontrol eder

2.14. BİYOFİLM

Modern tıpta implante cihazların yaygın kullanımı bakteri topluluklarının cihazlar üzerinde oluşturduğu biyofilm olarak adlandırılan oluşumların meydana gelmesine yol açabilir. Biyofilm adı verilen bu oluşumlar ileride enfeksiyona neden olabilir [91]. Buna ek olarak osteomyelit ve KF hastalarında görülen akciğer enfeksiyonları gibi kronik enfeksiyonlarda da biyofilm oluşumu patogeneizde önemli rol oynar [92].

Biyofilm mikroorganizmalar tarafından üretilen herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks olarak tanımlanır [93]. Bir biyofilmin

oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz [94]. Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biofilmin en önemli bileşenlerinden bir tanesi ekstrasellüler matriks içerisinde yer alan glikokaliks ve polisakkaritlerdir [66]. *P. aeruginosa*'da glikokaliksin en büyük bileşeni ekstrasellüler DNA'dır (ekstrasellüler nükleaz olmadığı için) [95]. Biyofilmin diğer 2 komponenti Pel ve Psl olarak adlandırılan polisakkaritlerdir [96]. Pel glukozdan zengindir; Psl ise galaktozdan oluşur.

Yapılan in vitro çalışmalarda *P.aeruginosa*'da biyofilm oluşumu için QS'e gereksinim olduğu görülmüştür. Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır.

1. *Mikroorganizmanın yüzeye tutunması*: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.

2. *Geri dönüşümsüz tutunma*: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye baslar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Kistik fibrozis olgularında sık görülen *P.aeruginosa* biyofilmlerinde bu materyal aljinat yapıdadır. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.

3. *Kolonizasyon*: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.

4. *Kopma*: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir.

Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir [97,98,99]. Biyofilm enfeksiyonları ilk dönemde genellikle asemptomatiktir. Konakçı direnci düştüğünde biyofilmden periyodik olarak kopup ayrılan planktonik (serbest formda) mikroorganizmalar akut enfeksiyona yol

açabilir. Antibiyotiğin koruyucu dozları bu mikroorganizmaları kontrol ettiği halde biyofilmi etkilemez [100].

2.14.1. Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturmaktadır?

1-Savunma: Strese cevap olarak gelişir. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir.

Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan exopolisakkaritler (EPE) savunmada önemli rol oynayan moleküldür. EPE bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatur hücrelerin fagositozundan korurlar [94]. Daha sonra bahsedileceği şekilde antibiyotik etkisinden bakteriyi korurlar[101].

2-Adhezyon ve Kolonizasyon: Yaşam için gerekli ortamda kalabilmenin en bilinen yolu = biyofilm oluşturmak Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adhesin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar [102]. Adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar.

Yaşanabilir çevre geliştirme: Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının *Pseudomonaslar*, *V. cholerae*, *E. coli* ve *Stafilokokların* EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Kominite oluşturmak: Kazançların ortak paylaşımıdır. Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdıkları gibi ortamdan aldıkları uyarılar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler.

Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup, bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin adheransını ve korunmasını sağlar. Biyofilmin maturasyonu bakterinin yüzeye irreversibl olarak yapışmasından sonra başlar. Biyofilm geliştikçe bakterinin adherans ve motilite faktörlerinin ekspresyonunda da baskılanma olmaktadır.

Biyofilm direnci gerçekte multifaktöriyel bir olaydır. Direnç nedenleriyle ilgili tezler aşağıda belirtilmiştir:

- Antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonları,
- Mikroçevre değişikliği
- Biyofilme özgü dirençli bir fenotip

2.15.KİSTİK FİBROZİS VE P.AERUGINOSA İLİŞKİSİ

Solunum sistemi diğer sistemlerle karşılaştırıldığında çevreye açık bir giriş kapısı gibi görünmesine karşın normal bir insan her zaman solunum sistemi enfeksiyonu geçirmemektedir. Bunun altında yatan neden solunum sisteminin mükemmel koruyucu sistemidir. Solunum sisteminin en öncelikli koruyucu elemanı mukosilyer yapıdır. Bu yapı mikroorganizmaların sisteme ulaşmasını engellediği gibi diğer partikülleride uzaklaştırarak sistemi korur [103,104,105]. Mukosilyer yapıdaki esas oluşum tüm solunum sistemini örten havayolu yüzey sıvısının hacmi ve kompozisyonudur. Bu sıvı, inhale edilen partikülleri tutan visköz mukus yapı ve epitelyum ile mukusu birbirinden ayıran perisilyer sıvı yapıdan oluşur. Perisilyer yapı düşük viskozitesi ile biryandan silier darbeleri kolaylaştırırken diğer yandan mukusun temizleme işlemini arttırmaktadır [106,107].

Kistik fibrozisli hastalarda KFTR kodlayan gende oluşan mutasyon nedeniyle epitelyumda cAMP bağımlı iyon geçişinin bozulması sonucu perisilyer sıvının hacminde azalma olmaktadır. Bu bozulma sonucunda silialar yeteri kadar uzayamamakta ve akciğerden mukusu temizleyememektedir.[106,108] Mukusda oluşan bu dehidratasyon aynı zamanda glikokaliks yapıya sıkı yapışmaya neden olmaktadır [109]. Tüm bu değişiklikler solunum sisteminde *P. aeruginosa* gibi bakterilerin kolonizasyonu için elverişli bir ortamın oluşmasına neden olmaktadır.

Özellikle *P. aeruginosa* en sık izole edilen bakteri olması yanında, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* gibi aynı veya yakın türlerden oluşan Gram (-) negatif bakterilerin bu hastalarda izole edilmesi ve hastaların mortalite ve morbidite oranlarında artışa neden olması dikkat çekicidir. *P. aeruginosa*'nın bu kadar sıklıkla enfeksiyon nedeni olması henüz net bir şekilde açıklanmasına karşın bu konu ile ilgili birkaç çalışmada ortaya atılmış öneriler mevcuttur. Bazı araştırmacılar *P. aeruginosa*'nın KF epitelyumuna (KFTR⁻) asialo-GM1 aracılığıyla daha

fazla bağlandığını gösterirken [110,111], bazı araştırmacılar KFTR reseptörünün *P aeruginosa* lipopolisakariti için reseptör görevi gördüğünü ve bu şekilde epitelyuma bağlanan bakterinin atılımının sağlandığını, KFTR reseptör azlığında ise akciğerde artmış bakteri yükünün olduğunu bildirmişlerdir [112,113]. Diğer bir çalışmada ise *P aeruginosa* pyosiyenin gibi sitotoksinlerin üretimini arttırarak KFTR ekspresyonunu değiştirdiklerini göstermişlerdir [114]. Bunun yanında KF' li hastalarda izole edilen *P aeruginosa* suşlarının yoğun olarak biyofilim üretmeleri ve bu üretimin çevresel değişiklikler yanında quorum-sensing sistemi tarafından kontrol edilen rhamandolipidlerin KF li hastaların balgamlarında yoğun olarak bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır [115,116,117].

