



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BAKTERİYEL İLETİŞİM İNHİBİTÖRLERİNİN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DA BİYOFİLM OLUŞUMU  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE  
ANALİZ SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

SEYİT AHMET ÇONKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. GÜLGÜN TINAZ

2019 - İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BAKTERİYEL İLETİŞİM İNHİBİTÖRLERİNİN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DA BİYOFİLM OLUŞUMU  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE  
ANALİZ SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

SEYİT AHMET ÇONKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. GÜLGÜN TINAZ

2019 - İSTANBUL

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Biyokimya  
Tez Sahibi : Seyit Ahmat ÇONKER  
Tez Başlığı : Bazı bakteriyel iletişim inhibitörlerinin *Pseudomonas aeruginosa* da biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenmesi  
Sınav Yeri : Biyokimya Anabilim Dalı  
Sınav Tarihi : 18.06.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Prof. Dr. Gülgün TINAZ

### Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Doç.Dr. Seyhan ULUSOY




### Kurumu

Marmara Üniversitesi

Marmara Üniversitesi

Süleyman Demirel Üniversitesi

### İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06./09./2019 tarih ve 4.1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

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

24/05/2019

Seyit Ahmet ÇONKER

## TEŐEKKÖR

Çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez konumun seçiminde ve yapım aşamasında her türlü desteği bana sağlayan Saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gülgün TINAZ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen bütün hocalarıma içtenlikle teőekkürlerimi sunuyorum. Hayatım boyunca her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam, kardeőlerim ve sevgili eőime sonsuz teőekkürler sunuyorum.

Seyit Ahmet ÇONKER

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	: Adenosine Triphosphate Binding Cassette
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
AI	: Otoindükleyici
C4-HSL	: N-bütiril-homoserin lakton
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
EMB	: “Eosin methylene blue” agar
HSL	: Homoserin Lakton
IL-8	: İnterlökin-8
KF	: Kistik Fibrozis
KFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
LB	: Luria Bertani
MHA	: Mueller Hinton Agar
MIC	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: mililitre
oxo-C12-HSL	: N-3-oksododekanol-homoserin lakton
PCN	: Piyosiyenin
PQS	: Pseudomonas kinolon Sinyal
QS	: Quorum Sensing
QSSM	: Quorum Sensing Sinyal Molekülü
SAM	: S-adenozil metiyonin
TSA	: Triptik Soy Agar
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	1
SUMMARY .....	2
1. GİRİŞ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Pseudomonas aeruginosa.....	6
2.1.1. Pseudomonas aeruginosa'nın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	6
2.1.2. Pseudomonas aeruginosa'nın Epidemiyolojik özellikleri .....	7
2.1.3. Pseudomonas aeruginosa'nın Virulans Faktörleri ve Patogenezi .....	8
2.1.3.1. Bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri .....	8
2.1.3.1.1. Kirpik.....	8
2.1.3.1.2. Pili (Fimbriae).....	8
2.1.3.1.3. Alginat .....	9
2.1.3.1.4. Slime faktör .....	9
2.1.3.1.5. Lipopolisakkarit (LPS) .....	9
2.1.3.2. Ekstraselüler virulans faktörleri.....	10
2.1.3.2.1. Elastaz.....	10
2.1.3.2.2. Proteazlar .....	10
2.1.3.2.3. Piyosiyenin .....	11
2.1.3.2.4. Piyoverdin.....	11
2.1.3.3. Toksin üretimi: Ekzotoksin A (ExoA), lökositin, fosfolipaz ve hemolizin .....	11
2.1.3.3.1. Tip III Sekresyon Sistemi .....	12
2.1.3.4. Pseudomonas aeruginosa Hareketi .....	13

2.1.3.4.1. Yüzme hareketi (swimming) .....	14
2.1.3.4.2. Titreme hareketi (twitching) .....	14
2.1.3.4.3. Kayma hareketi (swarming) .....	15
2.1.3.4.4. DNaz aktivitesi .....	16
2.1.4. Biyofilm oluşumu.....	16
2.1.4.1. Biyofilm saptama yöntemleri.....	18
2.1.5. Bakteriyel iletişim “quorum sensing” ve biyofilm oluşumu.....	19
2.1.5.1. las QS sistemi.....	20
2.1.5.2. rhl QS sistemi.....	20
2.1.6. Hücrelerarası iletişimin engellenmesi .....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
3.1. Gereçler .....	23
3.1.1. Bakteriyel suşlar .....	23
3.1.2. Besiyerleri .....	23
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	23
3.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri .....	23
3.2. Yöntemler .....	24
3.2.1. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) testi .....	24
3.2.2. Kristal Viyole yöntemi ile Biyofilm testi .....	25
3.2.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) xCELLigence Cihazı Kullanılarak P. aeruginosa Biyofilm Oluşumunun Gerçek Zamanlı Ölçümü .....	25
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>27</b>
4.1. Sinamaldehyd ve tobramisın için P. aeruginosa PA01 ve P. aeruginosa klinik suşlarının MİK değerlerinin belirlenmesi .....	27
4.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) xCELLigence Cihazı Kullanılarak P. aeruginosa Biyofilm Oluşumunun Gerçek Zamanlı Ölçümü .....	27
4.3. Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole yöntemi ile Tespiti .....	33
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>35</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>41</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>49</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Biyofilm oluşumunun şematik yapısı. ....	17
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'da "Quorum Sensing" sistemi (2) .....	21
Şekil 4.1. xCELLigence cihazını kullanarak bakteriyal biyofilm oluşumunun izlenmesinin şematik çizimi. ....	28
Şekil 4.2. Tobramisin ve sinamaldehitin sub-MIC konsantrasyonlarının <i>P. aeruginosa</i> PA01'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin xCELLigence cihazı ile tespiti. ....	29
Şekil 4.3. Tobramisin Sub-MIC Konsantrasyonlarının PA01'in Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) PA01, b) PA01+tobramisin (1µg/mL), c) LB besiyeri (kontrol). ....	30
Şekil 4.4. Tobramisin Sub-MIC Konsantrasyonlarının Klinik İzolatın Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat+16 µg/mL, c) LB besiyeri (kontrol). ....	31
Şekil 4.5. Sinamaldehitin Sub-MIC Konsantrasyonlarının, PA01'in Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) PA01, b) PA01+sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol) .....	31
Şekil 4.6. Sinamaldehitin Sub-MIC Konsantrasyonlarının, Klinik İzolatın Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat+sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol) .....	32
Şekil 4.7. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonunun, PA01'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi. a)PA01, b) PA01+tobramisin (1 µg/mL)+ sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol). 32	
Şekil 4.8. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonunun, klinik izolat'ın biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat +tobramisin (16 µg/mL) + sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol). ....	33
Şekil 4.9. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının, <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisinin kristal viyole yöntemiyle tayini. A) 1- PA01 (kontrol), 2- PA01+ 0,0156 µl/mL sinamaldehit, 3-Klinik izolat +0,0312 µl/mL sinamaldehit, B) 1- PA01 (kontrol), 2- PA01+ 1 µg/mL tobramisin, 3- Klinik izolat + 16 µg/mL tobramisin. ....	33

## RESİMLER LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Resim 2.1. <i>P. aeruginosa</i> ' da yüzme hareketi .....	14
Resim 2.2. <i>P. aeruginosa</i> ' da titreme hareketi.....	15
Resim 2.3. <i>P. aeruginosa</i> ' da kayma hareketi .....	15
Resim 3.1. xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Cihaz standart bir etüvün içine yerleştirilir ve etüvün dışında bulunan bir dizüstü bilgisayar tarafından kontrol edilir.....	26



## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 4.1. Tobramisin ve Sinamaldehyidin MİK değerleri .....	27
Tablo 4.2. Tobramisin ve Sinamaldehyidin Sub-MIC Konsantrasyonlarının, <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisi .....	34



# **Bazı Bakteriyel İletişim İnhibitörlerinin *Pseudomonas Aeruginosa* Da Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle Belirlenmesi**

**Öğrencinin Adı** : Seyit Ahmet Çonker

**Danışmanı** : Prof. Dr. Gülgün Tınaz

**Anabilim Dalı** : Biyokimya

## **ÖZET**

**Amaç:** Bu çalışmada, tobramisin ve sinamaldehit gibi bakteriyel iletişim inhibitörlerinin *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumuna etkisi, dünyada henüz çok yeni bir yöntem olan gerçek zamanlı elektriksel empedans spektroskopisi (Xcelligence Real Time Cell Analyzer) sistemi kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasını engellediği bilinen tobramisin ve sinamaldehydin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmış ve bu moleküllerin biyofilm oluşumu üzerine etkileri xCELLigence Real Time Cell Analyzer sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar biyofilm çalışmalarında klasik bir yöntem olan kristal viyole ile boyama metodu ile karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Tobramisinin biyofilm oluşumuna etkisi xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak analiz edildiğinde *P. aeruginosa* PA01 suşunda % 60, klinik izolatta ise %46'lık bir inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir. Aynı suşlarda kristal viyole metodu ile tobramisinin biyofilm oluşumuna etkisi test edildiğinde PA01'de % 52, klinik izolatta % 42.6'lık düşüş saptanmıştır. Sinamaldehit ise xCELLigence kullanılarak yapılan biyofilm testinde PA01'de %53, klinik izolatta %31'lik azalmaya neden olmuştur, kristal viyole metodu ile biyofilm oluşumunda PA01'de % 45, klinik izolat'ta % 32.4 düşüş görülmüştür.

**Sonuçlar:** Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin hızlı ve güvenilir metot olduğunu ve biyofilm oluşumunu engelleyen moleküllerin tespitinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir

**Anahtar Sözcükler:** *Pseudomonas aeruginosa*, Biyofilm, RTCA xcelligence

# **Determination of Impacts of Some Bacterial Communication Inhibitors' on Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Real-Time Cell Analysis System**

**Ph. D. Student** : Seyit Ahmet Çonker

**Supervisor** : Prof. Dr. Gülgün Tınaz

**Department** : Biochemistry

## **SUMMARY**

**Aim** : The aim of this study is to investigate the effect of bacterial communication inhibitors such as tobramycin and cinamaldehyde on biofilm formation in *P. aeruginosa* by using a real time electrical impedance spectroscopy (Xcelligence Real Time Cell Analyzer) which is a new method in the world.

**Material and Methods** : The minimum inhibition concentration (MIC) values of tobramycin and cinnamaldehyde, which are known to inhibit biofilm formation of *P. aeruginosa*, were determined and their effects on biofilm formation were investigated using the xCELLigence Real Time Cell Analyzer system. The results were compared with the crystal violet staining method which is a classical method in biofilm studies.

**Results** : When the effect of tobramycin on biofilm formation was analyzed using xCELLigence real-time cell analysis system, it was observed that 60% inhibition of *P. aeruginosa* PA01 strain and 46% inhibition of clinical isolate. When the effect of tobramycin on the formation of biofilm was tested by the crystal violet method in the same strains, 52% decrease in PA01 and 42.6% decrease in clinical isolate were determined. Cinamaldehyde caused a decrease of 53% in PA01 and 31% in clinical isolates in biofilm test using xCELLigence, a decrease of 45% in PA01 and 32.4% in biofilm formation by crystal violet method.

**Conclusion** : The results obtained in this study show that the xCELLigence real-time cell analysis system is a fast and reliable method and can be used reliably in the detection of molecules that inhibit biofilm formation.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, RTCA xCELLigence

## 1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ve klinik açıdan büyük önem taşıyan ilaçlardır. Antibiyotikler, protein sentezi, nükleik asit sentezi, hücre duvarı sentezi veya önemli metabolik yolları engelleyerek bakterileri öldürme yoluyla etki etmektedirler. Bu yolla bakteriler büyük oranda yok edilmekte ancak canlı kalmayı başaran az miktardaki bakteri hücresi, çeşitli mutasyonlarla dirençli koloniler geliştirmektedir. Ayrıca gereksiz ve yüksek dozlarda antibiyotik kullanımında direncin artmasına buna bağlı olarak kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisini kaybetmesine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Livermore, 2004). Günümüzde çoklu antibiyotik direnci gösteren patojen bakterilere rastlanma sıklığı önemli ölçüde artmış dolayısıyla, bakterilerin direnç geliştiremeyeceği yeni stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar çok büyük önem kazanmıştır. Bu stratejilerden bir tanesi bakteriler arası iletişim (quorum sensing) mekanizmasının bloke edilmesidir (Adonizio vd., 2006). Son yıllarda yapılan araştırmalar, bakteriyel iletişim sisteminin bozulması durumunda bakterilerin birlikte hareket edemeyecekleri, konakta kolonizasyon yeteneklerinin azalacağı ve bunun sonucu olarak başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya koyamayacaklarını göstermektedir (Galloway et al. 2011). Dolayısıyla bakterileri antibiyotik kullanrak doğrudan öldürmek yerine aralarındaki haberleşme sistemini inhibe ederek etkisiz hale getirmek patojenlerle savaşta umut vaat eden yeni bir yöntem olarak düşünülmektedir (Hentzer ve ark., 2003). Bakteriyel iletişimi engellemek amacıyla tasarlanan moleküller antipatojenik veya antivirülans moleküller olarak adlandırılmaktadır. Antipatojenik moleküllerin etki mekanizması, bakterileri öldürmeden aralarındaki iletişim sistemini bozarak onların enfeksiyon oluşturma yeteneklerini azaltmak veya tamamen yok etmek temeline dayanmaktadır. Bu moleküllerin, üremeyi doğrudan etkilemedikleri için, dirençli bakterilerin gelişimine neden olmayacakları, konakta bulunan faydalı bakteri topluluklarını yok etmeyecekleri düşünülmektedir. Ayrıca bu moleküllerin enfeksiyonların tedavisinde kullanılan mevcut antibiyotiklerle birlikte kullanılarak onların etkilerini ve raf ömürlerini artıracakları umulmaktadır. Patojenik bakterilerin birçoğu virülans

faktörlerini ve biyofilm üretimini bakteriyel iletişim sistemi aracılığı ile kontrol etmektedir. Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden (EPS) oluşmuş matrikstir (Høiby, 2010). Biyofilm oluşumuna, su ile temas eden tüm yüzeylerde rastlanabilir. Biyofilmler insan vücudundaki çeşitli protezler, kateterler, kontakt lensler, akciğer veya böbrek dokusu gibi birçok yüzeyde bulunabilirler ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Ayrıca, biyofilm oluşumu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde de çok önemli rol oynamaktadır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler planktonik bakteriye göre antibiyotiklere 1000 kat daha dirençlidir (Bjarnhold vd., 2005; Truchado vd., 2009). Dolayısıyla biyofilm oluşumunun önlenmesi ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için yeni ve etkin stratejilerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Günümüzde biyofilm oluşumunu bakteriyel iletişim sistemi üzerinden inhibe eden bazı doğal ve sentetik maddeler rapor edilmiştir. Furanon C-30, sarımsak özütü, yaban turpu, taze zencefilde bulunan 6-Gingerol, linolenic asit bu inhibitör maddelerden bazılarıdır (Christensen vd., 2012; Han-Shin vd., 2015; Chanda vd., 2017).

