



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL DERİ FLORASINDAN VE AKNE VULGARİS
HASTALARINDAN İZOLE EDİLMİŞ PROPIONIBACTERIUM
ACNES SUŞLARINDA VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN,
QUORUM SENSİNG(QS) SİSTEMİNİN VE QS
İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. ABDURRAHMAN SARMIŞ

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2014



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL DERİ FLORASINDAN VE AKNE VULGARİS
HASTALARINDAN İZOLE EDİLMİŞ PROPIONIBACTERIUM
ACNES SUŞLARINDA VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN,
QUORUM SENSİNG(QS) SİSTEMİNİN VE QS
İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. ABDURRAHMAN SARMIŞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. AYŞEGÜL KARAHASAN

İSTANBUL 2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamı yönlendiren, başından sonuna kadar tezimin her aşamasında emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, sabırla hep yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN'a, değerli hocalarım; anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR'e, Prof. Dr. Güner SÖYLETİR'e, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU'na, Prof. Dr. Nurver ÜLGER'e, Doç. Dr. Arzu İLKİ'ye, Uz.Dr. Burak AKSU'ya, tez sürecindeki değerli emekleri, ilgi ve alakası için üniversitemiz değerli hocalarından Prof. Dr. Gülgün TINAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince pek çok şey paylaştığım, tezimin her aşamasında bana destek olan tüm değerli asistan, biyolog, teknisyen ve bölümümüzde görev yapan hastane ve üniversite personeli arkadaşlarıma, Halk Sağlığı Bölümü'nde görev yapan Dr. Neşe Keskin'e ve Dr. Huriye Akça'ya teşekkürlerimi sunarım.

Kökenlerini kullandığımız MAR-YÇ-2008- 0232 protokol no 'lu "Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Propionobacterium acnes* kökenlerinin genotiplendirilmesi, genotip ile akne şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması" isimli projede görev alan herkese sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim süresince de hep yanımda olan aileme; hayat arkadaşım, en büyük desteğim, en iyi dostum, sevgili eşime ve doğumunu sabırsızlıkla beklediğimiz biricik yavrumuza sonsuz teşekkürler.

Dr. Abdurrahman SARMIŞ

07.09.2014

İstanbul

ÖZET

Pilosebász foliküllerin inflamatuvar bir hastalığı olan akne vulgaris, özellikle gençler ve genç erişkinler arasında sık görülen, en fazla yüz, boyun ve gövdenin üst kısmını tutan dermatolojik bir problemdir. Kişinin dış görünüşünü etkileyebilen ve skar bırakabilen akne, depresyon, kaygı ve sosyal inhibisyon gibi psikolojik sorunlara da neden olabilmektedir. Akne vulgaris oluşumunda önemli bir role sahip mikroorganizmalardan *Propionibacterium acnes* derinin normal florasında bulunmaktadır. Akne vulgaris tedavisinde uzun yıllardır topikal ve sistemik olarak antibiyotikler kullanılmaktadır. *Propionibacterium acnes* enfeksiyonlarının patogeneğinde biyofilm üretiminin rolü son birkaç yıldır üzerinde durulan konulardan biridir. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklere geçirgenlikte azalmayla ilişkili olduğu savunulmaktadır. Topikal ilaçlara direnç gelişmesi durumunda sistemik antibiyotik tedavisi gerekli olmakta, bu da hem ilaca bağılı yan etkileri arttırmakta hem de direnç gelişimini hızlandırmaktadır. Bu durum tedavi seçeneklerini hızla azaltmakta ve yeni arayışlara yönelilmektedir.

Çalışmamızda akne vulgaris hastalarından (n:7) ve kontrollerden (n:7) izole edilen *Propionibacterium acnes* kökenlerinde biyofilm, proteaz, beta hemoliz ve DNA' az gibi virulans faktörleri araştırılmıştır. Tüm kökenler biyofilm üretmiş, üç hasta kökeni hariç, tüm kökenler beta hemoliz ve proteaz aktivitesi göstermiştir. Kökenlerin hiçbirinde DNA' az aktivitesi saptanmamıştır. Bu sonuçlar araştırdığımız virulans faktörlerinin normal flora kökenleri ile akne yapan kökenler arasında bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur.

Ülkemizde Isparta ve yöresinde yetişen *Rosa damascena Mill'* den elde edilen esansiyel yağ ve absolut türevinin çalışma kökenleri üzerindeki antibakteriyel etkinliğin saptanması için disk difüzyon yöntemi ve Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) yöntemi kullanılmıştır. Absolut türevi %4'lük konsantrasyonda antibakteriyel etkinlik göstermesine rağmen, antibiyofilm etkinlik saptanmamıştır. Esansiyel gül yağında ise MİK değeri %2 iken, antibiyofilm etkinlik için MİK değeri %0.25 olarak saptamıştır. Sonuç olarak, bu dozda esansiyel gül yağının topikal uygulanması tek başına tedavi edici olabilir ve düşük dozda antibiyotiklerle kombine edilerek direnç gelişimi ve yan etkilerin açığa çıkması engellenebilir.

Anahtar Sözcükler: Akne vulgaris, *P. acnes*, antibiyotik, *Rosa damascena Mill*

ABSTRACT

Acne vulgaris, an inflammatory disease of pilosebaceous follicles, is a dermatological problem which is especially seen in young adults and effect face, cervical and upper side of trunk mostly. Acne formation may leave a scar, and cause psychological problems like depression, anxiety and social inhibition. *Propionibacterium acnes* as one of the microorganisms play a significant role in the pathogenesis of acne vulgaris is a member of normal skin flora. Antibiotics have been used systemically and topically for many years for acne vulgaris treatment. The role of biofilm production in the pathogenesis of *P.acnes* infections is one of the hot topics in the last few years. It is suggested that biofilm production is associated with decrease of permeability to antibiotics. In case of resistance to topical antibiotics, systemic antibiotic therapy is required causing increased side effects and the development of resistance to antibiotics. As a result the choices for antimicrobial treatment is being steadily decreased and there is a need for new options.