Tüm bu bilgilerin ışığı altında KF li hastalarda bakteri epitel ilişkisini düzenleyen ve bu düzenleme sırasında birtakım yüzey yapılarının ekspresyonunu indükleyen mekanizmaların olduğuna dair ipuçları olmasına karşın halen bu ilişki net olarak açıklanabilmiş değildir. Bakterinin fenotipik farklılıklarının epitelyum ile temasdan sonramı ortaya çıktığı veya bu fenotipik yapıya sahip bakterilerin seçici olarak enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı sorusu halen cevaplanamamıştır. Biz bu projede bu sorulara cevap aramak için normal alveol epitelyum hücreleri ve KF epitelyum hücreleri ile muamele edilmiş bakterilerin fenotipik özelliklerindeki (aderans, biyofilm, büyüme oranları) farklılıkları ve mekanizmasını araştıracağız .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre ve Bakteriler

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında bulunan klinik izolatlar ve green florasan protein (GFP) transfer edilmiş *P. aeruginosa* (Dr.E.Simeon Goldblum - University of Maryland Mucosal Research Center tarafından hediye edilen) kullanılmıştır. Bakteriler kanlı agarda pasajlandı. Serum fizyolojik içinde suspanse edilen bakteriler 10^8 CFU ml bakteri konsantrasyonu hazırlanmak üzere Spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda okutulularak 0,1 optik dansitede ayarlandı.

Araştırmamızda normal insan bronşiyal epitelyum hücresi (BEAS), kistik fibrozis trakeal epitelyum hücresi (CFTH), normal insan trakeal epitelyum hücresi (1HEA), kistik fibrozis bronşiyal epitelyum hücresi (IB3-1) kullanılmıştır. BEAS hücresi Lonza'dan temin edilmiştir. CFTH hücresi Dr.E. Simeon Goldblum (Universitu of Marylan, Baltimore, MD, US) tarafından hediye edilmiştir. 1HEA ATCC'den (American Type Culture Collection -

Manassas, VA, USA) IB3-1 hücresi (Lonza -USA) LCH- 8 besiyerinde kültür edilirken BEAS ve 1 HEA hücreleri DMEM (Biological Industries) + %10 FBS besiyerinde , CFTH hücresi ise DMEM+F12 (Biological Industries) + %10 FBS besiyerinde 37 °C de antibiyotiksiz %5 CO₂ içeren ortamda büyütülmüştür.

3.2. Klinik İzolatın Tiplendirilmesi

Klinik izolatın gram boyası yapılarak, gram negatif basilin Mueller Hinton besiyerine ve kanlı agara ekimleri yapılmıştır. Bu besiyerlerinde piyosiyanine bağlı pigment oluşturma özelliklerine, oksidaz testinde pozitif sonuç vermelerine, laktoz negatif oluslarına, Mio besiyerinde hareket özelliklerine ve indol-lizin negatifliklerine ve O-F 20 besiyerlerinde oksidatif-nonfermantatif oluslarına bakılarak bu özellikleri ile *P.aeruginosa* olarak tiplendirilmiştir. Bu suşlardan green fluorasan protein (GFP) transfekte edilmiş *P. aeruginosa* suşları Dr.E. Simeon Goldblum tarafından hediye edilmiştir.

3.3. Kullanılan Kimyasallar

- 1 Kristal viyole (Riedel – de Haën)
- 2 Lysis Buffer (50 mmol l Tris–HCL (pH 7.4) ve 1% Noniodent P-40.
- 3 PBS (Phosphate buffer salin)

3.4. Adherans Yöntemi Kantitatif

BEAS, CFTH, 1HEA, IB3-1 hücreleri 24'lü plaklara 1 ml besiyeri içersinde ekilerek 37 °C %5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edildi. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra önceden hazırlanan 10⁸ konsantrasyondaki bakteri süspansiyonundan 500 mikrolitre hücrelerin üzerine eklendi ve 2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 3 defa PBS ile yıkandı ve 200 mikrolitre Lysis Buffer ile hücreler patlatıldı. BSA protein test kiti ile patlatılan hücrelerin protein analizi yapıldı. Patlatılan hücrelere uygun dilüsyonlar yapıldıktan sonra klinik izolatlar ekim yapılarak, GFP olan bakteri ise fluorometride 485-532 dalga boyunda okutularak miktarları belirlendi.

Protein Tayini

BSA standardından (2 gr/ml) RIPA ile dilüe ederek 2000-1500-1000-750-500-250-125-62,5 'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlardan 25 mikrolitre kuyucuklara koyuldu. Üzerine 25 mikrolitre numunelerden eklendi. Üzerlerine 200 mikrolitre kitde bulunan A ve B solüsyonundan eklendi (A/B oranı 50/1 olacak şekilde). Hazırladığımız plak 37 °C 'lik etüve koyup yarım saat bekletildi. Spektrometrede 562 nm dalga boyunda okutuldu.

Kalitatif

Kalitatif olarak GFP bakterisi 9 cm² petrilere ekilerek 37 °C %5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edildi. Üzerine 10⁷ CFU/ml GFP bakterisi solusyonundan 500 µl eklenerek 2.5 saat inkübe edildikten sonra PBS ile yıkanarak üzerine mounting besiyeri (Daco) damlatılarak florasan mikroskopda (Olympus) görüntülendi ve fotoğraflandı.

3.5. Büyüme oranları ve Slime üretim oranlarının bakılma yöntemi

BEAS, CFTH, 1HEA, IB3-1 hücreleri 24'lü plağın 1 er kuyucuğuna ekilerek 37 °C %5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edildi. Besiyeri içinde hazırlanmış 10⁵ bakterisi süspansiyonundan 500 mikrolitre her bir kuyucuğa eklendi. Fluorometre 37 °C de inkübasyonda 485-535 nm dalga boyunda 16 saat süreyle 30 dk da bir kinetik moda okuma yapacak şekilde ayarlanarak okuma yapıldı. Okuma sonrası plak slime oluşumu belirlenmek üzere 48 saat inkübasyonda bırakıldı. Büyüme oranları için 0, 6, 8, 12 ve 16. saatlerdeki floresans değerleri karşılaştırıldı.

Slime üretim oranları için inkübasyon sonrasında kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl % 1 kristal viole eklenerek 15 dk boyanması için beklendi. İçerik boşaltıldı ve iki kez yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20) ile çözdürüldü. 595 nm dalga boyunda mikropak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak optik dansitesi 1' den büyük olan izolatların slime oluşturduğu kabul edildi.(O'Toole, 1998 #9).