Bu çalışmada, tobramisin ve sinamaldehytin *P. aeruginosa* PA01 suşunda biyofilm oluşumuna etkileri dünyada henüz çok yeni bir yöntem olan “gerçek zamanlı elektriksel empedans yöntemi” ile incelenmiştir. Xcelligence “Gerçek zamanlı hücre analiz” sistemi (RTCA DP) herhangi bir işaretlemeye gerek olmaksızın gerçek zamanlı olarak hücreleri analiz edebilmektedir. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi E-Plakalarının zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde elektriksel empedans ölçümüne imkan vermektedir. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında gerçek zamanlı olarak kantitatif bilgi verir. Yani sürekli bir şekilde bu biyolojik olayları izleme imkanı sağlar. Biyofilm oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan kristal viyole ile boyama gibi konvansiyonel yöntemler çok zaman alıcı olmaları ve yüksek standart sapmalar nedeniyle çok güvenilir değildir. Xcelligence “Gerçek zamanlı hücre analiz” sistemi sayesinde elde edilen veri sayısı ve kalitesi diğer yöntemlerle elde edilemeyecek kadar yüksektir. Bu da yapılan çalışmaların doğruluğunu arttıran önemli faktörlerden biridir. Yüksek

hassasiyette çalışan bu gibi sistemler sayesinde çok daha kısa sürede, daha düşük maliyetle, daha doğru hücresel bilgiler elde edilebilmekte ve özellikle madde dolaylı toksisite çalışmalarında etkin madde dozu daha doğru tespit edilebilmektedir. Bu sistemin çok yeni olması ve başlangıçta ökaryotik hücreler ile çalışmak üzere geliştirilmesi nedeniyle literatürde bu metot kullanılarak prokaryotik hücrelerle yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Ayrıca prokaryotik hücreler tarafından oluşturulan biyofilm çalışmalarında başarı ile kullanılabildiğinin gösterilmesi bu cihazın farklı amaçlar içinde kullanılma potansiyelini ortaya koyması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, tobramisin ve sinamaldehit gibi bakteriyel iletişim inhibitörlerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunun biyofilm oluşumuna etkisi, Xcelligence sistemi ile incelenmiş ve sonuçlar biyofilm çalışmalarında kullanılan klasik bir yöntem olan kristal viyole metodu ile karşılaştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas* cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan non-fermentatif bakterilerdir. Doğada, suda ve toprakta çok yaygın olarak bulunan *Pseudomonas*'ların bazı türleri insanlar, çeşitli bitkiler ve hayvanlarda enfeksiyona sebep olabilmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* cinsi içinde en sık ayrılan insan patojenidir. Mavi-yeşil renkte olması sebebiyle *aeruginosa* olarak adlandırılmıştır. *P. aeruginosa*, Gessard tarafından 1882 yılında tespit edilmiştir (Toutain ve ark., 2005). Pelloroni'nin yaptığı sınıflandırmaya göre rRNA grup I'de ve Gilardi'nin yaptığı sınıflandırmada Fluorescent grubunda yer almaktadır (Koneman ve ark., 2006).

#### 2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Mikrobiyolojik Özellikleri

*P. aeruginosa* Gram negatif, genellikle 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda düz veya hafif kıvrık basil veya kokobasil morfolojisinde, spor ve kapsül oluşturmayan aerop bakterilerdir. *P. aeruginosa* uçta bulunan tek polar flagellası sayesinde hareket edebilir. *Pseudomonas* diğer cinslerinde ise birden fazla flagella yer alabilmektedir (Peabody ve ark., 2003). En iyi aerob ortamlarda ürerken, oksijen olmadığı durumlarda elektron alıcı olarak yeterli NO<sub>3</sub> mevcut ise anaerob ortamlarda da hayatını sürdürür. *Pseudomonas* bakterilerinin psikrofil, mezofil veya psikotrof çeşitleri mevcuttur. 20-42°C arasındaki ısılarda üreyebilir ancak en iyi 37°C'de üremektedirler. 42°C'de de üreyebilme yeteneği ile *P. aeruginosa*, *P. putida* ve *P. fluorescens*'den ayrılmaktadır. *Pseudomonas* türleri en iyi pH=6.6-7.0 aralığında ürerler. pH=5.6-8.0 arasında da kolay üreyebilen bakterilerdir. Tek bir karbon kaynağı varlığında dahi üreyebilirler. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok çeşitli besiyerlerinde kolay üredikleri için izole edilmeleri kolaydır (Palleroni, 2003). Kanlı besiyerinde, kenarları düzensiz, yassı, buzlu cam şeklinde, 1-5 mm çapında, β-hemolitik koloniler meydana getirir. McConkey agar gibi laktozlu besiyerlerinde laktoz negatif koloniler oluştururlar. *P. aeruginosa*, triptofan 2- aminoasetofenondan kaynaklanan aromatik meyve kokusuyla karakteristiktir (Scott-Thomas ve ark.,

2010).

*P. aeruginosa* suşları kültür ortamında piyosiyanın, pyoverdin, piyorubin ve piyomelanin gibi çeşitli pigmentler meydana getirirler. Mavi-yeşil bir pigment olan piyosiyanın fenazin yapısındadır. Sadece aerob ortamda meydana gelir ve tanı değeri yüksektir. Pyoverdin mavi renklidir ve suda çözünen piyosiyanınle bir araya geldiğinde parlak yeşil renk meydana getirirler. Piyorubin bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen, parlak kırmızı renkte bir pigmenttir. Düşük oksijen konsantrasyonunda dönüşümü olmayacak şekilde rengini kaybeder. Bu pigment klinik izolatların %2'sinde tespit edilmektedir (Şen, 2006). Piyomelanin ise kahverengi, siyah renkte sık gözlenmeyen bir pigmenttir. Demirin kısıtlı olduğu koşullarda, pigmentler bakterinin demir alımı için siderofor olarak görev yapmaları sebebiyle pigment üretimi artar. *P. aeruginosa*'nın teşhisi açısından besiyerinde özellikle piyosiyanın ve pyoverdin pigmentlerinin varlığı oldukça önemli bir özelliktir (Meyer, 2000).

### **2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Epidemiyolojik özellikleri**

*P. aeruginosa*, suyu seven bir yapıya sahip olup nemli ortamı sevmektedir. İnsanlarda koltuk altı, kulak gibi nemli vücut bölgelerinde bulunur. Yataklar, çarşaf, küvetler, paspaslar, temizlik solüsyonları, ilaçlar, dezenfektanlar ve lavabolardan rahatlıkla izole edilebilirler. Bağışıklığı düşük hastalar için ciddi risk oluşturur. Çiğ sebzelerde kolonize olabilmektedir (Remington ve Schimpff, 1981). Sağlıklı bireyleri nadiren kolonize edebilir. Hastane enfeksiyonlarına sebebiyet veren kritik bakterilerdendir. Sağlık tesislerinde, enfeksiyonun etkin epidemiyolojik kontrolü için *P. aeruginosa*'nın kaynağının ve yaygınlığının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Kemoterapi alan hastaların sindirim sisteminde, yanık hastalarının ciltlerinde, mekanik ventilasyona bağlı hastaların alt solunum yollarında, ve uzun süreli antibiyotik tedavisi gören hastalarda yüzde elli oranında taşıyıcılık söz konusudur (Shannon ve French, 2004). Kistik fibrozis hastalarında pulmoner enfeksiyonuna sebep olması ve antibiyotik direncinin artması nedeniyle ciddiyeti artmaktadır (Speert ve ark., 2002; Driscoll ve ark., 2007).

### 2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virulans Faktörleri ve Patogenezi

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde ürettiği elastaz, piyosiyenin, alkalın proteaz, ekzotoksin A, hemolizin ve siyanid gibi virülans faktörleri ve biyofilm oluşumu çok önemli rol oynar. Virülans faktörleri, üremenin olduğu, hücre yoğunluğunun fazlaştığı logaritmik fazda salınır. *P. aeruginosa* tarafından salgılanan virülans faktörlerinin üretimi bakteriyel iletişim sistemi (Quorum Sensing (QS)) olarak adlandırılan bir sistem ile kontrol edilir (Nicas ve Iglewski 1985).

*P. aeruginosa* sağlıklı bireylerde hastalığa sebep olmazken, konak savunmasının zayıfladığı koşullarda üretilen virülans faktörlerinin etkisiyle önemli enfeksiyonlara sebep olabilir. Bir *P. aeruginosa* enfeksiyonunun gelişmesi üç basamakta gerçekleşir.

Bunlar;

- bakterinin adezyonu ve kolonizasyonu,
- lokal invazyon
- sistemik yayılım ve sistemik enfeksiyondur.

Bu basamaklarda bakterinin üretmiş olduğu virülans faktörleri farklı derecelerde etki gösterir.

#### 2.1.3.1. Bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri

##### 2.1.3.1.1. Kirpik

*P. aeruginosa*'nın yüzme (swimming) hareketinden sorumlu yapıdır. Bakterinin yaşamı için gerekli değildir ancak patogeneizde kritik role sahiptir, membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar ve kolonizasyona yardımcı olur ve oldukça immünojeniktir (Finlayson ve Brown, 2011; Feldman ve ark., 1998).

##### 2.1.3.1.2. Pili (Fimbriae)

Bakteri yüzeyindeki ince, kısa ve düzgün çıkıntılar Fimbria olarak adlandırılır. Genelde hareketten sorumlu değilken, *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) hareketinden sorumludur (Karatuna, 2008). Yalnız elektron mikroskopunda gözlemlenebilir. Bakterinin farklı yüzeylere ve birbirine bağlanarak üremelerini sağlar, küme veya film tabaka meydana getirmesinde rol oynar (Smedley ve ark., 2005).

Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Kirpik gibi piluslar da epitel hücre yüzeyine bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar.

#### **2.1.3.1.3. Alginat**

Alginat, glukuronik ve mannuronik asidin tekrar eden polimerlerinden oluşan mukoid bir ekzopolisakkarittir. *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu tüm solunum yolu enfeksiyonlarında alginat üretimi kritik bir rol oynar (Jain ve Ohman, 2005). Alginat, bakteriyi solunum yolu epiteli üzerine sabitler ve kirpik gibi bakterinin adezyonunda rol oynar. Aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere ve konağın savunma sistemine karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunur. Ayrıca alginatın *P. aeruginosa* tedavisinde kullanılan aminoglikozidlerin bakterisid etkisini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Denton ve ark., 1997). Pseudomonas enfeksiyonlarına neden olan bakteriyel biyofilmin yapısındaki matriks polimerde önemli rol oynar (Ryder et al., 2007). Aşırı alginat üretimi *P. aeruginosa*'yı fagositozdan ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Hentzer ve ark., 2001). Ayrıca, alginat biyofilm matriksi içinde hücrelerin bir arada kalmasını sağlayan önemli bir virulens faktörüdür (Jain ve Ohman, 2005).

#### **2.1.3.1.4. Slime faktör**

*P. aeruginosa*'nın bazı şartlarda meydana getirdiği polisakkarit kapsül benzeri yapıya "slime tabakası" adı verilir. Glikokaliks veya mukoid ekzopolisakkarit olarak ta adlandırılır. Slime faktörün, bakterinin konak savunmasından korunmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir (Lagournintzis ve ark., 2003).

#### **2.1.3.1.5. Lipopolisakkarit (LPS)**

Lipopolisakkarit (LPS), bakteri hücre duvarının dış membranının yüzeyinde yer almaktadır. Fosfolipid tabaka içine yerleşmiş lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özümlü polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan meydana gelmektedir. Konak savunmasına karşı dirençte önemli bir rol oynayan ve bakterinin adezyonunda rol alan önemli bir virulens faktörüdür (Kipnis ve ark., 2004).

### 2.1.3.2. Ekstraselüler virulans faktörleri

#### 2.1.3.2.1. Elastaz

Elastaz, akciğer dokusunun ana elamanı, ekspansiyon ve kontraksiyondan sorumlu olan elastin proteinini yok eder. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastaz dokunun bütünlüğünü yok ederek, bakterinin dokuya invazyonuna sebep olur (Alcorn ve Wright, 2004). Meydana gelen doku hasarında kollajen yıkımı kritik bir role sahiptir. Elastaz; interstisyel kollajen olarak değerlendirilen tip-3 ve tip-4 kollajeni yıkar. Deri, pulmoner ve vasküler yapısında yer alırlar. Karaciğer ve dalak stromasında bulunur. Tip-4 kollajen ise; bazal membran da bulunur ve damar yapıların ana elemanlarından. Yapılan hayvan deneylerinde, tavşanlara intratrakeal *Pseudomonas* elastazı verildiğinde hızlı ve yaygın intraalveolar hemoraji tespit edilmiştir (Wienerkronish ve ark., 1993). Elastaz üretimi düşük olan *P. aeruginosa* izolatları ile gerçekleştirilen hayvan pnömoni modellerinde enfeksiyonun daha hafif seyrettiği gözlenmiştir (Hamood ve ark., 1996).

LasA proteaz ve LasB elastaz, *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden sorumludur. LasB bir çinko metalloproteinazdır. LasA ise, serin metalloproteinazdır. Bu iki enzim sinerjistik özellik göstererek elastini parçalar. LasB güçlü bir proteazdır ancak LasA proteaz, yalnız başına elastini parçalayamaz LasB elastazın elastolitik özelliğini artırır. Hücre dışına tip 2 salgı sistemiyle salgılanan elastaz enfeksiyonun ilk aşamasında akciğerde harabiyete neden olarak, kompleman bileşenlerini ve serum  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneze oldukça etkilidir. Bununla birlikte solunum yolu epitellerindeki sıkı bağlantıları yok ederek epitel geçirgenliğini çoğaltır ve enfeksiyon yerinde nötrofil sayısının artmasına neden olur. Elastaz IL-8 üretimini stimüle ederek pro-inflamatuvar tesirde bulunur.

#### 2.1.3.2.2. Proteazlar

*P. aeruginosa* farklı proteazlar salgılayarak konak bağışık yanıtını inaktif hale getirebilir. Bu proteazlar hücrelere toksik olduklarından dolayı, enfeksiyon oluşumuna neden olurlar. LasA proteaz, LasB elastaz, alkali proteaz, , proteaz IV gibi proteazlar doku hasarına neden olarak *P.aeruginosa* patogenezinde önemli rol oynarlar (Hobden, 2002).

Alkali proteaz, ileri derecede proteolitik aktiviteye sahiptir. Enzim *apr* geni tarafından kodlanır ve özellikle kornea enfeksiyonlarında rol oynar. Proteaz IV, elastin gibi konak proteinlerini parçalayarak bakterinin adhezyon ve invazyonunu kolaylaştırır (Kipnis ve ark., 2004). Aynı zamanda konak proteinlerinden fibrinojeni parçaladığı bilinmektedir.

#### **2.1.3.2.3. Piyosiyenin**

*P. aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyenin mavi-yeşil renkte bir pigmenttir. Öncü molekül olan korizmik asitten, üç halkalı piyosiyanine sentezlenir. Mavi-yeşil renk sayesinde *P. aeruginosa* teşhisi konmasında rahatlık sağlar. Bakterinin fizyolojisinde ve patojenezinde etkin rol oynar (Mavrodi ve ark., 2001). Bakteri metaboizmasındaki etkinliğinin yanında sitotoksik özelliği ile de virulansda rol oynar. Piyosiyenin hidrojen peroksit ve süperoksit gibi reaktif oksijen türevleri meydana getirerek hücrelerde harabiyete neden olur. Araştırmalar neticesinde, piyosiyenin hücre aspirasyonunu inhibe ettiği, epidermis artmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına neden olduğu, kalsiyum homeostazını bozduğu tespit edilmiştir (Denning ve ark., 1998; Lau ve ark., 2004).