In our study, virulence factors like biofilm, protease, beta hemolysis and DNase have been analysed in *P.acnes* strains isolated from acne vulgaris patients (n:7), and healthy controls (n:7). All strains produced biofilm, all strains showed beta hemolysis and protease activity except three strains isolated from patients. DNase activity was not detected in any of the strain. Our results suggest that there is no difference of searched virulence factors between strains isolated from healthy controls and patients.

In order to detect antibacterial activity of essential oil and absolute derivatives obtained from *Rosa damascena Mill* which is cultivated in Isparta, disc diffusion method and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method were used to. We detected antibacterial activity for absolute derivative at 4% concentration but there was no antibiofilm activity. MIC value for essential rose oil was 2% at it also shows antibiofilm activity in 0.25% concentration. In conclusion, we may suggest that topical administration of essential rose oil may be therapeutic by itself or could be combined with antimicrobial in order to prevent resistance and adverse side effects.

Key words: Acne vulgaris, *Propionibacterium acnes*, antibiotic, *Rosa damascena Mill*

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İçindekiler.....	iv
Etik Kurul Onayı.....	vii
Kısaltma ve simgeler.....	viii
Tablolar ve şekiller.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2. Akne Vulgaris Etiyolojisi.....	5
2.3. Akne Patogenezi.....	6
2.4. Propionibacterium cinsi.....	11
2.4.1. <i>Propionibacterium acnes</i>	12
2.4.2. <i>P. acnes</i> ' in Morfolojik Özellikleri.....	14
2.4.3. <i>P. acnes</i> ' in Biyokimyasal Özellikleri.....	14
2.4.4. <i>P. acnes</i> ' in Virulans Faktörleri.....	14
2.4.4.1. Lipaz.....	15
2.4.4.2. Hiyaluronidaz.....	15
2.4.4.3. Endoglikoseramidaz.....	15
2.4.4.4. Siyalidaz/Nöraminidaz.....	15
2.4.4.5. Hemolizinler/Sitotoksinler.....	15
2.4.4.6. Glikokaliks.....	16
2.4.4.7. Isı Şok Proteinleri.....	16
2.4.4.8. Adezinler.....	16
2.4.4.9. Porfirinler.....	16
2.4.5. <i>P. acnes</i> ' in Antimikrobik Maddelere Direnci.....	17
2.4.5.1. <i>P. acnes</i> ' te Direnç Gelişimini Etkileyen Faktörler.....	17
2.4.5.2. <i>P. acnes</i> ' te Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları.....	18
2.4.6. <i>P. acnes</i> ' te Antimikrobiyal Direncin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	19

2.4.6.1. Agar Dilüsyon Yöntemi	19
2.4.6.2. Sıvıda Mikrodilüsyon Yöntemi	20
2.4.6.3.Sıvıda Makrodilüsyon Yöntemi	20
2.4.6.4. E Test.....	21
2.4.6.5. Spiral Gradient Endpoint System	21
2.4.6.6. Moleküler Çalışmalar	21
2.4.7. <i>P. acnes</i> tanımlanmasında kullanılan yöntemler	22
2.4.7.1. Morfolojik inceleme	22
2.4.7.2. Biyokimyasal Yöntemler	22
2.4.7.2.1.Konvansiyonel Yöntemler	22
2.4.7.2.2 Yan Otomatize ve Otomatize Sistemler	22
2.4.7.3. Kromatografik Teknikler	22
2.4.7.4. Moleküler Yöntemler	23
2.5. Gül yağı ve türevleri.....	24
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Besiyerleri	25
3.1.2 Standart Kökenler	25
3.1.3 Kimyasal Maddeler	25
3.1.4. Hazırlanan Solüsyonlar ve Besiyerleri.....	26
3.2. Araçlar ve Aygıtlar:.....	27
3.3. Yöntemler	28
3.3.1. Araştırma kökenleri.....	28
3.3.2. Biyofilm üretiminin saptanması.....	28
3.3.3. Gül yağı ve absolut türevinin anti bakteriyel etkinliğinin saptanması	29
3.3.4. Gül yağı ve absolut türevinin MİK değerlerinin saptanması.....	30
3.3.5. Gül yağı ve absolut türevinin Anti biyofilm etkinliğinin saptanması ...	31
3.3.6. <i>P. acnes</i> kökenlerinin proteaz aktivitesinin tespit edilmesi	32
3.3.7. <i>P. acnes</i> kökenlerinin beta hemoliz aktivitesinin araştırılması	33
3.3.8. <i>P. acnes</i> kökenlerinin DNA' az aktivitelerinin araştırılması	33
3.3.9. İstatiksel değerlendirme	34
4. BULGULAR	35

5. Tartışma ve Sonuç	39
KAYNAKLAR	45

Etik Kurul Onayı

MAR-YÇ-2008- 0232 protokol no 'lu "Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Propionobacterium acnes* kökenlerinin genotiplendirilmesi, genotip ile akne şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması" isimli proje için alınan 23.1.2009 tarih B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/17 no 'lu etik kurul raporu bulunmaktadır. Projemizde bu kökenler kullanılmıştır.