3.6. İstatistik Yöntem

Çalışmamızda her bir çalışma en az 3 kez tekrar edilmiş olup her bir çalışmada her bir örnek en az 3 kez kullanılmıştır. Çalışmada aderans değerleri T-test ile değerlendirildi. P> 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

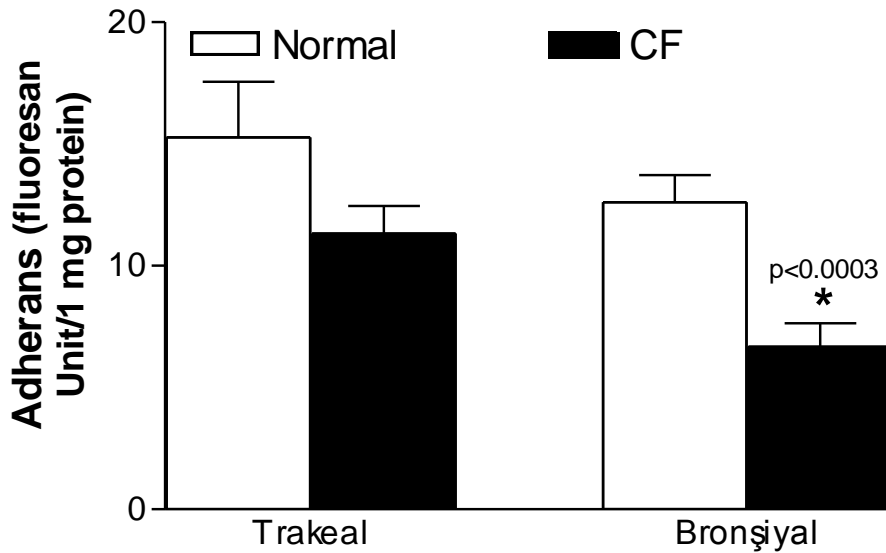
Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 29/03/2011 tarihinde TPF- 11007 numaralı proje numarası ile onaylanmış ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir

4.BULGULAR

Bu araştırmada Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Labaoratuvarında bulunan klinik izolatlar ve green florasan protein (GFP) transfer edilmiş *P. aeruginosa* ve normal insan bronşiyal epitelyum hücresi (BEAS), kistik fibrozis trakeal epitelyum hücresi (CFTH), normal insan trakeal epitelyum hücresi (1HEA), kistik fibrozis bronşiyal epitelyum hücresi (IB3-1) kullanılmıştır.

4.1.Aderans Kantitatif

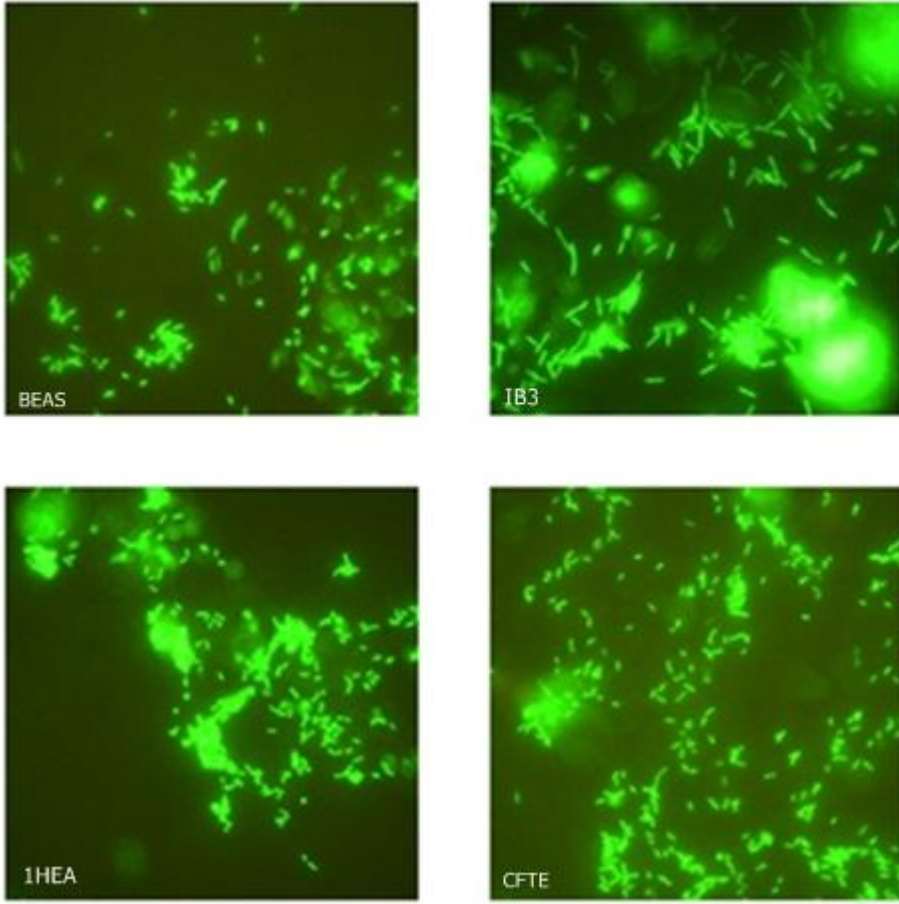
Araştırmamızda GFP *P. aeruginosa* suşunun 1HEA, CFTE, BEAS, IB3-1 hücrelerine aderansı *in vitro* hücre kültürü ortamında test edildiğinde, trakeal hücrelerden KF epiteline aderans normal epitelden daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna karşın, bronşiyal epitelde KF epiteline bağlanma normal epitele bağlanmada istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermektedir ($p<0.0003$) (Şekil 1). Bu bulgular KF epiteline kolonizasyon için gerekli aderansın her iki epitelde de az olmasına karşın bronşiyal epitelde belirgin bir düşüşün olması normalde KF hastalarında rastlanan persistant enfeksiyon oluşumu ile ters ilişkilidir.



Şekil 1: *P. aeruginosa* nın normal (açık renkli bar) ve KF (koyu renkli bar) trakeal ve bronşiyal epitelyum hücrelerine adherans oranı karşılaştırılmıştır. *, aynı bölge normal ve KF epitelleri arasında aderans farkı istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Kalitatif