#### **2.1.3.2.4. Piyoverdin**

Piyoverdin bir siderofordur. *P. aeruginosa*'nın metabolizması için gerekli olan demiri temin eder. Piyoverdin, demirin eksik bulunduğu durumlarda demiri güçlü bir şekilde bağlar ve reseptöre bağlı mekanizma ile demiri hücre içine alır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda piyoverdinin *P. aeruginosa*'nın ekzotoksin A (EkzoA) ve endoproteaz gibi diğer virülens faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol aldığı ve önemli bir virülens faktörü olduğu gösterilmiştir (Meyer ve ark., 1996).

#### **2.1.3.3. Toksin üretimi: Ekzotoksin A (ExoA), lökosidin, fosfolipaz ve hemolizin**

*P. aeruginosa*'ların çoğunluğu enfeksiyon etkeni olduğunda, ekzotoksin A sentezler. Yapılan çalışmalarda deney hayvanlarında dahi küçük bir dozun ölümcül olduğu tespit edilmiştir. Diferi toksinine yakın özellikte ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve bunun neticesinde protein sentezini inhibe edip hücrenin yok olmasına neden olarak etkisini gösterir (Wick ve ark.,

1990). Başka bir *P. aeruginosa* toksin faktörü ise bir sitotoksin veya lökosidin şeklinde isimlendirilir ve *P. aeruginosa* 158 suşunun kromozomuyla bir araya gelmiş faj genomundan meydana gelir. Sadece bir kaç *P. aeruginosa* suşlarında tespit edilmemektedir. *P. aeruginosa* suşları hemolitik fosfolipaz C PlcHR üretimi vasıtasıyla eritrositlerin yıkımına sebebiyet verir. Diğer bir fosfolipaz C (PlcN) ise, hemolitik özelliği olmayan ve *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen bir enzimdir. PlcHR, fosfatidilkolin ve sfingomiyelini hidrolize ederken, PlcN ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. PlcHR farklı hayvan modellerinde ve invitro sistemlerde daha az seviyede virulan olarak belirlenmiştir. PlcN'nin ise virulans ile bağı tespit edilmemiştir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen diğer bir hemolizinde ramnolipittir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosümfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sümfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Karatuna ve ark., 2008).

#### **2.1.3.3.1. Tip III Sekresyon Sistemi**

Tip III Sekresyon Sistemi, bakteri toksinlerinin doğrudan ökaryotik hücreler içine enjeksiyonunu sağlar. Neticesinde, aktin hücre iskeletini ve protein sentezini yok ederek hücrel ilişkiyi dağıtırlar. Bakteri hedef hücre üzerinde porlar açarak, iki hücreyi bağlar ve efektör proteinlerini ökaryot hücreye iletir. Tip III toksinlerin ekspresyonu *P. aeruginosa* için, enfekte hastalarda ölüm oranlarını artırması ile birlikte iyi olmayan klinik sonuçlar ile bağlantılıdır. Ekzoenzim T, ekzoenzim S, ekzoenzim Y ve ekzoenzim U, *P. aeruginosa*'nın tip III sekresyon sistemiyle salınan toksinleridir (Hauser, 2009).

Ekzoenzim S ve Ekzoenzim T'nin farklı enzimatik ve kimyasal işlevleri mevcuttur. Her iki enzimde, ADP-ribosilat hedef proteinleri olmasına rağmen Ekzoenzim T'nin protein aktivitesi Ekzoenzim S'den daha alt seviyelerdedir. Ekzoenzim S'in 53 kdaltın ve 49 kdaltın olmak üzere iki farklı formu vardır. İki fonksiyonlu ve iki aktif bölgesi olan bir sitotoksindir. Yanık ve yaralara bakterinin yayılmasına neden olan önemli bir etkendir. Ekzoenzim S ve Ekzoenzim A ile birlikte enfeksiyon alan hastalarda, ölüm oranı daha ileri derecededir. (Nicas ve Iglewski, 1985). Ekzoenzim S, hücrel apoptozis için bir ihtiyaçtır ve Rho GTPaz'ın

protein faaliyetlerinin kısıtlanmasına neden olabilir. Ekzoenzim T, *P. aeruginosa*'nın makrofajlar tarafından alınmasına mani olur. Ekzoenzim T'nin yara iyileşmesini azaltıcı özelliği değerlendirilmektedir (Shaver ve Hauser, 2004). Ekzoenzim U öncelikle kültürü yapılmış memeli hücrelerine sitotoksik olduğu gösterilen *P. aeruginosa* suşlarının bazılarında görülmüştür. Fosfolipaz A2 yakın derecede aktivitesi olan bir fosfolipaz olarak değerlendirilen güçlü bir sitotoksindir. Birçok hedef hücreleri parçalar. Ekzoenzim U, *P. aeruginosa* suşlarının neredeyse % 20 - % 30 oranında üretilir. Çoğunlukla göz enfeksiyonları ve akut pnömonilerden izole edilir (Mitov ve ark., 2010). Ekzoenzim U, kistik fibrozis hastalarından izole edilen örneklerden (%1) diğer vücut bölgelerinden izole edilen örneklere (%18) göre daha az seviyede varlığı gösterilmiştir (Bradbury ve ark., 2010). Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde Ekzoenzim U toksini üreten *P. aeruginosa* suşlarının virülans ile bağlantısı tespit edilmiştir. Ekzoenzim U ileri düzeyde öldürücü klinik izolatlar için bir belirteç gibi değerlendirilmektedir. Ekzoenzim U salgılayan suşlar hayvan modellerinde daima daha virulan olarak tespit edilmiştir. Ekzoenzim U üretmeyen suşların virulansı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir azalma belirlenmiştir (Schulert ve ark., 2003).

*P. aeruginosa*'nın bilinen dördüncü tip III efektör proteini Ekzoenzim Y'dir. *Bacillus anthracis* ve *Bordetella pertussis*, hücre dışı adenil siklazlarına yakın şekilde adenil siklaz aktivitesi mevcuttur. Sitolitik cAMP'yi çoğaltarak akciğer damar yapısında hücrelerarası boşluğun meydana gelmesine, çoğalmasına ve bunun sonucu olarak geçirgenliğin artmasına sebep olmaktadır (43).

#### **2.1.3.4. Pseudomonas aeruginosa Hareketi**

Hareket, bakterinin besine ulaşması ve toksik maddelerden uzaklaşması için gerekli bir fonksiyondur. (Sayner ve ark., 2004). Hareket sayesinde konak hücrelerine translokasyon yapar, meydana getirdiği koloni içerisinde konum değiştirir ve biyofilm içinde hareket eder. *P. aeruginosa*, yüzme (swimming), titreme (twitching), kayma (swarming), olmak üzere üç farklı tip hareket yeteneğine sahiptir. Bu hareketlerden yüzme ve kayma flagella bağımlıdır, titremede tip IV bağımlıdır.

#### 2.1.3.4.1. Yüzme hareketi (swimming)

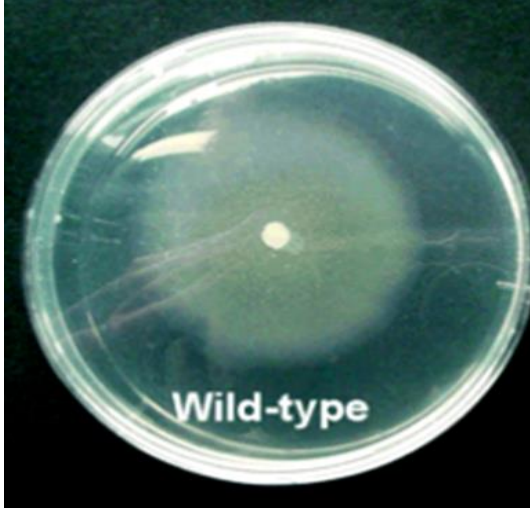
*P. aeruginosa* 'nın sıvı ortamdaki yüzme hareketinden sorumlu olan flajella hücre yüzeyi elemanlarından birisidir. *P. aeruginosa* tek polar flajellası ile ortamda yeterli su bulduğunda dönerek yüzer (Doyle et al., 2004).



Resim 2.1. *P. aeruginosa*' da yüzme hareketi (<http://en.wikipedia.org>)

#### 2.1.3.4.2. Titreme hareketi (twitching)

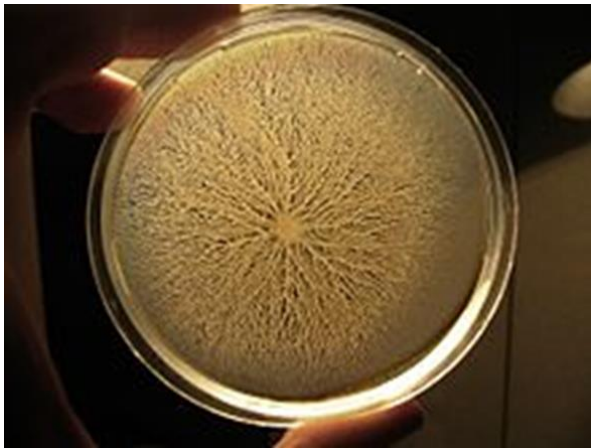
*P. aeruginosa* 'nın ilerlemesi ortamda hiç sıvı bulunmadığı zaman katı yüzeyde titreme hareketi sayesinde olur. Titreme hareketi tip IV pili ile yapılır. Hareket sırasında pilus boyu uzayarak noktaya tutunmaya çalışır, daha sonra o noktaya gelmesi için kısalarak hücrenin ilerlemesini gerçekleştirilir. Pili aynı zamanda epitelyal yüzeye yapışmakta da önemlidir, böylece virülense katkıda bulunur (Patriquin ve ark., 2007).



**Resim 2.2.** *P. aeruginosa*'da titreme hareketi (<https://aem.asm.org/content/aem/>)

#### **2.1.3.4.3. Kayma hareketi (swarming)**

*P. aeruginosa*'nın yarı katı veya ince sıvı yüzeyde ilerlemesi kayma hareketi sayesinde olur. Kayma hareketinden sonra hücrelerin boyu, sayısı ve flajella yapısı değişir. *P. aeruginosa*'nın kayma hareketi sırasında tek polarlı flajella yapısı çift polar flajella yapısına değişir. Kayma hareketi flajella yapısındaki bu değişikliğe ek olarak tip-IV pili ve rhamnolipit (yüzey aktif madde) sekresyonunu gerektirmekte ve bunlardan birinin eksikliği bakterinin kayma hareketi yapamamasına neden olmaktadır (Kohler ve ark., 2000).



**Resim 2.3.** *P. aeruginosa*' da kayma hareketi (<http://en.wikipedia.org>)

#### 2.1.3.4.4. DNaz aktivitesi

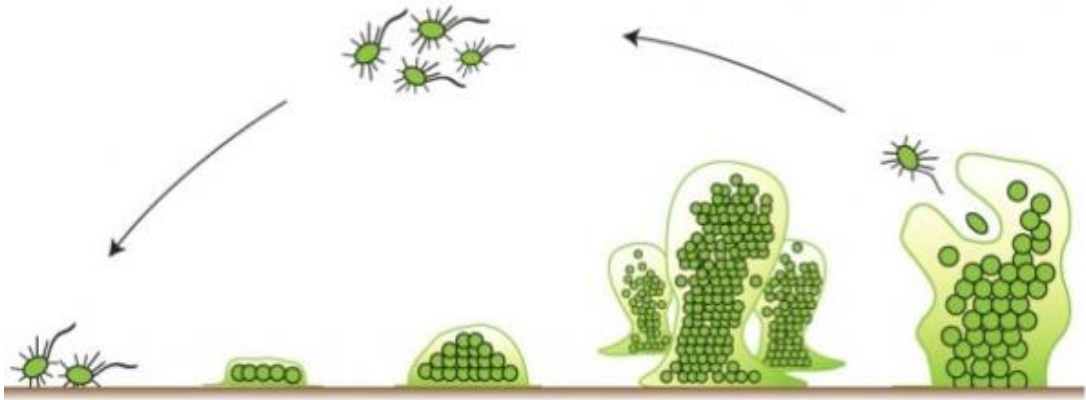
*P. aeruginosa* suşlarının bir kısmında, çeşitli bakterilerde bulunan deoksiribonükleaz enziminin yer aldığı gösterilmiştir (Mahenthiralingam ve ark., 1994).

#### 2.1.4. Biyofilm oluşumu

Yüzeylerindeki moleküller sayesinde birbirlerine ya da bir yüzeye yapışan bakteri toplulukları salgıladıkları polisakkarit matriks içerisine gömülerek “biyofilm” olarak isimlendirilen kompleks bir yapı meydana getirirler.

Biyofilmler, bakterilere koruyucu dinamik bir mikroçevre sağlayarak, onların yaşayabilme ihtimalini artırır (Sutherland, 2001). Biyofilmler geliştiklerinde bakterileri, pH değişikliklerinden, besinsizlikten, antimikrobiyal ajanlardan, dezenfektanlardan, kuraklıktan ve konağın bağışıklık sisteminden koruyarak etkin bir bariyer olurlar. Biyofilmler su ile teması olan hemen her yerde oluşabilir. Oluştukları bölgede kalıcı kolonizasyon ve enfeksiyonlara neden olurlar buda halk sağlığı ve endüstri açısından büyük bir problem oluşturur (Olson ve ark., 2002; Edwards ve Harding, 2004).

Biyofilm oluşturan bakterilerde metabolizmanın yavaşladığı, hareketin kısıtlandığı, virülans etkenlerin ekspresyonunun çoğaldığı fenotipik bir farklılaşma gözlenir. Biyofilmlerin koruyucu yapısında, bakterilerin besinlere rahat ulaşmasını ve atıkların bölgeden kolayca gönderilmesini sağlayan kanallar meydana gelir (Harrison-Balestra ve ark., 2003). Biyofilm bünyesindeki bakteriler aracılığı ile salgılanan hücreiçi sinyal molekülleri farklı konak özellikleri ve çevresel etkenlere göre biyofilmin gelişme ve davranış paternini değiştirmektedir. Antiseptiklerin ve antimikrobiyal ajanlar kullanılması ile birlikte biyofilm içerisinde varlığını devam ettiren hücreler “kalıcı (persister) hücreler” olarak isimlendirilir. Bunlar, olumsuz çevre şartlarında onları programlı hücre ölümüne yönelten mekanizmaları durdurarak biyofilm içerisinde repopülasyonu meydana getirirler. Bu şartlar biyofilm eradikasyonunda başarısızlığa sebep olur.