Kısaltma ve simgeler

AHL	: acyl-homoserin lacton
Ark.	: Arkadaşları
ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Brain Heart İnfüzyon
CAMP	: Christie-Atkins Petersen reaksiyonu
CLSI	: Clinical Laboratory Standarts Institute
DNA' az	: Deoksiribonükleaz
EPS	: Ekstraselüler polimerik madde
GLC	: Gaz-likit kromatografisi
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı likit kromatografi
HSP _s	: Isı şok proteinleri
Ltd	: Limited Şirketi
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
MLSB	: Makrolid linkozamid streptogramin B
MS	: Malditof Spektrofotometri
<i>P. acnes</i>	: <i>Propionibacterium acnes</i>
PBS	: Phosphate Buffer Solution Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
QS	: Quorum sensing
RCM	: Reinforced Clostridial Medium
SPSS	: Statistical Package for the Social Science

Tablolar ve şekiller

Tablolar

Tablo 1. <i>P. acnes</i> tarafından salgılanan ürünler*	10
Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı.....	35
Tablo 3. Hasta ve kontrol grubundaki yağ dağılımı	35
Tablo 4. <i>P. acnes</i> kökenlerinin virülans faktörleri	36
Tablo 5. Kökenlerin direnç profili.....	38

Şekiller

Şekil 1. <i>P. acnes</i> ' in folikül içinde birikmesi sonucu oluşan 3 farklı tipteki noninflamatuvar lezyon (19).	8
Şekil 2. Mikroplak yöntemiyle biyofilm pozitifliği.....	29
Şekil 3. Esansiyel gül yağı (Beyaz disk) ve absolut türevi (turuncu disk) için disk difüzyon testi	30
Şekil 4. Agar dilüsyon metodu yöntemiyle yapılan MİK testi A) İlgili gül yağı konsantrasyonunda dirençli iki farklı köken B) İlgili gül yağı türevi konsantrasyonunda duyarlı kökenlerde üreme gözlenmemesi.....	31
Şekil 5. Esansiyel gül yağının antibiyofilm etkinliği*.....	32
Şekil 6. %3'lük Skim milk agarda proteaz testi pozitifliği.....	32
Şekil 7. DNA' az testi. A) Pozitif kontrol; B) Negatif kökenler	33

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pilosebasöz foliküllerin inflamatuvar bir hastalığı olan akne vulgaris, özellikle gençler ve genç erişkinler arasında daha sık görülen, en fazla yüz, boyun ve gövdenin üst kısmını tutan dermatolojik bir hastalıktır. Kişinin dış görünüşünü etkileyebilen ve skar bırakabilen akne, bu etkileri nedeniyle depresyon, kaygı ve sosyal inhibisyon gibi psikolojik sorunlara da neden olabilmektedir (1,2).

Multi faktöriyel bir hastalık olan aknenin etiyolojisinde, anormal folliküler keratinizasyon, hormonal etkilere bağlı sebum sekresyonunda artış, mikrobiyal kolonizasyon ve inflamasyon yer almaktadır. Akne vulgaris oluşumunda önemli bir role sahip mikroorganizmalardan biri olan *Propionibacterium acnes* derinin normal florasında bulunmaktadır. (1)

Puberte ile birlikte androjenlerin artışıyla sebum üretimi artmakta ve aknenin öncü lezyonu olan komedonlar oluşmaktadır. Foliküler floranın baskın elemanı olan *P. acnes* tarafından salgılanan enzimler, doğrudan zedeleme etkisiyle ve konakta oluşan yanıtla aknenin inflamatuvar lezyonlarını oluşturmaktadır.

Akne vulgaris tedavisinde uzun yıllardır topikal ve sistemik olarak antibiyotikler kullanılmaktadır. Antibiyotikler *P. acnes*'i öldürerek ve *P. acnes*'in proinflamatuvar uyarıcı etkisini inhibe ederek etki göstermektedir. Bakteriyi öldürmeyen bir antibiyotik konsantrasyonu kemoatraktan molekülleri azaltarak, dolaylı olarak nötrofil yanıtını engelleyip klinik iyileşme sağlayabilir. *P. acnes* tedavisinde tetrasiklin, eritromisin ve diğer makrolidler, klindamisin, sulfanamidler ve kinolonlar gibi çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak

1970' lerden itibaren eritromisin, klindamisin, tetrasikline karşı ve çoklu antibiyotik direnci de bildirilmeye başlamıştır (3). Giderek artan antibiyotik direnci tedavi seçeneklerini hızla azaltmakta ve yeni arayışlar gerekli olmaktadır.

Mikroorganizmalar; canlı veya cansız herhangi bir yüzeye veya birbirlerine yapışarak, etraflarını saran ekstraselüler polimerik maddeden (EPS) bir matriks üretirler. Biyofilm olarak adlandırılan jel kıvamındaki bu matriksin içerisinde gömülü olarak yaşayarak dış etkenlerden korunurlar. Bakterilerin konak içerisinde buldukları ortama adapte olma özellikleri ve konak immün sistemine direnç geliştirerek yaşamlarını sürdürebilmeleri, antibakteriyel tedavide karşılaşılan önemli sorunlardan biridir. Biyofilmin; bakterinin adheransında, fagositozunda ve antibiyotiğe karşı direncinde önemli rolünün olduğu bilinmektedir.

Biyofilm bakterilerin üzerini kaplayan, yapı olarak polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler bir matrikstir. Bu matriks; bulunduğu ortama, tutunduğu canlı veya cansız yüzeye, mikroorganizmanın türüne göre değişiklikler göstermektedir. Mikroskopta incelendiğinde, içerisinde çok sayıda farklı yönlere ilerleyen kanalların bulunduğu, organik ve inorganik moleküllerden zengin bir yapı görülmektedir. Kanal oluşmasını ve kanalların açık kalmasını ramnolipidler sağlamaktadır. Bu kanallar oksijen ve besinlerin, biyofilm içerisine girerek daha derin bölgelere ulaşmasına ve atıkların uzaklaştırılmasına yardımcı olur.

Bakterinin yüzey proteinlerinin konağın ekstraselüler matriks proteinlerine yapışması ile adherans başlar, takiben bakteriler bir taraftan çoğalırken diğer taraftan da biyofilm üretirler. Ortamda bulunan glikoz ve karbon katabolitleri biyofilm üretimini pozitif yönde etkilemektedir. Biyofilmin oluşumu; bakterilerin Vander Walls güçleri ile geçici bağ kurmasıyla başlar ve yeterli besin maddesinin olduğu uygun ortamda canlı veya cansız yüzeyle

olan bağı kuvvetlendirir. Bakterinin bu ilk tutunma işleminde sayıları çoğaldıkça quorum sensing sisteminden gelen uyarılar artar ve biyofilm oluşturma yönünde farklılaşmalar oluşur.