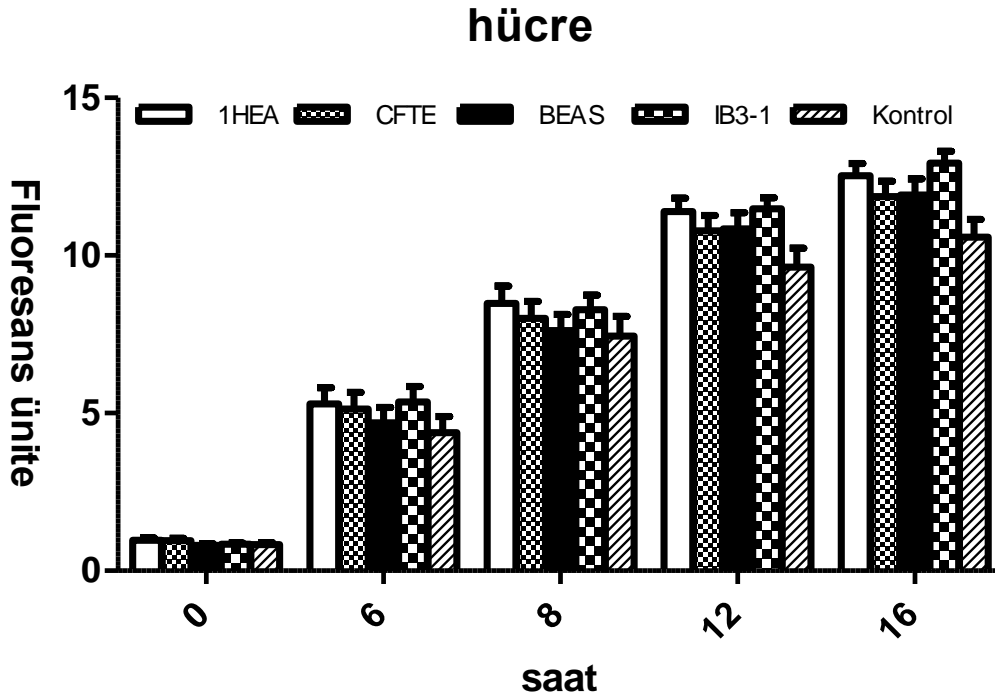
Kantitatif olarak KF ve normal hücre aderanslarının kalitatif incelenmesinde GFP *P. aeruginosa* suşlarının aderanslarının florasan mikroskopda görüntülemesinde aderansda farklılık net olarak belirlenememekle birlikte ilginç olarak IB3 hücrelerinde bakteri morfoloji değişikliği tespit edilmiştir (Şekil 2)



Şekil 2: Normal ve CF li trakeal ve bronşiyal epitellere GFP *P. aeruginosa* aderansı.

4.2. Bakteri Büyüme Oranları

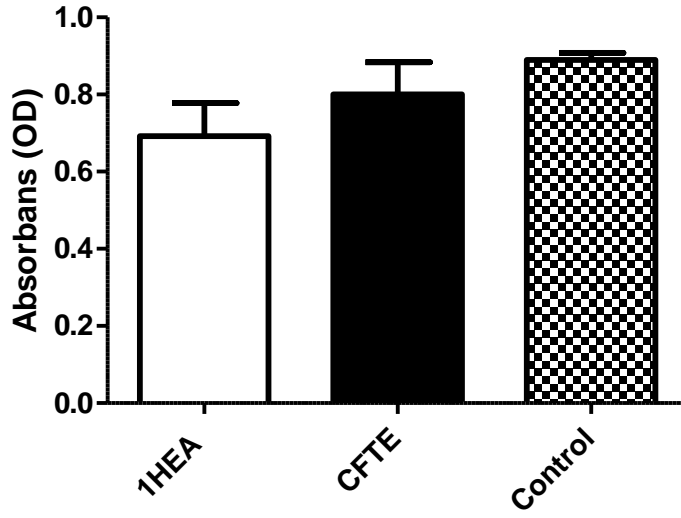
16 saat süreyle farklı hücrelerdeki *P.aeruginosa* büyüme oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6. saatten sonra hücrelerdeki bakteri büyüme oranları kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu tesbit edilmesine karşın sadece büyüme oranı kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hücre grupları arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. (Şekil 3)



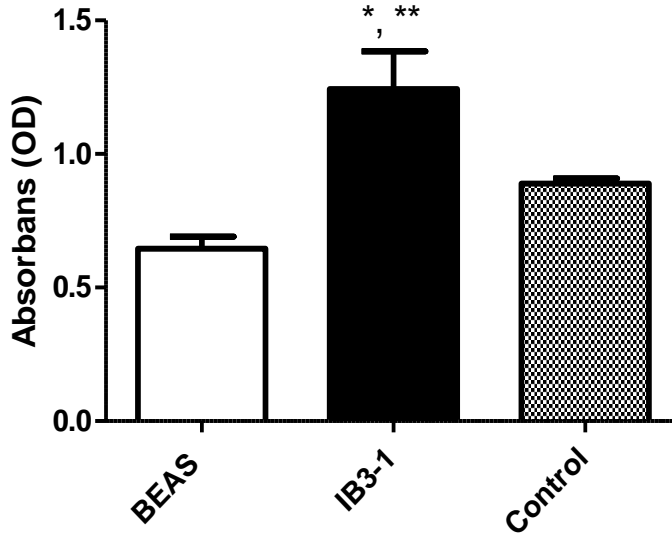
Şekil 3: Farklı zaman dilimlerinde tüm hücrelerin büyüme oranları kontrol grubu ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

4.3. Slime Oluşumu

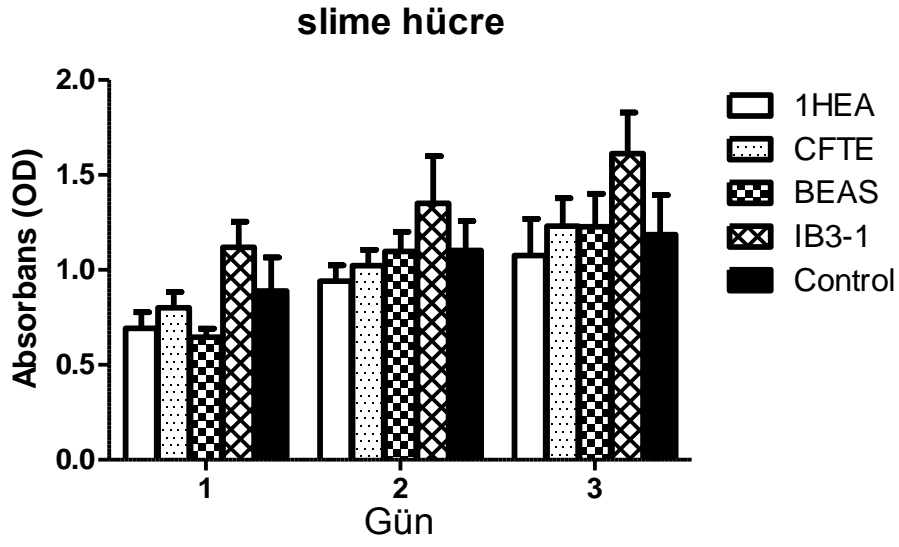
Aderans çalışmamızda KF epiteline aderansın normal hücreye göre düşük olması klinik olarak enfeksiyonun persistant olması ile uyumsuz bulunmuştur. Bu uyumsuzluğun nedeni olabilecek fenotipik farklılık açısından bakterinin slime üretiminin belirlenmesi bu uyumsuzluğu giderebileceğinden GFP *P.aeruginosa*'nın 1HEA, CFTE, BEAS, IB3-1 hücrelerindeki slime üretimine bakıldı. Normal ve KF' li trakeal epitelyum hücrelerinin slime üretiminde kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4). Buna karşın normal ve KF bronşiyal epitelyum hücrelerinde slime üretiminin KF hücrelerinde normal epitelyum hücresi ve kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 5). Slime üretimindeki bu farklılığın günler içindeki değişimini gözlenmek üzere 3 gün süreyle hücre ortamında muamele edilmiş bakterinin slime üretimi izlendiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir (şekil 6).