**Şekil 2.1. Biyofilm oluşumunun şematik yapısı. (https://aqua-tech.ca/2016/01/biofilm-in-spas/ dan uyarlanmıştır)**

Biyofilm yapısı ekzopolisakkaritler (EPS), protein, ekstraselüler DNA su ve iyonlardan oluşur (Palleroni, 2003). EPS’de alginat, PEL ve PSL olmak üzere üç farklı polisakkarit bulunur. Herbir polisakkaritin biyofilm matriksine katkısı suşlara göre farklılık gösterir. Biyofilm oluşumu Şekil 1’de görüldüğü gibi geri dönüşümlü tutunma, geri dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon, olgunlaşma ve kopma evreleri olmak üzere 5 aşamada gerçekleşmektedir.

1) Geri dönüşümlü tutunma: Bu evrede planktonik bakteri hücresi yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanır. Bakteri hücresi ile tutunduğu yüzey arasındaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler sonucu bakteriler zayıf bir şekilde yüzeye tutunur.

2) Geri Dönüşümsüz Bağlanma: Dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik bağlar, kovalent bağlar ve hidrojen bağları aracılığı ile yüzeye bağlanan hücreler, flagella ve pili organelleri ile ve EPS oluşturarak geri dönüşümsüz olarak tutunurlar.

3) Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler gelişir ve bölünerek mikrokoloniler oluşturur. Ortamdaki planktonik bakterilerinde mikrokolonilere bağlanmasıyla biyofilm büyür mantar şeklinde yapılara dönüşür. Mikrokoloniler arasında besin alınımı ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları bulunmaktadır.

4) Kopma: Bu evrede tek bakteri veya bakteri grupları biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılırlar. Kopan planktonik hücreler yeni odaklar oluşturarak biyofilmin yayılmasına neden olabilirler.

#### **2.1.4.1. Biyofilm saptama yöntemleri**

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların görülme sıklığının her geçen gün artmasıyla beraber biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik çalışmalar ivme kazanmıştır. Biyofilm içinde bulunan bakterilerin planktonik bakterilere göre antibiyotiklere yaklaşık 1000 kat daha dirençli olması biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisini imkansız hale getirmektedir. Bu nedenle, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi için, biyofilm oluşumunu saptama yöntemleri ve bu yöntemlerin doğru uygulanması oldukça önemlidir. Günümüzde biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı in vitro ve in vivo yöntemler kullanılmaktadır.

Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp adherans yöntemi ve mikroplak yöntemi gibi yöntemler biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler arasında sayılabilir.

Kongo kırmızılı agar yönteminde, biyofilm oluşturma özelliği test edilecek bakteriler içinde sükröz, beyin kalp infüzyon buyyony, Kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerinde 37°C de 24 saat inkübe edilir, inkübasyon sonucunda parlak siyah koloniler biyofilm pozitif olarak değerlendirilir (Atshan ve ark., 2012).

Modifiye tüp yönteminde, triptik soy buyyon (TSB) besiyeri içeren cam tüplere inoküle edilen bakteriler 37°C de 24saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda, tüpteki besiyeri boşaltılır ve tüpler fosfatla tamponlanmış salin ile yıkanır ve kurumaya bırakılır. Daha sonra tüpler kristal viyole (0.1%) ile boyanır, fazla boya deiyonize su ile yıkanır ve kurutulur. Tüplerin iç çeperinde görülen renkli tabaka biyofilm oluşumu açısından pozitif olarak kabul edilir ( Christensen ve ark., 1982).

Spektrofotometrik mikroplak yöntemi, biyofilm oluşumunu belirlemeye yönelik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde uygun besiyeri içeren 96 kuyucuklu mikroplakların kuyucuklarına bakteri kültürü inoküle edilir ve

inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikroplaklar ters çevrilir ve içindeki kültür boşaltılır. Boşaltılan kuyucuklar yıkanır ve her kuyucuğa kristal viyole ilave edilir, boyanın oluşan biyofilme penetre etmesi için belli bir süre beklenir. Daha sonra boya uzaklaştırılarak kuyucuklar yıkanır ve mikroplaklar kurumaya bırakılır. Kuruyan mikroplaklar etanol ile yıkanır ve spektrofotometrede belli bir dalga boyunda ölçüm yapılır. Cihaz tarafından okunan değerler, kontrol kuyucuklarının değerleri ile karşılaştırılarak biyofilm oluşumu saptanır ( Merrit ve ark., 2005).

### 2.1.5. Bakteriyele iletişim “*quorum sensing*” ve biyofilm oluşumu

Uzun yıllar boyunca, iletişim yeteneğinin çok hücreli “yüksek yapı” organizmalara özgü bir özellik olduğu, bakteriler gibi tek hücreli canlıların ise sadece büyümek ve bölünmekten ibaret olan son derece basit bir yaşam tarzına sahip varlıklar oldukları düşünülüyordu. Ancak günümüzde, bakterilerin izole varlıklar olmadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar halinde buldukları kabul edilmektedir. Bakteriyele iletişim sistemin varlığı ilk defa 1970’lerin başında Gram (-) bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* de biyoluminesens (biyoışım)’in kollektif bir çalışma ile oluşturulduğunun keşfi ile ortaya çıkmıştır.

Daha sonra bu sistemin sadece *V. fischeri* ile sınırlı olmadığı birçok Gram (-) ve Gram (+), insan, hayvan ve bitki patojeni tarafından antibiyotik biosentezi, konjugasyon, önemli virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde yaygın olarak kullanıldığı keşfedilmiştir. Bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla, açıl-homoserin laktonlar (AHLs), otoindükleyici peptitler (AIPs) ve otoindükleyici-2 (AI-2) olmak üzere 3 tip sinyal molekülü kullanırlar. Bakteriler bu sinyal molekülleri aracılığıyla yeterli çoğunluğa ulaşp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin üretimi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedirler. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi “quorum sensing (QS)” olarak adlandırılır. Bugün, bu konuda sahip olduğumuz bilgilerin çoğu *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmalardan gelmektedir. *P. aeruginosa*’nın başarılı bir fırsatçı patojen olmasının nedenlerinden birisi, ürettiği elastaz, alkalın proteaz, hemolizin, siyanid,

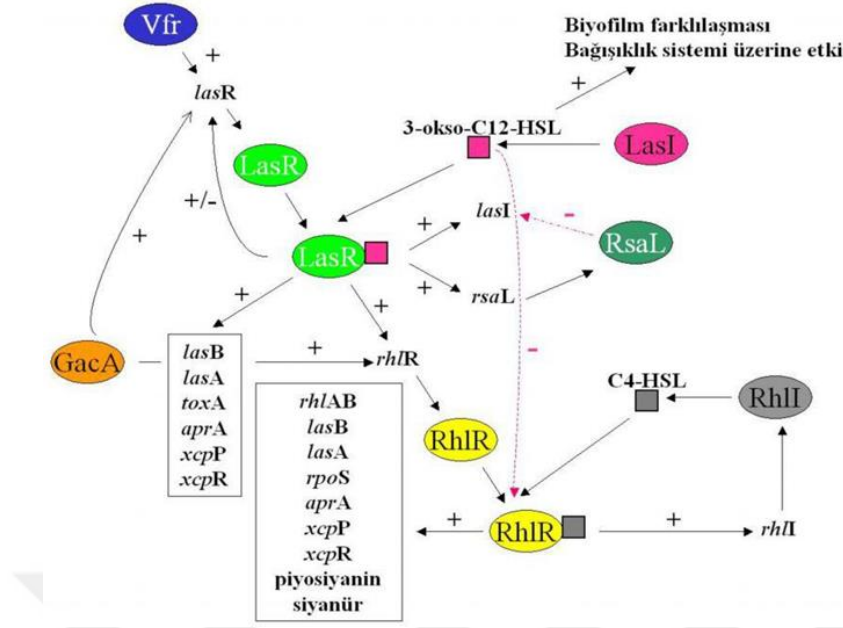
piyosiyenin ve ekzotoksin A gibi virülens faktörleridir. Bu virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu açıl-homoserin lakton aracılı bakteriyel iletişim sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. *P. aeruginosa*'da , “*las*” ve “*rhl*” olmak üzere birbiriyle hiyerarşik ilişkili iki ana açıl homoserin lakton aracılı QS sistemi olduğu bilinmektedir (Şekil 2).

#### **2.1.5.1. las QS sistemi**

İlk tanımlanan QS sistemidir. Sistemin bileşenleri; oto-uyaran (sinyal molekülü) sentaz geni olan *lasI*, *lasI* geninin ürünü sinyal molekülü *N*- (3-oksododekanoyl)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (Gambello, 1991). *lasI*, hücre membranını iki yönlü geçebilen sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Artan bakteri yoğunluğu ile birlikte hücre içindeki sinyal molekülü konsantrasyonu eşik değere ulaşır, sinyal molekülü transkripsiyonel aktivatöre bağlanır ve özgül hedef genlerin ifadesini uyarır (Van Delden ve Iglewski, 1998). (Şekil 2.2.). Las sistemi hücre dışı virülans faktörlerinden *lasA* elastaz, *lasB* elastaz, ekzotoksin A sentezi ve biyofilm oluşumu için gereklidir (Telford ve ark., 1998).

#### **2.1.5.2. rhl QS sistemi**

Bu sistem ramnolipit sentezi için gerekli bir enzim olan ramnoziltransferazı kodlar ve *rhlAB* operonunun ifadesini düzenler. Ramnolipit sentezini kontrol ettiği için *rhl* sistemi adını almıştır. Rhl sistemi tarafından üretilen AHL molekülü ile *LasB* elastaz, *LasA* proteaz, piyosiyenin, alkali proteaz ve ramnolipit üretimleri düzenlenir (Gera ve Srivastava, 2006). Hem *las* hem de *rhl* sistemleri özgül sistemler olmalarına karşılık birbirleriyle hiyerarşik etkileşim içindedirler.



Şekil 2.2. *P. aeruginosa*'da "Quorum Sensing" sistemi (2)

### 2.1.6. Hücrelerarası iletişimin engellenmesi

Günümüzde bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için en yaygın olarak tercih edilen yöntem antibiyotik kullanımıdır. Antibiyotik kullanımı gibi klasik yöntemler; protein sentezi, DNA replikasyonu ve hücre duvarı sentezi gibi bakteriler için önemli işlemleri engelleyerek onları öldürerek yok etme temeline dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler bir süre sonra antibiyotiklere karşı dirençli popülasyonların ortaya çıkmasına, bu da, kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi, direncin yayılması ve ekonomik kayıplar ile sonuçlanmaktadır. Günümüzde hastalık yapan bakterilerin % 70'in den fazlası klinikte kullanılan mevcut antibiyotiklerden en az birine karşı dirençli hale gelmiştir. Dolayısıyla, yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar çok büyük önem kazanmıştır. Bu hedeflerden bir tanesi bakteriler arası iletişim (quorum sensing) mekanizmasının inhibe edilmesidir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bakteriler arası iletişim sisteminin bozulması durumunda bakterilerin koordineli davranamayacakları, konakta kolonize olma yeteneklerinin azalacağı, konağın bağışıklık sistemi tarafından kolayca yok edilebilecekleri ve bunun sonucunda başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya

koyamayacaklarını göstermektedir. Bakteriler arasındaki iletişimin bozulması üç temel yolla gerçekleştirilebilir, bunlardan ilki sinyal molekülünün bakteri tarafından üretiminin önlenmesi, ikincisi sinyal molekülünün hidrolizi, üçüncü ve en çok tercih edilen yol ise sinyalinin ilgili reseptör protein tarafından alınmasının önlenmesi amacıyla reseptör proteine karşı yarışan analog moleküllerin kullanılmasıdır. Gram-negatif bakterilerde bakteriyel iletişim sistemini bloke ettiği tespit edilen ilk bileşik, kırmızı bir deniz algisi olan *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonlardır. Furanonlardan sonra, sarımsak özütü, patulin, penisilik asit (PA), *p*-kumaric asit, tarçın yağı, sinemaldehit, tanik asit, vanilya ekstresi, salisilik asit, gibi bazı doğal bileşiklerinde Gram (-) bakterilerde iletişim sistemini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, bazı makrolid ve makrolid olmayan antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının Gram (-) bakterilerde açıl homoserin lakton aracılı bakteriyel iletişim (quorum sensing=QS) sistemini inhibe ettiği gözlenmiştir. Skindersoe ve arkadaşları, seftazidim ve siprofloksasin'in *P. aeruginosa*'da QS kontrollü genlerin ekspresyonlarını azalttığını rapor etmişlerdir. Tobramisin antibiyotığının de sub-MİK konsantrasyonlarının yine *P. aeruginosa*'da elastaz üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Garske ve ark., 2004, Ahmed ve ark., 2019).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Bakteriyel suşlar**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* ATCC27853 ve *P. aeruginosa* klinik suşları Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Besiyerleri**

1. Mueller Hinton Agar (MHA)
2. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHA)
3. Luria Bertani Agar (LBA) (Difco)
4. Luria Bertani Broth (LB) (Difco)

##### **3.1.3. Kimyasal maddeler**

1. Kristal Viyole (Merck)
2. Saf Etanol (Merck)
3. Sinamaldehyt (Sigma)
4. Tobramisin (Sigma)

##### **3.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri**

1. Etüv (N-Biotek)
2. Çalkalayıcı etüv (N-Biotek)
3. Otoklav (N-Biotek)
4. Vorteks (Heidolph Reax)
5. Santrifüj (Beckman Coulter)
6. Hassas terazi (Shimadzu)

7. Saf Su Cihazı (GFL)
8. Buzdolabı (Arçelik)
9. Derin Dondurucu ( Panasonic)
10. Manyetik karıştırıcı
11. pH metre (Hanna)
12. Petri kutusu (ISO LAB)
13. Otomatik pipetler
14. Polistiren deney tüpleri
15. Real-Time Cell Analyzer (RTCA) (ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA)

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) testi**

Antibakteriyel etkinin testinde, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yönetimini kullanarak organizmanın 18-24 saatlik Mueller Hinton Agar (MHA) plağındaki; tek düşmüş kolonilerden serum fizyolojik içerisinde McFarland 0.5 bulanıklığı ( $1 \times 10^8$  kob/ mL) standardına eşdeğer süspansiyon yapılarak inokulum hazırlanmıştır. Mikroplağın her kuyucuğa %0.5 oranında Tween 80 ilaveli 0.1 mL Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) konulmuştur. Ardından test edilecek olan örnekten ilk kuyucuğa 100 µL konulup uçucu yağların %3.125-%0.001; koruyucuların %50-%0.02 uçucu yağ ile koruyucu kombinasyonlarının %3.125-%0.001 aralığında ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılmıştır. Serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğerde hazırlanan bakteri süspansiyonu 1:10 oranında seyreltilerek,  $10^7$  kob/mL inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Hazırlanan inokulum, içerisinde test edilecek maddelerin bulunduğu tüm mikrodilasyon plakalarına (negatif kontrol hariç) 5µL ekilerek final konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  kob/mL olan inokulum yoğunluğu elde edilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 64-0.03125 µg/mL konsantrasyon aralığında meropenemin ikişer kat azalan seri seyreltileri; negatif kontrol olarak Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) ve bakteri süspansiyon kullanılmıştır. Mikrodilasyon plakaları  $35 \pm 2$  °C' de 16-20 saat inkube edilmiştir