Bakteriler, buldukları ortama uyum sağlama, korunma, direnç geliştirme gibi özelliklerini, aralarında kurdukları kompleks bir iletişim sistemi ile sağlar. Ürettikleri sinyal molekülleri (oto uyarıcı) aracılığı ile kendi yoğunluklarını sürekli olarak değerlendirir, bir eşik değere kadar buldukları konakta saklı kalır ve yoğunlukları belli bir eşik değeri aştıktan sonra bakteri tarafından kendi hedef proteinine bağlanarak değişik virülans faktörlerini salgılamaya başlarlar. Bu iletişim sistemine "Çevreyi Algılama (quorum sensing)" denilmektedir. QS sisteminde, hücre içine ve dışına kolayca diffüze olan sinyal molekülleri transkripsiyonel bir aktivatöre bağlanarak virülans faktörlerin ortaya çıkmasını sağlayan genlerin ekspresyonuna yol açar. QS sistemi gram negatif bakterilerde AHL (acyl-homoserin lacton) kullanan LuxI/LuxR tipi, gram pozitif bakterilerde küçük peptid ya da feromonları kullanan oligopeptid-2-komponentli tipi, gram negatif ve gram pozitif bakterilerin her ikisinde de bulunan LuxS, otouyarıcı 2(AI-2) hibrid tipi olarak sınıflandırılabilir. Bu sistemde üretilen sinyal molekülleri, hücre yoğunluğuna bağlı olarak düzenlenir ve bir eşik değere ulaşıncaya virülans faktörleri üretilmeye başlar. Bu faktörlerin üretilmesi ihtiyaca göredir ve sürekli değildir.

Akne vulgaris patogenezinde sebum üretiminin artışı pilasebasöz üniteadaki tıkanıklığın artmasına, *P. acnes* kökenleri için lipit içeriği yüksek anaerob çevre oluşmasına olanak sağlamaktadır. Bu durumun, quorum sensing ve oto indükleyici (AI)-2 moleküllerinin üretilmesi ile biyofilm üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir. (4)

P. acnes enfeksiyonlarının patogenezinde biyofilm üretiminin rolü son birkaç yıldır üzerinde durulan konulardan biridir. Holmberg ve ark. (5) protez enfeksiyonları ve sağlıklı kişilerden izole edilen *P. acnes*' lerin biyofilm

üretimini karşılaştırdıklarında sistemik enfeksiyonlarda biyofilm üretiminin önemini göstermişlerdir.

Burkhat ve ark ise (6) *P. acnes*' in piloseböz glandda biyofilm oluşturarak kalıcı olduğunu öne sürmüştür. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklere geçirgenlikte azalmayla ilişkili olduğu savunulmaktadır (7). Topikal ilaçlara direnç gelişmesi durumunda sistemik antibiyotik tedavisi gerekli olmakta, bu da hem ilaca bağlı yan etkileri arttırmakta hem de direnç gelişimini hızlandırmaktadır. Akne tedavisinde bazı bitkisel kaynaklı bileşikler kullanılmış ve bu bileşiklerin hem antibakteriyel aktiviteleri hem de anti-biyofilm aktiviteleri olduğu gösterilmiştir (8,9).

Çalışmamızda ülkemizde Isparta ve yöresinde yetişen *Rosa damascena Mill* den elde edilen esansiyel yağ ve absolut kullanılmıştır. Bu ürünlerin parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra bazı bakteriler üzerine antibakteriyel etkinliklerinin olduğu gösterilmiştir (10). *P. acnes* ile ilgili antibiyotik dışı maddelerin kullanımıyla ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Söz konusu bileşiklerin *P. acnes* üzerinde antibakteriyel etkisinin ve /veya virulans faktörlerinin üretimini engelleyici etkisinin olup olmadığı araştırılarak tedavide ucuz ve kolay elde edilen bir alternatif üretilmesinde yol gösterecek bir çalışma yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Akne vulgaris, pilasebasöz ünitenin multifaktöryel bir hastalığıdır. Kliniği hafif komedonal formdan ağır lezyonlara kadar değişkenlik gösterir. Her yaştaki kişiyi etkilemekle beraber primer olarak adölesan dönemde görülmektedir. Dermatolojik bir problem olmasının yanı sıra psikolojik ve sosyal açıdan ciddi etkiler oluşturabilmektedir (1,2).

2.1. Epidemiyoloji

Akne vulgaris, 12–24 yaşları arasında görülen pilosebasöz foliküllerin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır, çoğunlukla 25 yaşından önce kendiliğinden düzelir, ancak olguların %5'inde, özellikle kadınlarda 30'lu-40'lı yaşlara kadar sürebilir. Her iki cinsten eşit sıklıkla görülmekle beraber erkeklerde daha ağır seyretmektedir (11,12). Aknelerin çoğu pleomorfik olup; komedon, papül, püstül, kist, nodül lezyonları şeklinde bulunabilir, çukurlar veya hipertrofik skarlar gelişebilir. Özellikle yüz, boyun ve üst gövdeyi tutmaktadır (13).