Şekil 4: Normal ve KF' li trakeal epitelyum hücrelerinde slime üretimi kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.



Şekil 5: Normal ve KF' li trakeal epitelyum hücrelerinde slime üretimi kendi arasında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.*IB3-1 hücreesindeki slime üretimi kontrol grubuna göre daha fazladır (p:0.0122).** IB3-1 hücreesindeki slime üretimi BEAS hücreesindeki slime üretimine göre daha fazladır. (p: 0.0035).



Şekil 6: GFP *P.aeruginosa*'nın 1HEA, CFTE, BEAS, IB3-1 hücrelerindeki slime üretimine bakılmıştır ve slime oluşturma oranları kontrol grubu ve hücrelerin kendi arasında karşılaştırılmıştır.

5. TARTIŞMA

KF'li hastalarda morbidite ve mortalitenin en büyük nedeni *P.aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar olarak saptanmıştır. *P. aeruginosa* solunum yoluna kolonize olduğu zaman onu eradike etmek neredeyse mümkün değildir. Uzun süreli ve tekrarlayan antibiyotik uygulamalarından dolayı bir süre sonra hastalarda çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa* suşları ile kolonizasyon oluşmaya başlar. Mikroorganizma pulmoner enfeksiyon ağırlığına bağlı olarak solunum sisteminde kolonizasyonunu devam ettirebilmek için içinde bulunduğu ortamın şartlarına uyum sağlayabilmek adına fenotipik değişikliğe uğrayan *P.aeruginosa* suşları izole edilmiştir [118]. Çalışmamızın amacı *P.aeruginosa* suşlarının KF epitelyum hücresine bağlandıktan sonra mı fenotipik değişikliğe uğradığı yoksa fenotipik değişikliğe uğramış suşlar mı kistik fibrozis epiteline bağlandığının belirlenmesidir. Mikroorganizma genetik plastisite özelliği nedeniyle çeşitli morfolojik değişiklikler gösterebildiği ve zaman içerisinde antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Bu mikroorganizmanın çevresel koşullara karşı oluşturduğu bir adaptasyon şeklidir. Tekrarlayan ve kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında başlangıçta mukoid olmayan suşlarla kolonizasyon sorumlu tutulurken, progresif gelişen akciğer harabiyeti sonrasında mukoid olmayan koloniler mukoid kolonilere dönüşür [119,120]. Mukoid koloni oluşumu mikroorganizma için koruyucu bir işlevi olan biyofilm oluşumunu kolaylaştırır ve mikroorganizmanın konak savunmasından ve antibiyotik etkisinden kaçmasını sağlar. Çalışmada KF ve normal hücredeki aderansların kalitatif incelemek için yaptığımız florasan mikroskop ile görüntülemesinde KF bronş epitelyum hücresinde bakterinin morfolojik değişikliğe uğradığı gösterilmiştir. Gunjan ve arkadaşlarının Hindistan' da yaptığı bir çalışmada da özellikle *P.aeruginosa* ile kronik enfeksiyonu olan hastalarda mikroorganizmanın morfolojisinde belirgin değişiklik olduğu gösterilmiştir [118]. Bakteri yüzey proteinleri konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçıya bakterinin aderansında önemli rol oynarlar [102]. Aderans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliklerine göre biyofilm oluşturmaya başlarlar [121,122,123,124]. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması bakterinin hareketi ve bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır. Bu genellikle geri dönüşümlü bir olaydır. Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar ise olay geri dönüşümsüz bir hal alır. KF

olgularında sık görülen *P.aeruginosa* biyofilmlerinde bu materyal aljinat yapıdadır [100]. Yapılan çalışmalar slime üreten diğer bakteri çeşitlerinde (Koagülaz negatif Stafilokoklar, *Staphylococcus aureus*... vb) aderans üretiminin daha fazla olduğunu göstermiştir. Aguilar ve arkadaşları, inek ve koyunlardaki mastit olgularından izole edilen *S.aureus* suşlarında slime oluşumunun aderans ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, aderansın slime oluşturan suşlarda arttığını tespit etmişlerdir [125].

Çalışmamızda *P.aeruginosa*'nın KF bronşiyal epiteline bağlanma normal epitele bağlanmaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir. KF'li trakeal epitele aderans normal epitele oranla az olmasına karşın istatistiksel anlamlılık görülmemiştir.

Bu bulgularla ilk bakışta kistik fibrozis epitelinde kolonizasyon için gerekli aderansın her iki epitelde de az olmasına karşın bronşiyal epitelde belirgin bir düşüşün olması normalde kistik fibrozis hastalarında rastlanan persistent enfeksiyon oluşumu ile ters ilişkili gibi görünmektedir. Ancak bu durum KF epiteline özel bir durumdur. KF'li hastalarda "Kistik Fibrozis Transmembran İletken Düzenleyici (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – CFTR)" kodlayan gende oluşan mutasyon nedeniyle epitelyumda cAMP bağımlı iyon geçişinin bozulması sonucu perisilyer sıvının hacminde azalma olmaktadır. Bu bozulma sonucunda silialar yeteri kadar uzayamamakta ve akciğerden mukusu temizleyememektedir [106,126]. Mukusda oluşan bu dehidratasyon aynı zamanda glikokaliks yapıya sıkı yapışmaya neden olmaktadır [106]. Tüm bu değişiklikler solunum sisteminde *P.aeruginosa* gibi bakterilerin kolonizasyonu için elverişli bir ortamın oluşmasına neden olmaktadır. KF'li hastaların havayollarında oluşan bu yoğun, akışkan olmayan mukus tabaka *P.aeruginosa*'nın bu tabaka üzerinde biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Bu anormal durum KF havayolu epitelinde ciddi oksijen düzeyi farklılıkları olmasına neden olur. Bazı bölgeler mikroorganizma için anaerop ortam yaratırken bazı bölgeler aerop ortam sağlar. *P.aeruginosa* nitrat ve nitrit gibi alternatif elektron alıcıları olduğunda anaerop olarak büyüyebilir. Bu alternatif elektron alıcılarından KF havayolu mukus tabakasında yeterince bulunmaktadır yani kısaca bu hastalarda *P.aeruginosa* anaerobik ortamda da büyüyebilmesine rağmen bir stres koşulu mevcuttur. Aynı zamanda anaerobik solunum yapan *P.aeruginosa*'nın ürettiği biyofilm aerop ortamda yapılarına göre çok daha dayanıklıdır. Ayrıca PMNL'lerin bakterisidal etkinliği düşük oksijen düzeyinde hidrojen peroksit oluşumunun azalmasına bağlı olarak belirgin şekilde azalmıştır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda *P.aeruginosa*'nın KF epitelindeki aderansının düşük olmasına karşın persistansını açıklayabilmektedir [127,128]. O'May ve

arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada da biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* suşlarının aderanslarının düşük olduğu saptanmıştır [128]. Yine Slyvia Kirov ve arkadaşlarının klinik izolatlarda yaptığı bir başka çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir [129]. Aynı zamanda KF epitelyum hücrelerinin üzerini kapsayan mukus sonrası oluşan ortam değişikliği sonucunda *P.aeruginosa* reseptörlerinin üzeri kapanır ve *P.aeruginosa* reseptörlere bağlanamaz ve böylece aderans azalır. Çalışmamızda normal ve KF trakeal ve bronşiyal epitelyum hücrelerinde *P.aeruginosa*'nın 16 saatlik büyüme oranlarına bakıldığında ve 6. saatten sonra tüm hücre gruplarında kontrol gruba göre büyüme oranlarında artış gözlenmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. Büyüme oranlarında farklılık görülmemesine karşın aderanslardaki azalma KF epitelinin sadece *P. aeruginosa*'nın epitelyum yüzeyine bağlanmada non-spesifik veya spesifik mekanizmalar ile bağlanmasında görev alan yapıların değiştiğini, epitelin hücre büyümesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda normal ve KF bronşiyal epitelyum hücrelerindeki *P.aeruginosa*'nın slime üretimi kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KF hücrelerinde normal epitelyum hücresine ve kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı.

Son yıllarda *P.aeruginosa* infeksiyonlarının patogeneğinde biyofilm oluşumunun önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır. İlk olarak 17. Yüzyılda Levenhoek dışından almış olduğu örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmiştir [130]. 1978 yılında ise bakterinin biyofilm adı verilen bir oluşum içerisinde olduğu ve bakterinin yapışmış şekli ile serbest şekli arasında fark olduğu saptanmıştır. Biyofilm mikroplar tarafından oluşturulan herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks olarak tanımlanmıştır. Bakteriler konak savunması ve antibiyotiklere karşı direnç, yaşam için gerekli ortam oluşturabilme, adezyon ve kolonizasyon sağlama gibi amaçlarla biyofilm oluşturur. Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve ph değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ultraviyole ışığa maruz kalma gibi zararlı etkilerden korur. Besinlerin depolanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immun sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur [100]. Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma glikokaliks ve

yüzeysidir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz. Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma , %1-2 polisakkarit %1-2 protein,%1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma tarafından oluşturabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisi oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilm oluşması birkaç saatten birkaç haftaya kadar zaman alabilir. Örneğin *P.aeruginosa* 'nın elektrik yüklü yüzeye yapışması sadece 30 sn alır [131]. Baltimore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da CF bronşiyal epitelinde *P.aeruginosa* 'nın biyofilm üretimi gözlenmiştir [115,132]. Lee ve arkadaşlarının in vivo yaptığı çalışmada hem *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu gösterilmiş hem de biyofilm oluşumu ile birlikte adherans oranının da düştüğü gözlenmiştir [133]. Bu değişikliklerin nedenlerinin açıklanması için KFTR nin epitelyum yüzeyinde ve ortamda yapmış olduğu değişiklikler irdelendiğinde; bazı araştırmacılar *P aeruginosa*'nın KF epitelyumuna (KFTR) asialo-GM1 aracılığıyla daha fazla bağlandığını gösterirken [110,111], bazı araştırmacılar KFTR reseptörünün *P aeruginosa* lipopolisakkariti için reseptör görevi gördüğünü ve bu şekilde epitelyume bağlanan bakterinin atılımının sağlandığını, KFTR reseptör azlığında ise akciğerde artmış bakteri yükünün olduğunu fakat aderansın azaldığını bildirmişlerdir [112,113]. Diğer bir çalışmada ise *P aeruginosa* pyosiyanin gibi sitotoksinlerin üretimini arttırarak KFTR ekspresyonunu değiştirdiklerini göstermişlerdir [114]. Bunun yanında KF' li hastalarda izole edilen *P aeruginosa* suşlarının yoğun olarak biyofilim üretmeleri ve bu üretimin çevresel değişiklikler yanında quorum-sensing sistemi tarafından kontrol edilen rhamandolipidlerin KF' li hastaların balgamlarında yoğun olarak bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır [115,116,117].

6. SONUÇ

P.aeruginosa'nın neden olduğu enfeksiyonlar, KF' li hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Günümüzde çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa* ile oluşan kronik enfeksiyonlar KF hastalarında önemli bir problem haline gelmiştir.

Çalışmamızda *In vitro* koşullarda KF' li ve normal insan epitelyumunun *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilmesi sonrasında bakterinin fenotipik yapı özelliklerindeki değişimleri incelendi. Sonuç olarak;

1- Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda *P.aeruginosa*'nın KF epitelinde aderans ve biyofilm üretimi gibi fenotipik farklılıkların görülmesinin epitelyum yüzey yapısında oluşan yapısal değişikliklerin bakteri aderansına ve muhtemelen bu değişiklikler sonucu oluşan olumsuz ortam veya bu değişikliklere neden olan genetik uyarının bakteri üzerine direkt etkisine bağlı olarak biyofilm üretimini arttırdığını düşündürmektedir.

2- KF' li hastalarda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tam olarak tedavi edilememesinin ana nedenlerinden birisinin bakterinin uğradığı fenotipik değişiklikler olabileceği düşünüldü.

ÖZET

Kistik fibrozisde oluşan solunum enfeksiyonlarında bakteri fenotipik özelliklerin araştırılması.

Amaç: İn vitro koşullarda KF'li ve normal insan epitelyumunun *P. aeruginosa* ile enfekte edilmesi sonrasında bakterinin fenotipik yapı (biyofilm oluşumu, aderans oluşumu, büyüme oranları) özelliklerindeki değişimlerinin tespit edilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda green florasan protein (GFP) transfer edilmiş *P. aeruginosa* 'nın bronşiyal epitelyum hücresi, kistik fibrozis trakeal epitelyum hücresi, normal insan trakeal epitelyum hücresi, kistik fibrozis bronşiyal epitelyum hücresinde kantitatif (fluorometride 485-532 dalga boyunda okutularak) ve kalitatif (florasan mikroskopda) yöntemle aderans tayini yapılmıştır. Mikroorganizmanın büyüme oranları fluorometrede 37 °C de inkübasyonda 485-535 nm dalga boyunda 0, 6, 8, 12 ve 16. saatlerdeki fluoeresans değerlerine bakılarak tespit edildi. Kristal viyole boyama yöntemi ile slime üretimine bakıldı. İstatistik yöntemi olarak T-test kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular: *P. aeruginosa* 'nın normal ve KF trakeal ve bronşiyal epitelyum hücrelerine adherans oranı karşılaştırılmıştır, aynı bölge normal ve KF epitelleri arasında aderans farkı istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur. GFP *P. aeruginosa* suşlarının aderanslarının florasan mikroskopda görüntülemesinde aderansda farklılık net olarak belirlenememekle birlikte ilginç olarak IB3 hücrelerinde bakteri morfoloji değişikliği tespit edilmiştir Farklı zaman dilimlerinde tüm hücrelerin büyüme oranları kontrol grubu ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Buna karşın normal ve KF bronşiyal epitelyum hücrelerinde slime üretiminin KF hücrelerinde normal epitelyum hücresi ve kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir