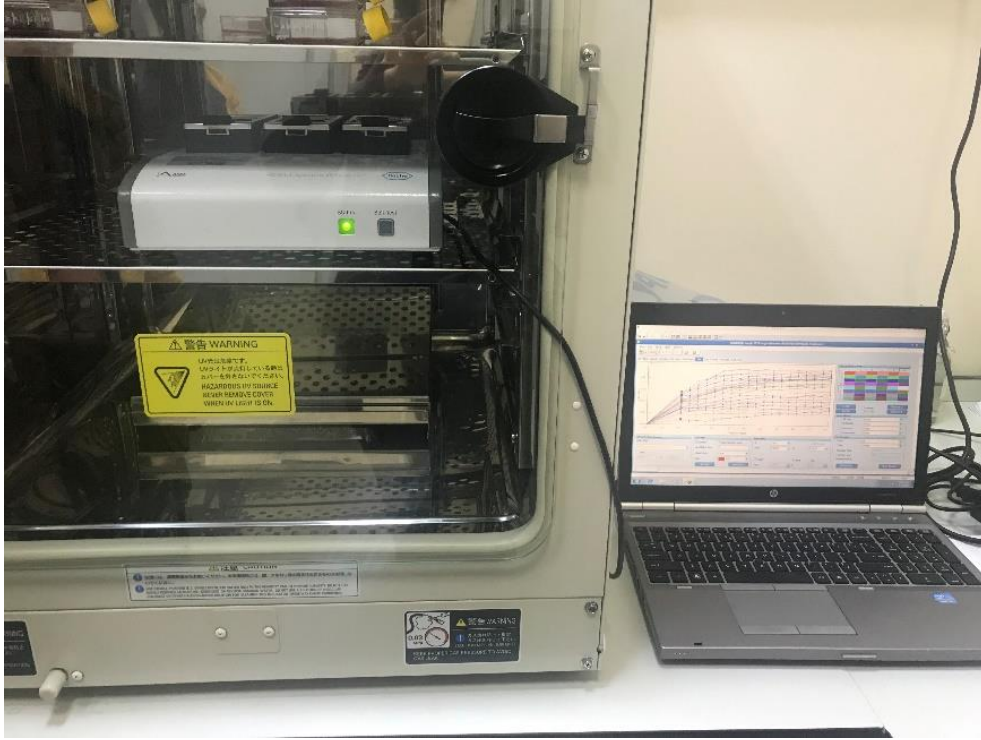
(CLSI,2012;Tepeve ark.,2006)

### 3.2.2. Kristal Viyole yöntemi ile Biyofilm testi

*P. aeruginosa* PA01 ve klinik *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm üretimini saptamak için yapılır. Çalkalayıcı etüvden alınan suşların taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1:100 oranında sulandırılmaları yapılmıştır. Her bir suşun sulandırımı vortekslendikten sonra her sulandırmadan 100'er µL 3 kuyucuğa dağıtılmış, üzerlerine etkileri test edilecek moleküller ilave edilmiştir. Plakalar 35°C de gece boyunca inkübe edilmek üzere etüve konulmuştur. İnkübasyon sonunda, plakalar 3 defa distile su ile yıkanmış, % 0.3'lük kristal viyole (CV) den 100 er mikrolitre (µL) kuyucuklara konmuş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından kuyucuklar 3 er kez distile su ile tekrar yıkanmıştır. Oluşan biyofilmin kantitasyonu için 200µL % 95 etil alkol eklenmiş biyofilm ile bileşik ouşturan kristal viyolenin çözülmesi sağlanmıştır. 5 dakika beklendikten sonra 550 nm'de optik okuyucuda absorbans değerleri okunmuştur ( Merrit ve ark., 2005).

### 3.2.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) xCELLigence Cihazı Kullanılarak *P. aeruginosa* Biyofilm Oluşumunun Gerçek Zamanlı Ölçümü

*P. aeruginosa* suşlarının biyofilm üretiminin gerçek zamanlı olarak izlenmesi "xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" (Real Time Cell Analysis System, RTCA DP) (ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. xCELLigence RTCA DP istasyonunda 3x16 kuyucuklu plaka sistemi bulunmaktadır (Resim 3.1). 16 kuyucuklu plakaların (E-plate) taban kısmına altın mikroelektrodlar entegre edilmiştir. xCELLigence RTCA DP cihazı elektriksel empedans teknolojisi ile kuyucuklar içindeki hücrelerin altın mikroelektrodlara bağlanıp bağlanmadığına dayanarak ölçüm yapan bir biyosensör sistemdir. Bu biyosensör, elektrodların elektronik empedansının ölçerek hücre sayısını dolaylı olarak tespit eder ve günlerce, istenilen aralıklarla bu ölçümü devam ettirerek gerçek zamanlı veriler oluşturur. Hücre sayısının artışı ve azalışına bağlı olarak sistemin elde ettiği veriler birimsiz olarak ifade edilen "hücre indeksi" (cell index; CI) değeri olarak hesaplanır ve cihazın yazılımı ile otomatik olarak değerlendirilir.



**Resim 3.1. xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Cihaz standart bir etüvün içine yerleştirilir ve etüvün dışında bulunan bir dizüstü bilgisayar tarafından kontrol edilir**

*P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşumunu xCELLigence cihazı ile izlemek için, 200  $\mu$ L *P. aeruginosa* kültürü E-plakaları içine konuldu. E-plakaları daha sonra xCELLigence cihazına yerleştirildi ve 37 ° C'de (% 5 CO<sub>2</sub> ile) 120 saat inkübe edildi. Hücre indeksi (CI) inkübasyon periyodu sırasında cihaz tarafından her 10 dakikada bir kaydedildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sinamaldehyd ve tobramisın için *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* klinik suşlarının MİK değerlerinin belirlenmesi

Bakteriyel iletişim sistemi inhibitör adaylarının bakterilerin üremesini etkilemeden, onların oluşturdukları virülans faktörlerinin sentezini ve biyofilm üretimini engellemeleri beklenmektedir. Bu nedenle Sinamaldehyd ve tobramisının *P. aeruginosa* PA01 suşu ve bir klinik izolatu (Kİ) öldürmeyen konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* ATCC27853 suşu referans suş olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Sinamaldehyd ve tobramisın için elde edilen MİK değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1. Tobramisin ve Sinamaldehydin MİK değerleri**

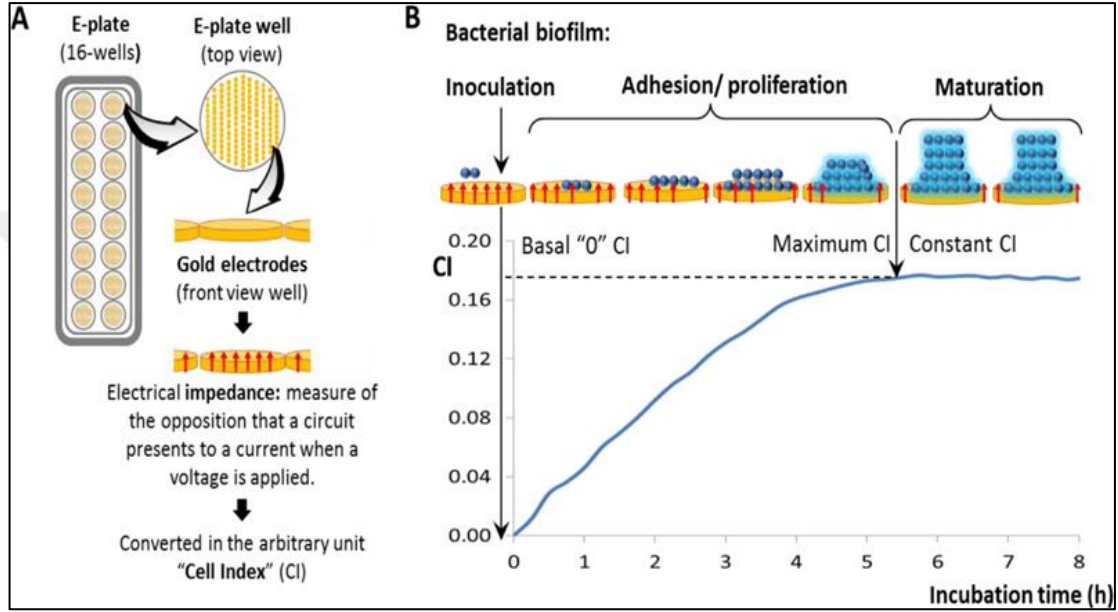
	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatu	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
Tobramisin	2	32	0.25
Sinamaldehyd	0.0315	0.0625	0.0315

Tablo 4.1. de görüldüğü üzere, *P. aeruginosa* PA01'in MİK değerleri tobramisın için 2 µg/mL, sinamaldehyd için 0.0315 µL/mL, *P. aeruginosa* klinik izolat'ın MİK değerleri tobramisın için 32 µg/mL, sinamaldehyd için 0.0625 µL/mL olarak tespit edilmiştir. Biyofilm çalışmalarında tobramisın ve sinamaldehyd MİK/2 olacak şekilde kullanılmıştır.

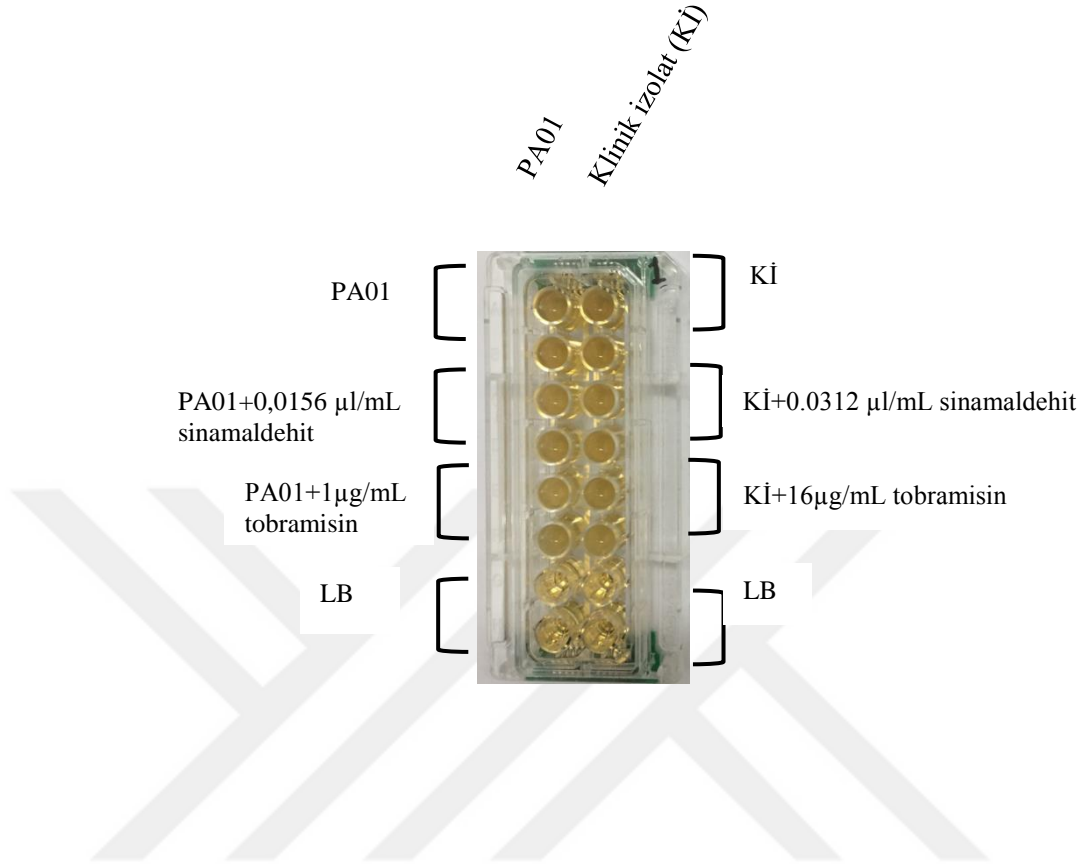
### 4.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) xCELLigence Cihazı Kullanılarak *P. aeruginosa* Biyofilm Oluşumunun Gerçek Zamanlı Ölçümü

Tobramisin ve sinamaldehytin *P. aeruginosa* PA01 ve bir klinik izolatu'nun biyofilm oluşturması üzerine etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence ile izlenmiştir. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence'in çalışma prensibi

Şekil 4.1.'te verilmiştir. *P. aeruginosa* PA01 ve bir klinik izolatin bir gece boyunca üretilen kültürlerinden E-plakalarının kuyucuklarına 200 µL konuldu ve üzerlerine 20 µL sinamaldehyd veya tobramisinin sub-MIK konsantrasyonları (MIC/ 2) ilave edildi. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence cihazına yerleştirilen E-plakaları 37°C' de 120 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 4.2).



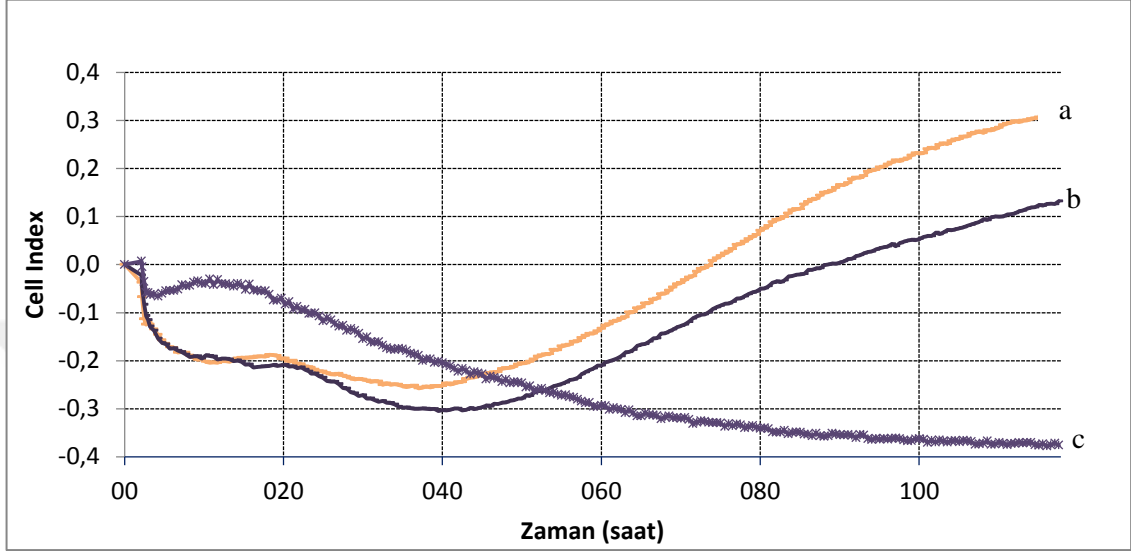
Şekil 4.1. xCELLigence cihazını kullanarak bakteriyel biyofilm oluşumunun izlenmesinin şematik çizimi. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163966>)



**Şekil 4.2. Tobramisin ve sinamaldehitin sub-MIC konsantrasyonlarının *P. aeruginosa* PA01'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin xCELLigence cihazı ile tespiti.**

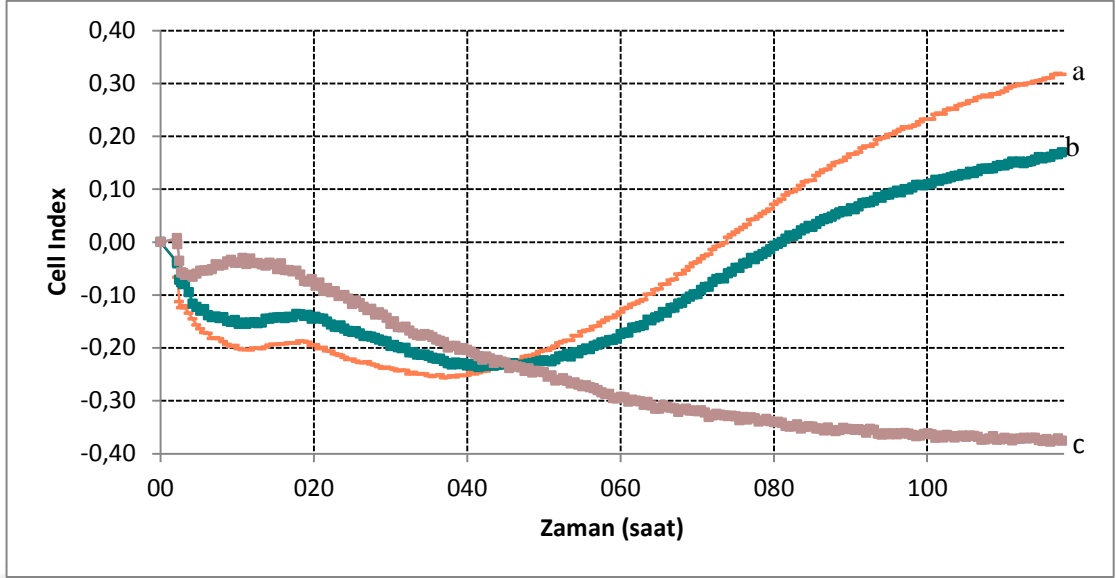
120 saatlik inkübasyon sonucunda sistemin elde ettiği veriler, cihazın yazılımı ile otomatik olarak değerlendirilip grafik haline dönüştürülmüştür. Şekil 4.3

Tobramisinin ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) *P. aeruginosa* PA01'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini göstermektedir.  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  tobramisin ilavesi biyofilm oluşumunda yaklaşık % 60'lık bir inhibisyona neden olmuştur.