2.2. Akne Vulgaris Etiyolojisi

Akne vulgarisin etiyolojisinde dört ana faktör yer almaktadır;

- 1- Anormal foliküler keratinizasyon
- 2- Sebum sekresyonunda artış
- 3- Mikrobiyal, özellikle *P. acnes* kolonizasyonu
- 4- İnflamasyon

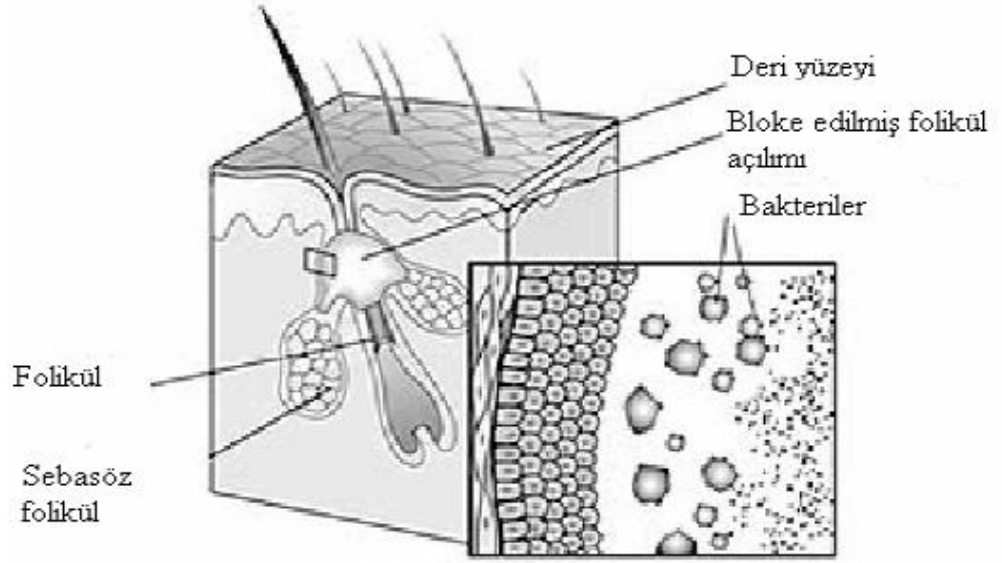
Bunun yanı sıra genetik faktörler de önemli rol oynamaktadır. Israrcı ve şiddetli aknelere olan hastaların soy geçmişleri sorgulandığında, yakın akrabalarında da benzer şekilde şiddetli aknenin bulunduğu görülmüştür. Bu

kişilerde akne vulgaris erken yaşlarda ortaya çıkmakta ve tedaviye daha fazla direnç göstermektedir (14). Diğer yandan XYY genotipine sahip kişilerde daha ağır nodülokistik akne vulgaris gelişebilmektedir (15).

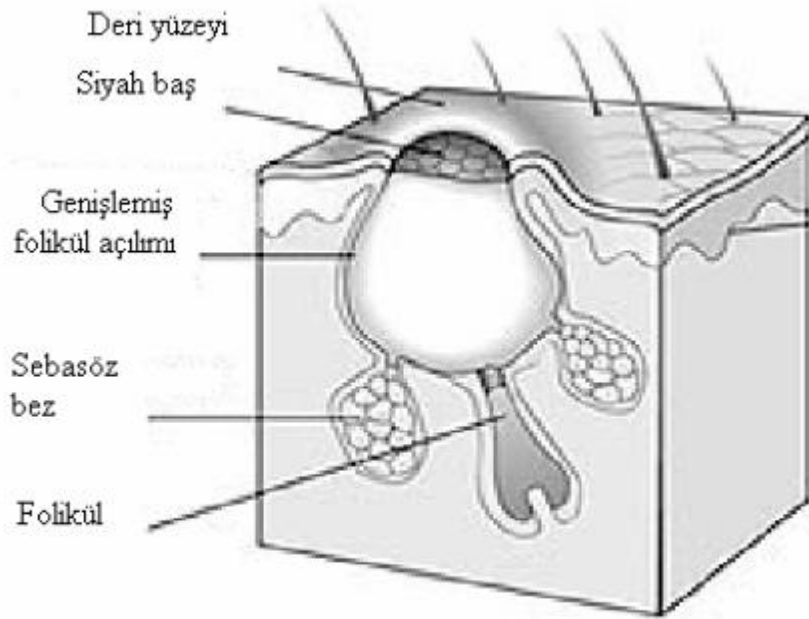
2.3. Akne Patogenezi

Piloseböz ünite, bir kıl folikülü ve ona açılan sebese bezden oluşmaktadır. Bu yapı çok katlı yassı epitel ile döşeli infundibulum denen bölge ile deri yüzeyine açılır. Seböz bezler salgılanan hormonlarla kontrol edilmektedir. Ergenliğe geçişle birlikte artan hormonların etkisiyle piloseböz ünite de değişiklikler; foliküler keratinizasyon ve sebum sekresyonunda artış gözlenmektedir (16,17).

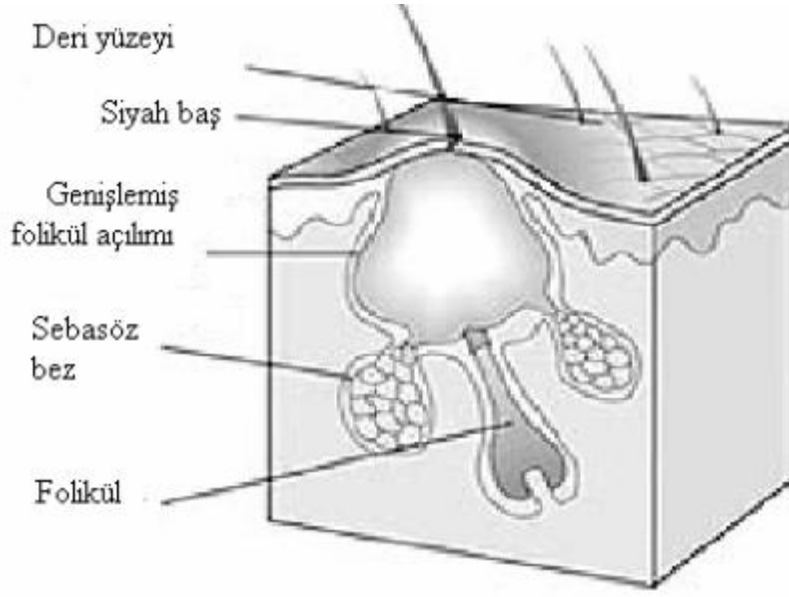
Akne gelişiminde ilk adımı oluşturan mikrokomedonlar, infundibulum proksimalinin üst tabakasının keratinizasyonu ile başlamakta, daha sonra açık ve kapalı komedon halini almaktadır. Tanımlamak gerekirse komedonlar (tıkaçlar); normalde folikül lümenine dökülen korneositlerin folikül ağzında birikmesiyle oluşturdukları hiperkerositlerdir. Yapışkan bir özelliğe sahip olan bu yapıda aynı zamanda keratinozomlar, hücre zarları, epiderm lipitleri ve intraselüler sementinler de bulunmaktadır. İfundibulum distalinde herhangi bir madde birikmesi söz konusu olmayıp, proksimaldeki komedon ise gittikçe büyümektedir. Komedonun büyümesiyle komedon duvarında gerilme, folikül kanalında yırtılma oluşmakta, immunjenik özelliğe sahip keratojenik ve seboreik içerik ortama saçılmaktadır (1,18).