Sonuç: Çalışmamızda *P.aeruginosa*'nın KF epitelinde aderans ve biyofilm üretimi gibi fenotipik farklılıkların görülmesinin epitelyum yüzey yapısında oluşan yapısal değişikliklerin bakteri aderansına ve muhtemelen bu değişiklikler sonucu oluşan olumsuz ortam veya bu değişikliklere neden olan genetik uyarının bakteri üzerine direkt etkisine bağlı olarak biyofilm üretimini arttırdığını düşündürmektedir. KF' li hastalarda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tam olarak tedavi edilememesinin ana nedenlerinden birisinin bakterinin uğradığı fenotipik değişiklikler olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Kistik Fibrozis, *Pseudomonas aeruginosa*, Aderans, Biyofilm

SUMMARY

Investigation of bacterial phenotypical characteristics of respiratory infections in Cystic Fibrosis

Objective: The purpose of the study is determination of the changes in bacterial phenotypical structures (biofilm formation, adherence formation, growth ratio) after *P. aeruginosa* infection normal human epithelium and human epithelium with CF in vitro conditions.

Material and Methods: In our study quantitative (fluorometric) and qualitative (fluorescent microscopic) methods have been used to determine the amount of adherence of green fluorescent protein transferred *P.aeruginosa* in normal and CF bronchial and, tracheal epithelium cells. Growth ratio of microorganism has been determined by using fluorometry in 37 °C incubation at 0,6,8,12,16 th hour values. Chrystal violet staining method has been used for searching slime production. T-test has been used as the statistical method. P<0.05 has been accepted as significant.

Findings: Adherence of *P. aeruginosa* to CF bronchial epithelium was decreased compared to normal bronchial epithelium and it was statistically significant. However, *P. aeruginosa* adherence to CF tracheal epithelium was decreased compared to normal tracheal epithelium but it is not statistically significant. Interestingly, GFP *P.aeruginosa*, morphological changes have been determined in bronchial epithelium cell with CF cells. Growth ratio of all cells has been compared between control group and themselves in different time intervals, but no differences have been gathered. Conversely, statistically significant increment of slime production of *P. aeruginosa* in CF bronchial epithelium cells has been determined compared to normal epithelium cells and control group.

Result: In our study, changes in *P. aeruginosa* phenotypic properties such as adherence has biofilm production and morphologic changes with CF bronchial epithelium may due to effect of structural changes on epithelial superficial structures and induction of genetic differences. It is thought that these effects directly effects bacterial phenotypic properties while infections in CF patients and these phenotypic changes may be the major determinant of the therapeutic failure of infections.

Kay Words: Cystic Fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, Adherence, Slime production

KAYNAKLAR

1. Kiper N, Yalçın E (2003) Kistik Fibrozis. Sürekli Tıp Eğitim Dergisi 12: 131-133.
2. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 15: 194-222.
3. Umut S, Saryal SB (2011) Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi.
4. Özçelik U (2004) Erişkinlerde Kistik Fibrozis. Toraks Dergisi 5: 8-18.
5. Di Sant'Agnese PE, Andersen DH (1948) Cystic fibrosis of the pancreas. Prog Pediat Study (1 Vol.): 160-176.
6. Esterly JR, Oppenheimer EH (1968) Cystic fibrosis of the pancreas: structural changes in peripheral airways. Thorax 23: 670-675.
7. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics 12: 549-563.
8. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080.
9. Collins FS (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 256: 774-779.
10. Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, et al. (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. Science 256: 530-532.
11. Randak C, Welsh MJ (2003) An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. Cell 115: 837-850.
12. Clain J, Lehmann-Che J, Dugueperoux I, Arous N, Girodon E, et al. (2005) Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. Hum Mutat 25: 360-371.
13. Tsui LC, Durie P (1997) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Hosp Pract (Minneap) 32: 115-118, 123-119, 134, passim.
14. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, et al. (2001) Aberrant CFTR dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. Nature 410: 94-97.

15. Onay T, Topaloglu O, Zielenski J, Gokgoz N, Kayserili H, et al. (1998) Analysis of the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients: identification of three novel mutations (3172delAC, P1013L and M1028I). *Hum Genet* 102: 224-230.
16. Dayangac D, Erdem H, Yilmaz E, Sahin A, Sohn C, et al. (2004) Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 19: 1094-1100.
17. Yilmaz E, Erdem H, Ozguc M, Coskun T, Ozcelik U, et al. (1995) Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered* 45: 175-177.
18. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477-483.
19. Le Drevo MA, Benz N, Kerbirou M, Giroux-Metges MA, Pennec JP, et al. (2008) Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. *Biochim Biophys Acta* 1782: 605-614.
20. Dinwiddie R (2000) Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 3-8.
21. Smith A (1997) Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 16: 91-95; discussion 95-96, 123-126.
22. Buscher R, Grasemann H (2006) Disease modifying genes in cystic fibrosis: therapeutic option or one-way road? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374: 65-77.
23. Goss CH, Burns JL (2007) Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 62: 360-367.
24. Boucher RC (2007) Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 58: 157-170.
25. Burgel PR, Nadel JA (2008) Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 32: 1068-1081.
26. Heijerman H (2005) Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2: 3-5.
27. Tseng J, Do J, Widdicombe JH, Machen TE (2006) Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C678-690.

28. Chen J, Kinter M, Shank S, Cotton C, Kelley TJ, et al. (2008) Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H₂O₂ and inflammatory cytokine production. *PLoS One* 3: e3367.
29. Rao S, Grigg J (2006) New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 91: 786-788.
30. Dubin PJ, McAllister F, Kolls JK (2007) Is cystic fibrosis a TH17 disease? *Inflamm Res* 56: 221-227.
31. Soferman R (2006) Immunopathophysiologic mechanisms of cystic fibrosis lung disease. *Isr Med Assoc J* 8: 44-48.
32. Griese M, Kappler M, Gaggar A, Hartl D (2008) Inhibition of airway proteases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 32: 783-795.
33. Jacquot J, Tabary O, Clement A (2008) Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 8: 359-363.
34. Schwarzer C, Fischer H, Kim EJ, Barber KJ, Mills AD, et al. (2008) Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl⁻ transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 45: 1653-1662.
35. Koch C, Hoiby N (2000) Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 67: 239-247.
36. Ratjen F, Doring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361: 681-689.
37. Rosenstein BJ (1998) What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med* 19: 423-441, v.
38. Elmas C (2002) Kistik Fibroziste diğer sistem belirti ve bulguları. *Katkı Pediatri Dergisi* 23: 179-196.
39. Wiatrak BJ, Myer CM, 3rd, Cotton RT (1993) Cystic fibrosis presenting with sinus disease in children. *Am J Dis Child* 147: 258-260.
40. Doring G, Hoiby N (2004) Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 3: 67-91.
41. Foweraker J (2009) Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89: 93-110.