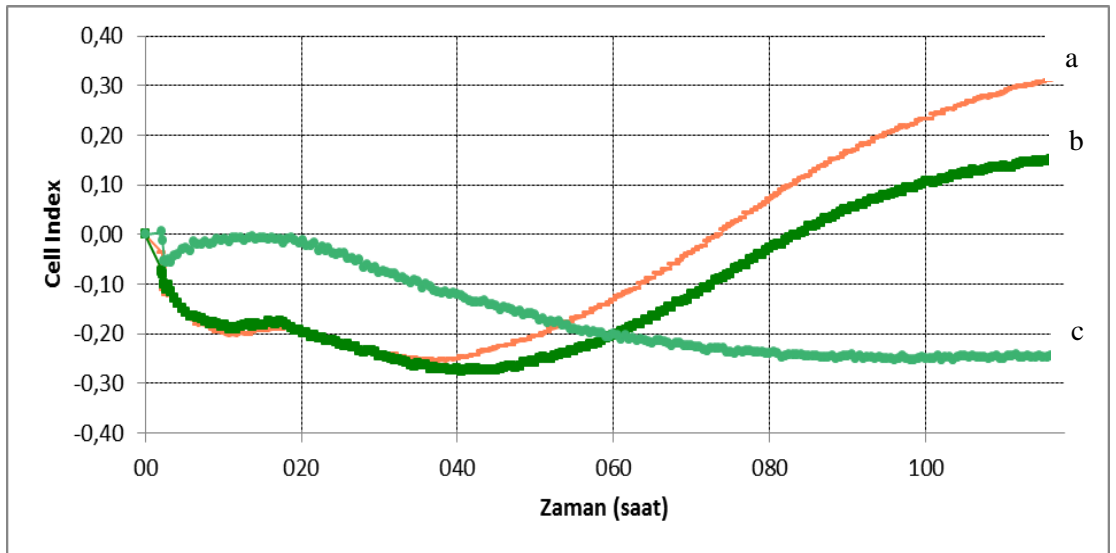
**Şekil 4.3. Tobramisinin Sub-MIC Konsantrasyonlarının PA01'in Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) PA01, b) PA01+tobramisin ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ), c) LB besiyeri (kontrol).**

Tobramisinin klinik izolatın biyofilm oluşturması üzerindeki etkisi ise Şekil 4.4.'da verilmiştir.  $16\mu\text{g}/\text{mL}$  (MIC/2) tobramisin biyofilm oluşumunu %46 inhibe ettiği görülmüştür.

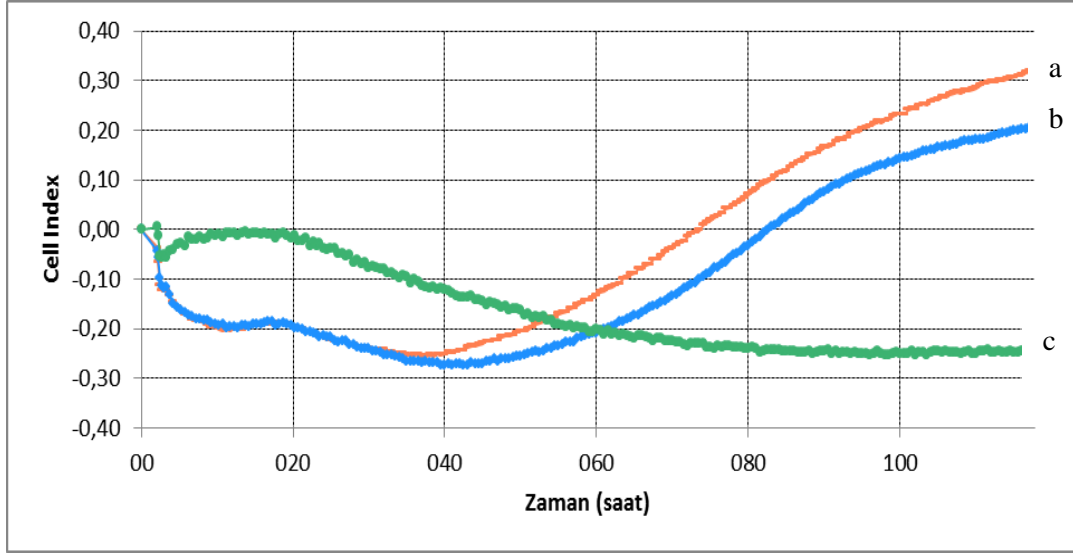


**Şekil 4.4. Tobramisin'in Sub-MIC Konsantrasyonlarının Klinik İzolatın Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat+16 µg/mL, c) LB besiyeri (kontrol).**

Sinamaldehitin sub-MIC konsantrasyonlarının *P. aeruginosa* PA01'in ve klinik izolatın biyofilm oluşumuna etkileri incelenmiş ve test edilen konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* PA01'de % 53, klinik izolatta ise %31 oranında inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6).

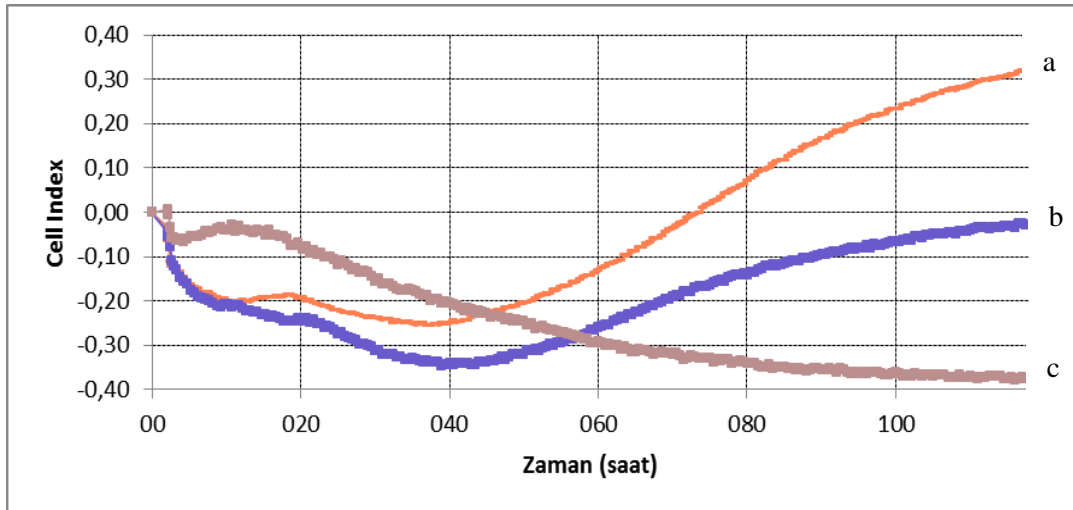


**Şekil 4.5. Sinamaldehyit'in Sub-MIC Konsantrasyonlarının, PA01'in Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) PA01, b) PA01+sinamaldehyit, c) LB besiyeri (kontrol)**

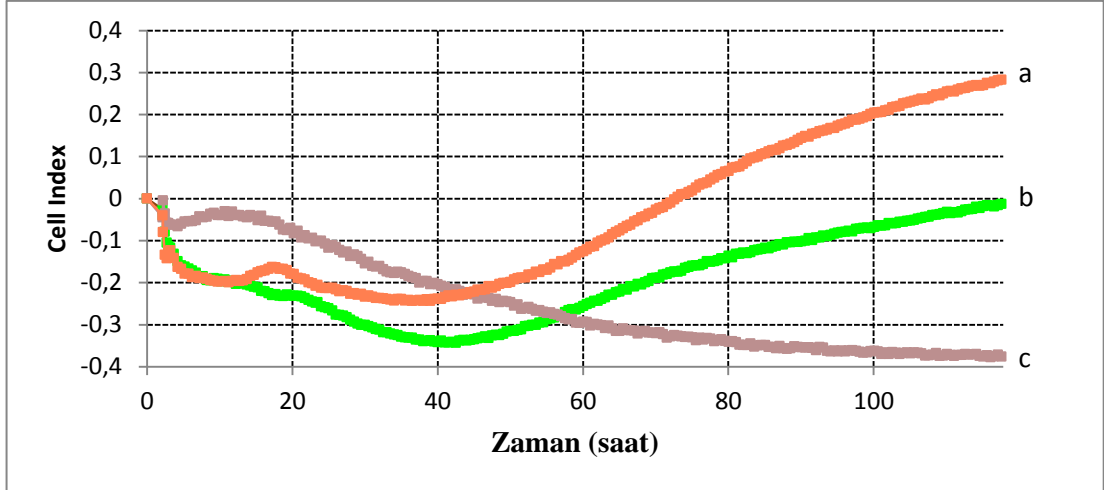


**Şekil 4.6. Sinamaldehitin Sub-MIC Konsantrasyonlarının, Klinik İzolatın Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat+sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol)**

Tobramisin ve sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonu ise hem PA01 hem de klinik izolatta biyofilm oluşumunu tamamen inhibe etmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8).



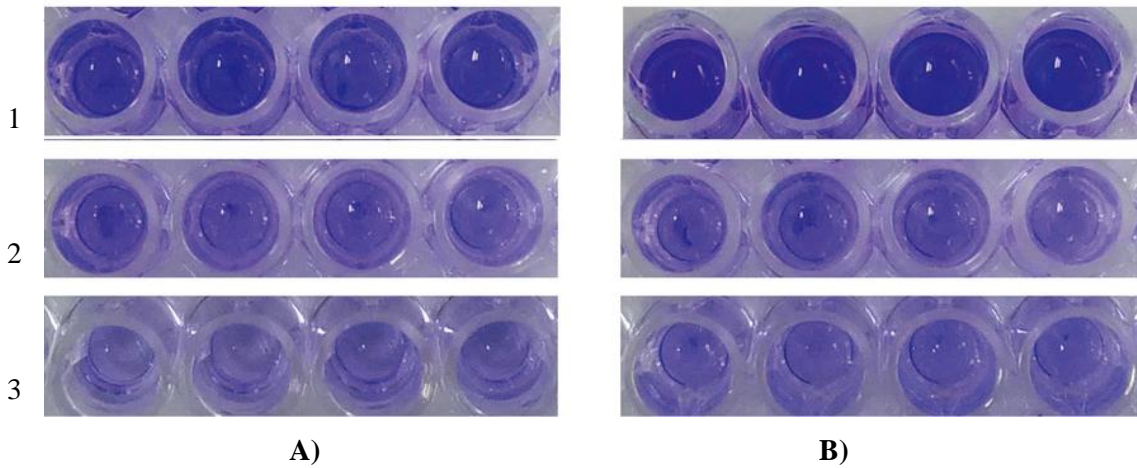
**Şekil 4.7. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonunun, PA01'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi. a)PA01, b) PA01+tobramisin (1 µg/mL)+ sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol).**



**Şekil 4.8. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonunun, klinik izolat'ın biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi. a) klinik izolat, b) klinik izolat + tobramisin (16 µg/mL) + sinamaldehit, c) LB besiyeri (kontrol).**

#### 4.3. Biyofilm Oluşumunun Kristal Viyole yöntemi ile Tespiti

Tobramisin ve sinamaldehitin *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatın biyofilm oluşturma kapasitesine etkileri biyofilm çalışmalarında çok sıklıkla kullanılan ve klasik bir yöntem olan kristal viyole ile boyama yöntemi ile test edilmiştir. Şekil 4.9. Tobramisin ve sinamaldehitin sub-MIC Konsantrasyonlarının, *P. aeruginosa* PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisini göstermektedir.



**Şekil 4.9. Tobramisin ve Sinamaldehitin Sub-MIC konsantrasyonlarının, *P. aeruginosa* PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisinin kristal viyole yöntemiyle tayini. A) 1- PA01 (kontrol), 2- PA01+ 0,0156 µL/mL sinamaldehit, 3- Klinik izolat +0,0312 µL/mL sinamaldehit, B) 1- PA01 (kontrol), 2- PA01+ 1 µg/mL tobramisin, 3- Klinik izolat + 16 µg/mL tobramisin.**

Sinamaldehyt, *P. aeruginosa* PA01'in biyofilm üretiminde % 45, klinik izolatin biyofilm üretiminde ise %32,4 inhibisyona neden olmuştur. Tobramisin ise biyofilm oluşumunu *P. aeruginosa* PA01'de %52, klinik izolatta % 42.6 azalttığı tespit edilmiştir. Sinamaldehyt ve tobramisin sub-MIC konsantrasyonlarının kombinasyonunun biyofilm üretimini *P. aeruginosa* PA01'de %75, klinik izolatta ise %70 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 4. 2. Tobramisin ve Sinamaldehytin Sub-MIC Konsantrasyonlarının, *P. aeruginosa* PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisi.**

	Sinamaldehyt (% inhibisyon)	Tobramisin (% inhibisyon)	Sinamaldehyt+tobramisin (% inhibisyon)
PA01	45	52	75
Klinik izolat	32,4	42,6	70

Tabloda verilen değerler üç ayrı deneyin ortalamasıdır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*P. aeruginosa*, insanlarda ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olan Gram negatif önemli bir patojendir. *P. aeruginosa*'nın başarılı bir fırsatçı patojen olmasının en önemli nedenleri arasında, oldukça geniş yelpazede ürettiği virülens faktörleri ve biyofilm oluşturma kabiliyeti sayılabilir. Biyofilmler canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilen ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilen yapılardır. Ayrıca, biyofilm oluşumu bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinde de çok önemli rol oynamaktadır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler planktonik bakteriye göre antibiyotiklere 1000 kat daha fazla direnç göstermekte ve dolayısıyla biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi oldukça güç olmaktadır. *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu bakteriyel iletişim sistemi aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar, *P. aeruginosa*'nın iletişim sisteminin bloke edilmesi durumunda virülens faktörlerinin üretiminin ve biyofilm oluşumunun büyük ölçüde engellendiğini göstermiştir (Hentzer ve Givskov, 2003; Donabedian, 2003).