Mikrokomedo



Açık Komedon (Siyah baş)



Kapalı Komedon (Beyaz baş)

Şekil 1. *P. acnes*' in folikül içinde birikmesi sonucu oluşan 3 farklı tipteki noninflamatuvar lezyon (19).

Folikül içeriğinin dermise geçmesi, var olan inflamasyonu arttırmakta, yabancı cisim yanıtı oluşturmakta ve kliniğe farklı şiddette akne şeklinde yansımaktadır. İnflamasyonun ilk belirtileri foliküler eritemli papüller şeklinde gözlenmektedir. Daha sonra püstüler yapılar ortaya çıkmakta, yağ bezlerinin çok irileştiği ve nodül halini aldığı kistik akne tipleri oluşmaktadır (16).

Komedon oluşumunda linoleik asit eksikliğinin önemli olduğu saptanmıştır. Sebumdaki linoleik asit eksikliği epitel farklılaşmasını engellemekte ve hiperkeratinizasyona yol açmaktadır (20). Başka bir çalışmada ise sitokinlerden IL-1 α 'nın infundubulumdaki keratinositlerden hiperkornifikasyon yaptığı tespit edilmiştir (21).

Akne oluşumunda rol alan faktörlerin bir diğeri de androjenlerdir. Genellikle ergenlik dönemiyle birlikte artan androjen seviyesi sebum sekresyonuna, dolayısı ile akne oluşumuna yol açmaktadır (22) Androjen miktarından ziyade, reseptörlerin aknenin oluşumunda önemli olduğu görülmüştür (23).

Sebasöz folikülün normal florasında patojen olmayan bakteriler, lipofilik mayalar ve kıl folikül akarı (mite-*Demodex folliculorum*) bulunmaktadır. Sebum üretimindeki artış, derinin normal flora elemanlarından *P. acnes*' in çoğalabilmesi için gerekli ortamı oluşturmaktadır (24).

P. acnes yüz, göğüs ve sırtta, sebumdan zengin foliküllerde kolonize olmaktadır. Foliküle yerleşen *P.acnes* ürettiği lipaz enzimi ile trigliseridleri serbest yağ asitlerine hidrolize etmektedir. Ardından aknenin öncü molekülü komedon oluşmakta ve inflamasyon gelişmektedir. Aynı zamanda *P. acnes*' in salgıladığı kemotaktik sitokinler ile kompleman sistemi aktive olmakta ve nötrofillerin komedonun olduğu bölgeye doğru çekilmesi sağlanmaktadır (25,26).

P. acnes fagositoza direnç gösterebilmekte, makrofajların içinde uzun süre canlı kalabilmekte ve immun reaksiyonları tetiklemektedirler. Ayrıca *in vivo* koşullarda düşük oksidasyon redüksiyon potansiyelinde uzun zaman aralığında canlılıklarını koruyabilmektedirler. Bu durumda insan dokularında uzun süre bulunarak metabolik ürünleriyle (asetat, propionat, indol, porfirin) dokulara zarar verebilmektedirler (27). *P. acnes* tarafından salgılanan ürünler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *P. acnes* tarafından salgılanan ürünler*

Ürün	Substrat	Etkisi
Lipaz	Trigiliseritler	Besin, serbest yağ asidi üretimi, adherens
Fosfolipaz C	Fosfolipidler	Konak hücre zar fonksiyonunu bozmak
Proteinaz	Kollajen, keratin	Besin, Kompleman aktivasyonu, kemotaksis, doku invazyonu
Hyaluronidaz, nörominidaz	Mukopolisakkaritler	Doku invazyonu
Asit fosfataz	Şeker, fosfat	Besin
Bakteriyosin		Antagonistik etki

* 28 no'lu kaynaktan alınmıştır

Serolojik aglütinasyon testleriyle ve hücre duvarı şekerlerinin analiziyle fenotipik olarak iki tip *P.acnes* (Tip I ve Tip II) tanımlanmıştır (29). Sağlıklı kişilerdeki yaygın görülen serobiyotipler IB1, IB3, IB4 ve IIB2' dir (30).

Propionibacterium acnes'in DNA dizisinin tamamı Brüggemann ve arkadaşları (31) tarafından tanımlanmıştır. Bakteri DNA'sının toplam 2333 gen bölgesine sahip olduğu, genler tarafından kodlanan ürünlerin çoğunu; sialidazlar, nörominidazlar, endoglikoseramidazlar ve lipaz gibi faktörlerin oluşturduğu saptanmıştır. Üretilen bu faktörlerin ve hücre duvar yüzeyinde bulunan proteinlerin akne oluşumuna neden olan inflamasyonu tetiklediği belirtilmiştir.