42. Rajan S, Saiman L (2002) Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* 17: 47-56.
43. Saiman L (2004) Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S367-369.
44. Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153: 917-923.
45. Gibson LE, Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549.
46. LeGrys VA (1996) Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr* 129: 892-897.
47. Wilson DC, Ellis L, Zielenski J, Corey M, Ip WF, et al. (1998) Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of in vivo nasal potential difference measurements. *J Pediatr* 132: 596-599.
48. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. (2008) Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153: S4-S14.
49. Thomas J, Cook DJ, Brooks D (1995) Chest physical therapy management of patients with cystic fibrosis. A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 846-850.
50. Rosenstein BJ, Murphy T (1998) Advances in the science and treatment of cystic fibrosis lung disease. Continuing medical education resource. Duke university medical center & health system 1-34.
51. Shah PL, Scott SF, Fuchs HJ, Geddes DM, Hodson ME (1995) Medium term treatment of stable stage cystic fibrosis with recombinant human DNase I. *Thorax* 50: 333-338.
52. Eng PA, Morton J, Douglass JA, Riedler J, Wilson J, et al. (1996) Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 21: 77-83.
53. Colombo JL (2003) Long-acting bronchodilators in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 9: 504-508.
54. Ramsey BW (1996) Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 335: 179-188.

55. Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB (1995) Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 332: 848-854.
56. Aronoff SC, Quinn FJ, Jr., Carpenter LS, Novick WJ, Jr. (1994) Effects of pentoxifylline on sputum neutrophil elastase and pulmonary function in patients with cystic fibrosis: preliminary observations. *J Pediatr* 125: 992-997.
57. McElvaney NG, Hubbard RC, Birrer P, Chernick MS, Caplan DB, et al. (1991) Aerosol alpha 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet* 337: 392-394.
58. Doggert R (1979) Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy* New York: Academic Press: 1-8.
59. Holt J.G, Kreig PHA, Sneath JT, Williams St (1994) *Manuel of Systemic Bacteriology* 9th ed.: 93-94.
60. Murray PR (2007) *Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)*.
61. Scott-Thomas AJ, Syhre M, Pattemore PK, Epton M, Laing R, et al. 2 Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 10: 56.
62. Mahenthalingam E, Campbell ME, Speert DP (1994) Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 62: 596-605.
63. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36: 78-91.
64. Pier GB, Ramphal R *Pseudomonas aeruginosa*. *Mandell , Douglas, and Bennet's Principles and Practice of Infectious Disease* 6th ed.: 2587-2615.
65. Salyers A (1994) *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. ASM Press, Washington, DC, USA: 260-268.
66. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, et al. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7907-7912.

67. Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, Leroy X, Robriquet L, et al. (2004) Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock* 21: 444-451.
68. Howe TR, Iglewski BH (1984) Isolation and characterization of alkaline protease deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* 43: 1058-1063.
69. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10: 599-606.
70. Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, et al. (2003) Phenazine-1 carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L584-592.
71. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, et al. (2003) The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1077-1086.
72. Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, et al. (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168: 1861-1868.
73. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7072-7077.
74. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA (1996) Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64: 518-523.
75. Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L409-418.
76. Matsumoto K (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonas and serratia keratitis. *Biol Chem* 385: 1007-1016.

77. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, et al. (1993) Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 75: 1661-1669.
78. Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH (1990) Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* 4: 527-535.
79. Woods DE, Iglewski BH (1983) Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 5 Suppl 4: S715-722.
80. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J (1993) Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon* 31: 27-34.
81. Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH (1985) Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Clin Microbiol* 4: 175-179.
82. Shaver CM, Hauser AR (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72: 6969-6977.
83. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, et al. (2004) Paradoxical Camp induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 95: 196-203.
84. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68: 3998-4004.
85. Greenberg E (1997) Quorum sensing in gram-negative bacteria *ASM News* 63: 371-377.
86. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24: 895-904.
87. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50: 727-751.
88. Gambello MJ, Iglewski BH (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173: 3000-3009.

89. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, et al. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36-42.
90. Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1490-1494.
91. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
92. Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57: 677-701.
93. Sakarya S (2005) Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. 12, Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi;16-20 Kasım 2005:Antalya Belek: 3-8.
94. Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881-890.
95. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487.
96. Friedman L, Kolter R (2004) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51: 675-690.
97. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70: 6339-6345.
98. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, et al. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426: 306-310.
99. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
100. Altun HU, Burçin Ş (2008) Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 39: 82-88.
101. Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 999-1007.

102. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617.
103. Guggino WB (2001) Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. *Nat Med* 7: 888-889.
104. Knowles MR, Boucher RC (2002) Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109: 571-577.
105. Verkman AS (2001) Lung disease in cystic fibrosis: is airway surface liquid composition abnormal? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L306-308.
106. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, et al. (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95: 1005-1015.
107. Puchelle E, de Bentzmann S, Zahm JM (1995) Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches. *Respiration* 62 Suppl 1: 2-12.
108. Tarran R, Grubb BR, Parsons D, Picher M, Hirsh AJ, et al. (2001) The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell* 8: 149-158.
109. Matsui H, Randell SH, Peretti SW, Davis CW, Boucher RC (1998) Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J Clin Invest* 102: 1125-1131.
110. Emam A, Yu AR, Park HJ, Mahfoud R, Kus J, et al. (2006) Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids in vitro or during type IV pili-mediated initial host cell attachment. *Microbiology* 152: 2789-2799.
111. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3019-3023.
112. Pier GB (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8822-8828.
113. Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerceker AA, et al. (2002) CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6907-6912.

114. Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, et al. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 8: 1121-1133.
115. Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ (1989) Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis* 140: 1650-1661.
116. Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6: 56-60.
117. Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS, et al. (2006) Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74: 3134-3147.
118. Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Das BK, Dwivedi SN (2005) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiol* 5: 43.
119. Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Chandra R, Das B, et al. (2002) Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. *Indian J Med Res* 116: 73-81.
120. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
121. Gilmore KS, Srinivas P, Akins DR, Hatter KL, Gilmore MS (2003) Growth, development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect Immun* 71: 4759-4766.
122. Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR (2001) Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 205: 139-146.
123. Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, et al. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860-864.

124. Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U (2002) Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* 70: 2758-2762.
125. Aguilar B, Amorena B, Itturalde M (2001) Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol*: 183-191.
126. Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (2001) The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol* 118: 223-236.
127. Lee KM, Yoon MY, Park Y, Lee JH, Yoon SS Anaerobiosis-induced loss of cytotoxicity is due to inactivation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 79: 2792-2800.
128. O'May CY, Reid DW, Kirov SM (2006) Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48: 373-380.
129. Kirov SM, Webb JS, O'May C Y, Reid DW, Woo JK, et al. (2007) Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153: 3264-3274.
130. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238: 86-95.
131. Jones HC, Roth IL, Sanders WM, 3rd (1969) Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 99: 316-325.
132. Sriramulu DD, Lunsdorf H, Lam JS, Romling U (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* 54: 667-676.
133. Lee B, Haagensen JA, Ciofu O, Andersen JB, Hoiby N, et al. (2005) Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43: 5247-5255.