Bakteriyel iletişim, birçok Gram(-) ve Gram (+) bakteri tarafından kullanılan hücreler arası haberleşme sistemidir. Uzun yıllar boyunca, hücreler arası iletişim yeteneğinin çok hücreli organizmalara özgü bir özellik olduğu düşünülmekteydi. Ancak günümüzde, bakteriler gibi tek hücreli canlıların da değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için oldukça karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanarak birbirleriyle koordineli olarak hareket edebilen topluluklar oldukları kabul edilmektedir. Bakteriler arasındaki iletişim sisteminin varlığı ilk olarak 1970'lerin başında Gram (-) bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* de biyoluminesens (biyoışım)'in ortak bir çalışma ile oluşturulduğunun keşfedilmesi ile ortaya çıktı. İlk defa *Vibrio fischeri*'de tanımlanmış olan bakteriyel iletişim sisteminin daha sonra *V. fischeri*'ye özgü bir özellik olmadığı birçok Gram (-) ve Gram (+) bakteri tarafından antibiyotik biosentezi, konjugasyon, önemli virülans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde yaygın olarak kullanıldığı keşfedilmiştir. Bakteriler birbirleriyle iletişim kurmak amacıyla, açıl-homoserin laktonlar (AHLs), otoindükleyici peptitler (AIPs) ve otoindükleyici-2 (AI-2) olmak üzere 3 tip sinyal molekülü kullanırlar. Bakteriler bu

sinyal molekülleri aracılığıyla ortamdaki hücre yoğunluğunu izlemekte ve yeterli yoğunluğa ulaştıkları anda da hedef gen ekspresyonlarını tetiklemektedirler. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi “quorum sensing (QS)” olarak adlandırılır ve bakteriye kendi hücre populasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenleme olanağı verir. Böylelikle, enfeksiyon oluşturabilecek yeterli çoğunluğa ulaşmaya kadar konağın bağışıklık sistemi tarafından bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturulur. Patojen bakterilerin birçoğunun virülans faktörlerinin üretimini QS aracılığı ile kontrol ettiğinin keşfedilmesi bu sistemi antimikrobiyal tedavi için cazip bir hedef haline getirmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, QS sisteminin bozulmasının bakterilerin virülans faktörlerinin üretiminde ve biyofilm oluşturma yeteneklerinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bugün, bu konuda sahip olduğumuz bilgilerin çoğu Gram (-) bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmalardan gelmektedir. *P. aeruginosa*'nın patogenezinde ürettiği elastaz, alkalın proteaz, hemolizin, siyanid, piyosiyenin ve ekzotoksin A gibi virülans faktörleri ve biyofilm oluşumu önemli rol oynar. Bu virülans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu QS sisteminin kontrolü altında gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalar, *P. aeruginosa*'nın iletişim sisteminin bloke edilmesi durumunda virülans faktörlerinin üretimin büyük ölçüde engellendiğini göstermiştir. Dolayısıyla bakterileri direk öldürmek yerine aralarındaki haberleşme sistemini bloke ederek bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altında tutmak, patojenlerle savaşta çok umut vaat eden yeni bir strateji olarak düşünülmektedir. Bakteriyel iletişimi bloke etmek amacıyla dizayn edilen ilaçlar “antipatojenik ilaçlar” adını almaktadır. Antipatojenik ilaçların etki mekanizması, bakterileri öldürmeden aralarındaki iletişimi bozarak patojenitelerini yok etme yoluyla etkisiz hale getirme temeline dayanmaktadır. Bakteriler arasındaki iletişimin bozulması üç temel yolla gerçekleştirilebilir, bunlardan ilki sinyal molekülünün bakteri tarafından üretiminin önlenmesi, ikincisi sinyal molekülünün hidrolizi, üçüncü ve en çok tercih edilen yol ise sinyalinin ilgili reseptör protein tarafından alınmasının önlenmesi amacıyla reseptör proteine karşı yarışan analog moleküllerin kullanılmasıdır. Gram-negatif bakterilerde bakteriyel iletişim sistemini bloke ettiği tespit edilen ilk bileşik, kırmızı bir deniz algi olan *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonlardır.

Furanonlardan sonra, sarımsak özütü, patulin, penisilik asit (PA), *p*-kumaric asit, sinemaldehit, tanik asit, vanilya ekstresi gibi bazı doğal bileşiklerinde Gram-negatif bakterilerde iletişim sistemini inhibe ettiği rapor edilmiştir ( Galloway ve ark., 2011). Ancak bu bileşiklerin çoğunun ya toksik olmaları ya da tolere edilebilir dozlarda etki gösterememeleri nedeniyle insan kullanımına çok uygun olmadıkları görülmüştür. Ancak halen bakteriler arası iletişimi inhibe etme yeteneğinde olan yeni doğal moleküllerin keşfi için yoğun çalışmalar devam etmektedir. Doğal bileşiklerin yanı sıra bakterilerin ürettiği sinyal molekülüne yapısal olarak benzeyen kimyasal olarak sentezlenmiş bazı analog moleküllerin bakteriyel iletişim sistemi üzerindeki inhibitor etkileri *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca, son zamanlarda bilgisayar destekli molekül dizaynı çalışmaları ile yapısal olarak sinyal moleküllerine benzerlik göstermeyen bazı moleküllerin de bakteriyel iletişim sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu moleküllerden bazılarının insanlar üzerindeki klinik denemeleri halen devam etmektedir. Klinik denemeleri devam eden moleküllerden biri, stafilokoklarda bakteriyel iletişimi inhibe ederek biyofilm oluşumu ve toksin üretimini engellediği tespit edilen RNAIII-inhibiting peptide (RIP) dir (Wolcott, 2008). RIP biyofilm kaynaklı kronik yaraların (diyabetik ayak ülserleri) tedavisinde başarı göstermiş ve klinikte kullanımı için geliştirilme aşamasında olan bir moleküldür. Diğer bir molekül ise laktoferrin'dir. Yapılan klinik çalışmalar laktoferrin'in de *P. aeruginosa* da biyofilm oluşumunu engellediğini ortaya koymuştur (Greenberg ve Banin, 2008). Laktoferrin, süt ve vücut sıvılarında doğal olarak bulunan, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir glikoproteindir. Laktoferrin'in kronik yara tedavisinde klinik denemeleri çok ümit vericidir. Bu moleküller antibiyotiklerle tedavisi hemen hemen imkansız olan biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yeni bir umut olmuştur. Ayrıca, Antipatojenik moleküllerin, klasik antibiyotiklerde olduğu gibi bakterilerin üremesini direk olarak etkilemedikleri için, dirençli bakterilerin gelişimine neden olmayacakları, konakta bulunan faydalı bakteri topluluklarını yok etmeyecekleri, enfeksiyonların tedavisinde hali hazırda kullanılan mevcut antibiyotiklerle birlikte kombine edilmeleri halinde antibiyotiklerin etkilerini artıracakları ve raf ömürlerini uzatacakları düşünülmektedir. Yapılan araştırmalardaki umut verici sonuçlar son 20 yıldır bu alana olan ilginin çok önemli oranda artmasına neden olmuştur. Ancak antibiyofilm etkisi olan yeni antipatojenik

moleküllerin keşfi için yapılan çalışmalarda kullanılan kristal viyole metodu gibi kolorimetrik esaslı klasik metotlardaki yüksek standart sapmalar nedeniyle güvenilirliğin düşük olması yeni moleküllerin tespitinde zorlukları da beraberinde getirmektedir.

Bu çalışmada; *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasını engelleyebilecek moleküllerin tespiti için dünyada henüz çok yeni bir yöntem olan “gerçek zamanlı elektriksel empedans yöntemi” kullanılmıştır. Bu yöntemle ölçüm yapmayı sağlayan Xcelligence “Gerçek zamanlı hücre analiz” sistemi (RTCA DP) herhangi bir işaretlemeye gerek olmaksızın gerçek zamanlı olarak hücreleri analiz edebilmektedir. Bu yöntemde yüzeyi altın mikroelektrotlarla kaplanmış mikropalakalar kullanılır. Bakteri hücrelerinin mikropalakaların tabanına tutunması ile elektrik akımına direnç olarak tanımlanan empedansta değişiklik meydana gelir. Empedanstaki artış yüzeye tutunan hücre sayısı ile orantılı olarak değişir. Ökaryotik ve yüzeye yapışabilen hücreler için geliştirilen bu sistemin prokaryotik hücreler tarafından oluşturulan biyofilm çalışmalarında kullanılabileceği, bakteriyel biyofilm oluşumunun gerçek zamanlı olarak izlenebileceği ve biyofilm oluşumunu engelleyebilecek maddelerin tespiti için kullanılabileceğini gösteren bazı bulgular mevcuttur. Xcelligence “Gerçek zamanlı hücre analiz” sisteminin en önemli yanı elde edilen veri kalitesinin diğer yöntemlerle elde edilemeyecek kadar yüksek olmasıdır.

Bu tez çalışmasında, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin prokaryotik biyofilm çalışmalarına uygun güvenilir bir metot olarak kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek için, daha önce çeşitli çalışmalarla sub-MIC konsantrasyonlarda bakteriyel iletişim sistemini inhibe ettiği kanıtlanmış olan tobramisin ve sinamaldehit molekülleri tek başlarına veya kombine edilerek kullanılmış ve elde edilen sonuçlar biyofilm çalışmalarında rutin olarak kullanılan kristal viyole metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Tobramisin, günümüzde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde standart olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Antibakteriyel etkisinin yanında sub-MIC konsantrasyonlarda *P. aeruginosa*'da virulens faktör üretimini engellediği rapor edilmiştir (Garske ve ark., 2004). Sinamaldehit ise tarçına aromasını ve kokusunu veren bir flavonoiddir. Antimikrobiyal ve antifungal özelliklere sahip bir moleküldür, ayrıca *P. aeruginosa*'da bakteriyel iletişim sistemi (quorum sensing) tarafından kontrol edilen

virülans faktörlerinin üretimini ve biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (Kalia ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında, tobramisin ve sinamaldehitin sub-MIC konsantrasyonlarının *P. aeruginosa* PA01 ve klinik suşunun biyofilm üretimine etkisinin incelenmesinde kullanılan xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ve klasik bir yöntem olan kristal viyole ile boyama metodu ile alınan sonuçlar birbirlerini destekler niteliktedir. Tobramisin'in biyofilm oluşumuna etkisi xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak analiz edildiğinde *P. aeruginosa* PA01 suşunda % 60, klinik izolatta ise %46'lık bir inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir. Aynı suşlarda kristal viyole metodu ile tobramisin'in biyofilm oluşumuna etkisi test edildiğinde PA01'de % 52, klinik izolatta % 42.6'lık düşüş saptanmıştır. Sinamaldehit ise xCELLigence kullanılarak yapılan biyofilm testinde PA01'de %53, klinik izolatta %31'lik azalmaya neden olmuştur, kristal viyole metodu ile biyofilm oluşumunda PA01'de % 45, klinik izolat'ta % 32.4 düşüş görülmüştür. Tobramisin ve sinamaldehitin *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumuna etkisi daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Tobramisin'in sub-MIC konsantrasyonlarının *P. aeruginosa*'da elastaz gibi bazı virülans faktörlerinin üretimini azalttığı gözlenmiştir (Garske ve ark., 2004). Topa ve arkadaşları (2018) yaptıkları bir çalışmada, sinamaldehitin *P. aeruginosa*'da swarming hareketi ve biyofilm oluşumunu engellediğini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, sinamaldehitin *P. aeruginosa*'da proteaz, elastaz, piyosyanin ve biyofilm oluşumunu engellediği ortaya konmuştur (Ahmed ve ark., 2019).

Sinamaldehit ile tobramisin kombine edilerek kullanıldığında ise biyofilm oluşumu tamamen inhibe olmuştur. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyum göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, bakteriyel iletişim inhibitörlerinin varlığında üretilen *P. aeruginosa* biyofilmlerinin antibiyotiklere karşı daha duyarlı olduklarını göstermiştir (Christensen ve ark., 2012). Christensen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada furononlar, yaban turpu ve ajoene (sarımsakta bulunan kükürt içeren bir uçucu yağ) gibi bakteriyel iletişim inhibitörleri ile tobramisini kombine olarak kullandıklarında, bu moleküllerin tobramisin'in antimikrobiyal etkisini arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden alınan

sonuçların, biyofilm çalışmalarında klasik bir yöntem olan kristal viyole metodu ile alınan sonuçlarla uyumlu olduğunu göstermektedir. Literatürde xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak yapılan prokaryotik biyofilm çalışmaları çok sınırlıdır. Şimdiye kadar yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda Gram pozitif bakterilerdeki biyofilm oluşumu incelenmiştir. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi plakları kullanılarak *Staphylococcus aureus* biyofilm oluşumu test edildiğinde, 18 saatlik bir inkübasyonun ardından stafilokokkal biyofilm oluşumu gözlenmiş ve bu sistemin bakteriyel biyofilm çalışmalarında kullanılabileceği önerilmiştir ( Junka ve ark., 2012). Gutiérrez ve arkadaşları (2016), xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemini kullanarak *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus mutants*'ta biyofilm oluşumunu incelemişler ve klasik yöntem olan kristal viyole ile boyama metodu ile karşılaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, kristal viyole yöntemi ile elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermiştir. *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak izleyen tek çalışma Van Duuren ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Van Duuren ve arkadaşları, *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunun dinamiğini xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemini kullanarak araştırmışlardır (van Duuren ve ark., 2017). Çalışmalarında bu sistemin ökaryotik hücrelerle çalışmalar için geliştirilmiş olmasına rağmen, prokaryotik biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumunun engellenmesi amacıyla kullanılacak moleküllerin tespitinde de son derece güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir.

Özet olarak, daha önce *P. aeruginosa* ile yapılmış olan sınırlı sayıdaki çalışma, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin hızlı ve güvenilir metot olduğunu ve sadece *P. aeruginosa* da değil diğer biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda da biyofilm oluşumu veya biyofilm oluşumunu engelleyen moleküllerin tespitinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız bu tez çalışmasından da elde ettiğimiz sonuçlar, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin prokaryotik biyofilm çalışmalarında başarıyla kullanılabileceğini, bakteriyel biyofilm çalışmalarında kullanılan kristal viyole metodu gibi kolorimetrik metotların zaman alıcı ve güvenilirliğinin düşük olması nedeniyle xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin kristal viyole yönteminden daha üstün olduğunu göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Adonizio, A.L., Downum, K., Bennett, B.C., Mathee, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105, 427-435.