Bakteri DNA dizisi tanımlandıktan sonra serotiplere göre ayrılmış kökenlerin 16S rRNA bölgesinin dizi analizi yapıldığında kökenler arasında tam bir homoloji saptanmıştır. Ancak, onarımla ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen RecA proteinini kodlayan *recA* geninin dizi analizi yapıldığında, iki tipin tamamen farklı iki filogenetik grupta yer aldıkları gözlenmiştir. Ayrıca moleküler çalışmalarda Tip I de yer alan kökenlerin de iki farklı grup özellikleri gösterdikleri (Tip IA ve Tip IB) saptanmıştır (32, 33). Tip I ve II'den yüzey özellikleri bakımından ve hücre duvar yapısından farklılık sergileyen bir başka genotip, Tip III tanımlanmıştır. Aynı araştırmacıların yaptıkları ileri çalışmalarda *P.acnes* Tip III kökenlerinin farklı *recA* gen dizisine sahip oldukları gösterilmiştir.

2.4. Propionibacterium cinsi

Eskiden *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium avidum* ve *Corynebacterium granulosum* adları ile anılan türler anaerob *Corynebacterium*'lar içerisinde incelenmekte iken bugün, bol miktarda propionik asit oluşturmaları ve hücre çeperlerindeki farklılıkları nedeni ile *Corynebacterium*'lardan ayrılarak *Propionibacterium* cinsi içine dahil edilmişlerdir (34).

Propionibacterium cinsi vücudun her yerinde bulunabilmektedir. *Propionibacterium*'lar genellikle nonpatojenik bakterilerdir bununla birlikte, kan kültürü ve vücut sıvılarında kontaminant olarak üreyebilirler ve özellikle akne vulgaris olmak üzere birçok enfeksiyona da yol açabilirler (35).

Propionibacterium cinsindeki bakteriler habitatlarına göre iki farklı grupta toplanırlar. İnsanda bulunan ve 'acnes grubu' dahil olan bakteriler ile süt ve süt ürünlerinden izole edilen 'klasik grup'tur. *Propionibacterium* cinsinde yer alan türler; *P. acidipropionici*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P.*

avidum, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum*, *P. thoenii*, *P. sp.*'dir (36).

Propionibakteriler geç üreyen, sporsuz, gram pozitif, anaerobik bakterilerdir. Şekilleri omak şeklinde veya dallanmış, tek tek, çiftler halinde veya grup halinde görülebirlirler. Glukozdan genellikle propionik asit, laktik asit ve asetik asit üretirler (35).

Gram pozitif hücre duvarları, bakteriye yapısal stabilite kazandırarak, kuruluğa, osmotik basınca ve mekanik strese karşı dirençli olmalarını sağlar (37).

2.4.1. *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium cinsinde bulunan *P. acnes* anaerop ya da aerotoleran olabilen hareketsiz sporsuz, Gram pozitif, pleomorfik bir omaktır (38). Bu bakteri, deri, ağız, nazofarenks, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemin normal florasında yer almaktadır. Deri mikrobiyotasının baskın üyesi olması ve kıl foliküllerinin sebasöz bezlerine yerleşmesi dolayısı ile *P. acnes* kan kültürlerinden sıklıkla kontaminant olarak üretilmektedir. Bununla birlikte nadiren endokarditlere, santral sinir sistemi şant enfeksiyonlarına ve diğere enfeksiyonlara yol açabilmektedirler (39).

Bazı kökenler anaerop kanlı agarda dar hemoliz zonu yapabilmektedir. *P. acnes* kökenleri koyun ve insan eritrositleri ile ko-hemolitik reaksiyon meydana getirebilmektedirler. Bu reaksiyon, ilk defa 1944 yılında gösterilen Christie- Atkins Petersen (CAMP) reaksiyonu ile aynıdır (40).

P. acnes genomu çok sayıda farklı metabolik ürünleri kodlar. Metabolik analizler *P. acnes'* in anaerobik şartlarda üreyebilmesinin yanında mikroaerobik şartlarda da üreyebildiğini göstermiştir. Oksidatif fosforilasyon, Krebs çemberi, Embden Meyerhof yolu ve pentoz fosfat yolunun gerçekleşmesi metabolik ihtiyaçlarının başında gelmektedir. İn vitro olarak anaerobik ortamda *P. acnes*, glukoz, gliserol, riboz, fruktoz, mannoz ve N-asetilglukozamin varlığında üreyebilmekte, bakteri adolesan ve erişkin derisinin kıl folikülü ve sebasöz bez içeren pilosebasöz biriminde gereğinden fazla olan yağ ve sebümü hazmetmek için çeşitli lipazlar üretmektedir. *P. acnes*, ismini aldığı propionik asit ve kısa yağ asiti zincirleri gibi ürünlerini kullanarak enerji üretimi için fermentasyon yapabilir. Ayrıca, nitrat redüktaz, dimetil sulfoksit, fumarat redüktaz gibi enzimleri kullanarak, anaerobik yollardan enerji üretebilmektedir (35).

Propionibacterium cinsi içerisinde gen sekansı tamamen belirlenmiş olan tür *P.acnes'in* KPA171202 kökenidir. Genom, 2.560.265 baz çiftlik yaklaşık 2333 geni kodlayan tek bir dairesel kromozomdan oluşur (41).

Birçok kaynak *P. acnes'i* anaerop bakteri olarak bildirmesine rağmen, deride kolonize olan propionibakteriler zorunlu anaerop değildir ve primer izolasyonda anaerobik ortam kullanılmasına rağmen, tüm türler oksijen varlığını tolere edebilirler. Ağarda inkübasyondan sonra; koloniler kubbe şekilli görülürler ve renkleri bejden pembeye döner. İnsan derisindeki türler sınırlı oranda olduğu için kullanılan biyokimyasal testlerin sayısı da sınırlıdır. Ancak bu testler, karmaşık olan bakteriyofaj ve moleküler tiplendirme tekniklerine karşın rutinde kullanılmaktadır. Moleküler tiplendirme tekniklerinin uygulanması, *P. acnes'in* sert hücre duvarını eritme aşamasında yaşanan sıkıntıdan dolayı güçtür (37).