Ahmed, S.A.K.S, Rudden, M., Smyth, T.J., Dooley, J.S.G., Marchant, R. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl Microbiol Biotech*, 2019, 103: 3521-3535.

Alcorn, J.F., Wright, J.R. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (29), 30871-30879.

Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad, E., Pei, C.P. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:417247.

Bjarnhold, T., Jensen, O.P., Bumolle, M., Hentzer, J.A., Haagenen, H. P. Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Hoiby, N., Givskov, M. *Microbiology*, 2005, 151, 373-383.

Bradbury, R.S., Roddam, L.F., Merritt, A., Reid, D.W., Champion, A.C. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59 (8), 881- 890.

Chanda, W., Thomson, P.J., Arshad, A.P., Xuefang G., Min, L., Wendong, W., Sainyugu, L., Anhong, N., Jing, C., Min, H., Mintao, Z. Combined effect of linolenic acid and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing. *Exp Therap Med*, 2017, 14: 4328-4338.

Christensen L.D., van Gennip, M., Jakobsen, T.H., Alhede, M., Hougen, H.P., Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M. Synergistic antibacterial efficacy of early combination treatment with tobramycin and quorum-sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* in an intraperitoneal foreign-body infection mouse model. *J Antimicrobiol Chemother*, 2012, 67, 1198-1206.

Christensen, GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*, 1982, 37, 318-26.

Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L. L, Britigan, B.E. *Pseudomonas pyocyanin* increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*, 1998, 66 (12), 5777-5784.

Denton M., Wilcox M.H.: Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 40:468-474.

Donabedian, H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*, 2003, 46: 207-214.

Doyle, T. B., Hawkins, A. C., Mccarter, L. L. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2004, 186 (19), 6341-6350.

Driscoll, J.A., Brody, S. L, Kollef, M.H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 2007, 67 (3), 351-368.

Edwards, R., Harding, K.G. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2004, 17 (2), 91-96.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A.

Finlayson, E. A., Brown, P.D. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, 2011, 60 (1), 24-32.

Galloway W.R.J.D., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R. (2011) Quorum sensing in gram-negative bacteria: Small molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**:28–67.

Gambello, M. J, Iglewski, B.H. Cloning and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lasr Gene, a Transcriptional Activator of Elastase Expression. *J Bacteriol*, 1991, 173 (9), 3000-3009.

Garske, L.A., Beatson, S.A., Leech, A.J., Walsh, S.L., Bell, S.C. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology*, 2004, 36(6), 571–575.

Gera, C., Srivastava, S. Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Current Science*, 2006, 90 (5), 666-676.

Greenberg, E.P., Banin E. Ironing out the biofilm problem: the role of iron in biofilm formation. In: Balaban N, ed. *Control of biofilm infections by signal manipulation*. 1st ed. Springer-Verlag; 2008, p:141-156.

Gutiérrez, D., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodríguez, A., García, P., Ruas-Madiedo, P. Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using and impedance-based technology. *PLOS ONE*, 2016, 11(10):e0163966.

Hamood, A.N., Griswold, J. Colmer, J. Characterization of elastase- deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1996, 64 (8), 3154-3160.

Han-Shin, K., Sang-Hoon, L., Youngjoo, B., Hee-Deung, P. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific Reports*, 2015, 5:8656.

Harrison-Balestra, C., Cazzaniga, A.L., Davis, S.C., Mertz, P.M. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surgery*, 2003, 29 (6), 631-635.

Hauser, A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7 (9), 654-665.

Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections, *J Clin Invest* , 2003, 112, 1300–1307.

Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M. R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol*, 2001, 183, 5395-5401.

Hobden, J.A. *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. DNA and Cell Biology, 2002, 21 (5-6), 391-396.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms, Int J Antimicrob Ag, 2010, 35, 322–332.

Jain, S., Ohman, D.E. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 2005, 73 (10), 6429-6436.

Junka, A.F., Janczura, A., Smutnicka, D., Maczynska, B., Secewicz, A., Nowicka, J., Bartoszewicz, M., Gosciniak, G. Use of the real time xCelligence system for puposes of medical microbiology. Pol J Microbiol, 2012, 61(3), 191-197.

Kalia, M., Yadav, V.K., Singh, P.K., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S.S., Agarwal, V. Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLOS ONE, 2015, 10(8):e0135495

Karatuna, O.Y., A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2008, 1 (38), 42-51.

Kipnis, E., Guery, B.P., Tournoy, A., Leroy, X., Robriquet, L., Fialdes, P. P. Nevriere R., Fourrier F. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. Shock, 2004, 21 (5), 444-451.

Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., Pechere, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol, 2000, 182 (21), 5990-5996.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, Jr.W.C. *Pseudomonas aeruginosa*. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, Philadelphia, Lippincott, 2006, p.316-323.

Lagournintzis, G., Christofidou, M., Ditnitracopoulos, G., Paliogianni, F. *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. Infect Immun, 2003, 71 (8), 4614-4622.

- Lau, G.W., Ran, H.M., Kong, F.S., Hassett, D.J., Mavrodi, D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*, 2004, 72 (7), 4275-4278.
- Liu, G.Y., Nizet, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 2009, 17 (9), 406-413.
- Livermore, D.M. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10 (Suppl 4):1-9.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Speert, D.P. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 1994, 62 (2), 596-605.
- Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., Thomashow, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2001, 183 (21), 6454-6465.
- Merrit, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*, 2005, 1B.1.1-1B.1.17.
- Meyer, J.M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 2000, 174 (3), 135-142.
- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., Holder, I.A. Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1996, 64 (2), 518-523.
- Mitov, I., Strateva, T., Markova, B. Prevalence of Virulence Genes among Bulgarian Nosocomial and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41 (3), 588-595.
- Nicas, T.I., Iglewski, B.H. The Contribution of Exoproducts to Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 1985, 31 (4), 387-392.

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 2002, 66 (2), 86-92.

Palleroni, N.J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology-Sgm*, 2003, 149, 1-7.

Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., Poole, K. Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2007, 189 (22), 8357-8360.

Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., Saier, M.H. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology-Sgm*, 2003, 149, 3051- 3072.

Remington, J.S., Schimpff, S.C. Please dont eat the salads. *New England Journal of Medicine*, 1981, 304 (7), 433-435.

Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*, 1998, 66, 43-51.

Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H.R., VandeWaa, J., Stevens, T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circulation Research*, 2004, 95 (2), 196- 203.

Schulert, G.S., Feltman, H., Rabin, S.D.P., Martin, C.G., Battle, S.E., Rello, J. Hauser A.R. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188 (11), 1695-1706.

Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Pattermore, P.K., Epton, M., Laing, R., Pearson, J. Chambers S.T. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Bmc Pulmonary Medicine*, 2010, 10.

Shannon, K.P., French, G.L. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53 (5), 818-825.

Shaver, C.M., Hauser, A.R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*, 2004, 72 (12), 6969-6977.

Smedley, J.G., Jewell, E., Roguskie, J., Horzempa, J., Syboldt, A., Stolz, D.B., Castric P. Influence of pilin glycosylation on *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilus function. *Infect Immun*, 2005, 73 (12), 7922-7931.

Speert, D.P., Campbell, M.E., Henry, D.A., Milner, R., Taha, F., Gravelle, A., Davidson A.G., Wong L.T., Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166 (7), 988-993.

Sutherland, I.W. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, 2001, 9 (5), 222-227.

Şen, Aylin, A.K.H. Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006, 4 (2), 2-13.

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H. F., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Pritchard, D. I. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun*, 1998, 66 (1), 36-42.

Topa, S.H., Subramoni, S., Palombo, E.A., Kingshott, P., Rice, S.A., Blackall, L.L. Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2018, 164: 1087-1097.

Toutain, C.M., Zegans, M.E., O'Toole, G.A. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2005, 187 (2), 771-777.

Truchado, P., Gil-Izquierdo, A., Tomas-Barberan, F., Allende, A. Inhibition by chestnut honey of *N*-ccyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila* J Agric Food Chem, 2009, 57 (23), 11186–11193.

Van Delden, C., Iglewski, B. H. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Emerg Infect Dis, 1998, 4 (4), 551-560.

Van Duuren, J.B.H., Müsken, M., Karge, B., Tomasch, J., Wittman, C., Hausler, S., Brönstrup, M. Use of single-frequency impedance spectroscopy to characterize the growth dynamics of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, 2017, 7:5223.

Wick, M.J., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. Analysis of the Structure- Function Relationship of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin-A. Mol Microbiol, 1990, 4 (4), 527-535.

Wienerkronish, J.P., Sakuma, T., Kudoh, I., Pittet, J.F., Frank, D., Dobbs, L., Vasil M.L., Matthay M.A. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. Journal of Applied Physiology, 1993, 75 (4), 1661-1669.

Wolcott, RD. Clinical wound healing using signal inhibitors. In: Balaban N, ed. Control of biofilm infections by signal manipulation. 1st ed. Springer-Verlag; 2008, p:157-170.

Woods, D.E. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Trends Microbiol, 2004, 12 (10), 437-439.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Seyit Ahmet	<b>Soyadı</b>	Çonker
<b>Doğum Yeri</b>	Amasya	<b>Doğum Tarihi</b>	29/04/1989
<b>Uyruğu</b>	TC.	<b>Tel</b>	05372496622
<b>E-mail</b>	ahmet_conker@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Sağlık Bilimleri Biyokimya	
<b>Lisans</b>	Karadeniz Teknik Fen Fakültesi Kimya	2014
<b>Lise</b>	Gözcübaba Lisesi	2008

### İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
<b>1</b>	Eğitim- Pedagojik Formasyon Sertifikası	Marmara Üniversitesi	01.2015
<b>2</b>	İSO Belgesi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	12.2012
<b>3</b>	OHSAS Belgesi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	12.2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

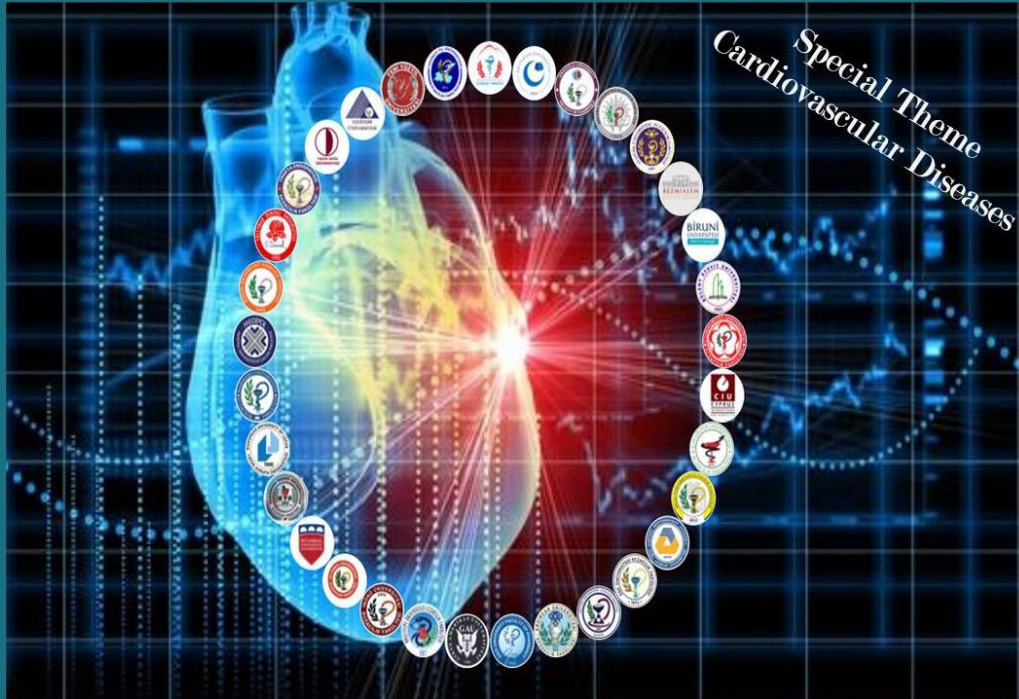
Program	Kullanma becerisi
Microsoft	İyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SYMPOSIUM ON  
DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT

'17

Organized by



OCTOBER 5-7, 2017  
ERZURUM - TÜRKİYE

[www.drd2017.org](http://www.drd2017.org)  
[drd2017@atauni.edu.tr](mailto:drd2017@atauni.edu.tr)

**3 rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development - DRD 2017**

**P41 - Use of Electronic Impedance Spectroscopy to Monitor Inhibition of Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa***

Seyit Ahmet Conker <sup>a</sup>, Erkan Rayaman <sup>b</sup>, Turgut Şekerler <sup>c</sup>, Gülgün Boşgelmez Tinaz <sup>a\*</sup>

*a Department of Pharmaceutical Basic Sciences, Faculty of Pharmacy, Marmara University, 34668, İstanbul, Turkey*

*b Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Marmara University, 34668, İstanbul, Turkey*

*c Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Marmara University, 34668, İstanbul, Turkey*

\*E-mail: gulgun.tinaz@marmara.edu.tr

Biofilm-associated infections are very difficult to treat with traditional antibiotics as bacteria are embedded in an extracellular matrix composed of exopolysaccharides and proteins that reduces the contact between bacteria and antibacterial agent. *Pseudomonas aeruginosa* is a opportunistic Gram-negative pathogen that causes chronic biofilm-associated infections in cystic fibrosis and wound patients. Biofilms formed within the human body may increase the resistance of pathogens to drug therapies a thousand-fold. The formation of bacterial biofilms poses serious challenges not only for antibiotic resistance, but also for implants and sterilizing surfaces. For the analysis of biofilms, different methods are available. But most of these methods are time-consuming and - like crystal violet staining - suffer from a high standard deviation. Recently, an impedance-based spectroscopy, initially developed for the study of adherent eukaryotic cells, has been used to monitor the formation of prokaryotic biofilms. This method allows monitoring biofilm formation very precisely with only little standard deviation. Since this is a very new technology, there is very little work available on the formation of *P. aeruginosa*

biofilms using electronic impedance. In the present study, inhibition of biofilm formation upon treatment of *P. aeruginosa* PA01 cultures with tobramycin and cinnamaldehyde was investigated in real time using impedance spectroscopy (xCELLigence Real Time Cell Analyzer). Our results demonstrated that sub-MIC concentrations of tobramycin and cinnamaldehyde inhibited biofilm formation by *P. aeruginosa* PA01 strain. Therefore, we suggest that impedance spectroscopy can be successfully used for the searching of compounds that interfere with the biofilm formation by *P. aeruginosa* and other clinically important bacteria.

**Keywords:** Quorum sensing, biofilm inhibition, *pseudomonas aeruginosa*, RTCA.

### References:

- 1 Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;(112): 1300-1307.
- 2 Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs. *Int J Med Microbiol.* 2006; (296):149-161.
3. Van Duuren, JBJH, Müseken M, Karge B, Tomasch J, Wittmann C, Häussler S, Brönstrup M. Use of single-frequency impedance spectroscopy to characterize the growth dynamics of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports.* 2017; 7 (5223):1-11.

October 05-07, 2017, ERZURUM-TÜRKİYE