2.4.2. *P. acnes*' in Morfolojik Özellikleri

Gram pozitif ve hareketsiz bakterilerdir. Primer kültürlerinden hazırlanan Gram boyamalarında tipik korineformlar gibi düzensiz ve kısa dallanmalar şeklinde görülürler (37). Genç kültürlerin kanlı agardan yapılan boyamalarında, Gram pozitif çomaklar, kokoid formda gözükebilmektedirler. Yaşlı kültürden yapılan preperasyonlarda ise Gram negatif boyanabildikleri unutulmamalıdır. *P. acnes* kolonileri anaerop kanlı agarda 1-2 mm çapında, yuvarlak, bombeli ve opak görünürler (39).

2.4.3. *P. acnes*' in Biyokimyasal Özellikleri

P. acnes indol pozitifliği ile diğer propionibakterilerden ayrılmaktadır. Ayrıca nitratı nitrite indirger ve katalaz aktivitesi pozitifdir. *P. acnes* karbonhidratlardan yalnızca glukozu fermente edebilmektedir. Son ürün olarak başlıca propionik asit ve asetik asit oluşturmaktadır. Nadir kökenler lipaz enzimine sahiptir. Bakteride eskülin hidrolizi, H₂S oluşumu, lesitinaz aktivitesi, nişasta hidrolizi ve DNA' az aktivitesi gözlenmez. Çoğu kökende süt proteolizisi gözlenir. *P. acnes* kökenlerinin bazıları safralı agarda üreyebilmektedir, yine bazı kökenlerde jelatin hidrolizi gözlemlenmektedir (39).

2.4.4. *P. acnes*' in Virulans Faktörleri

Bakterinin uygun koşullar altında sitotoksik etkinlik gösterdiği, geniş ölçüde antijenik faaliyet sergilediği ve bakterinin antijenlerine karşı humoral ve hücre aracılı immun yanıt oluştuğu bildirilmiştir (41).

P. acnes' in hücre duvarında ve hücre zarında yüzey proteinlerinin akne inflamasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmektedir. *P. acnes*' in virulans faktörleri; lipaz, hiyaluronidaz, endoglikoseramidaz, siyalidaz/nöraminidaz, hemoliziner/sitokinler, glikokaliks, ısı şok proteinleri (**HSP_s**), adezinler ve porfirinler olarak belirlenmiştir. Bu faktörlerden; siyalidaz/nöraminidaz, endoglikoseramidaz, hiyaluronidaz, lipaz ve hemoliziner/sitokinler deri yüzeyinde harabiyet oluştururken, glikokaliks, HSP_s, adezinler ve porfirinler inflamasyondan sorumlu tutulmaktadır (41).

2.4.4.1. Lipaz

P. acnes'te bulunan lipaz enziminin, insan derisindeki sebum gibi lipidleri parçaladığı düşünülmektedir. Bu durum bakterinin insan derisindeki kolonizasyonu için önem teşkil etmektedir. Buna karşın, *P. acnes*'in lipaz aktivitesi sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin de bakterinin sebasöz foliküle tutunmasında ve kolonizasyonunda rol oynadığı öne sürülmektedir (41).

2.4.4.2. Hiyaluronidaz

P. acnes'te bulunan hiyaluronidaz enziminin, bağ dokusunun hücreler arası matriksinde bulunan ve önemli bir bileşen olan hiyaluronan seviyesini azaltarak etkili olduğu bildirilmektedir (41).

2.4.4.3. Endoglikoseramidaz

Yeni tanımlanmış bir enzim olan endoglikoseramidaz omurgalıların hücre yüzeyi komponentlerinden, glikosfingolipidlerin yapısında bulunan oligosakkarid ve seramid gibi moleküllerin glikozidik bağlarına yapışarak bu moleküllerin yapısını bozmaktadır (41).

2.4.4.4. Siyalidaz/Nöraminidaz

P. acnes'te 3 adet siyalidaz/nöraminidaz geni saptanmıştır. Bunlardan 2 tanesi LPXTG tipte hücre duvarına bağlanma noktasına sahiptir. PPA1560 geni, *Micromonospora viridifaciens*'in nöraminidazları ile yüksek benzerlik göstermektedir. PPA684 geni, *Macrodabella decora* sülüğünün salisidaz L' si ile ayıca *Clostridium tertium*'un ekso-a-salisidaz'ı ile yüksek benzerlik göstermektedir. Buna karşın, PPA685 geni patojen olan *C. perfiringens*'in ekso-a-salisidaz'ına homologtur. *P. acnes*'in karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere gereksinim duyduğu sialik asidin sağlanmasında görev alan siyalidaz enziminin aktivitesi PPA685 geni tarafından kodlanmaktadır (41).

2.4.4.5. Hemolizinler/Sitotoksinler

P. acnes genomunda çok sayıda benzerlik gösteren PPA687, PPA1198, PPA1231, PPA1340, PPA2108 genleri CAMP faktörüne

homolog bir molekülü kodlamaktadırlar, böylece *P. acnes*'te önemli bir hemolizin olan CAMP faktörünü oluşturmaktadırlar (41).

2.4.4.6. Glikokaliks

P. acnes lipoglikan bazlı hücre zarı üretmektedir. Bu lipoglikan zarın bakterinin deriye tutunmasında ve biyofilm oluşturmada önemli olduğu belirtilmektedir. Böyle bir glikokaliks polimer tabaka oluşması, organizmanın immunolojik reaksiyon oluşturma yeteneğini kısmen açıklamaktadır. Ayrıca, *P. acnes*'in hücre zarı oluşturarak fiziksel bir bariyer sağlaması ile yüksek dozdaki antibiyotiklerin etkisiz kalması, klinik seyirde ve akne tedavisinde açık kalan diğer sorulara yanıt olmaktadır (41).

2.4.4.7. Isı Şok Proteinleri

P. acnes'te GroEL ve DnaK olmak üzere inflamasyonda rol oynayan 2 önemli HSPs yer almaktadır. Bu proteinlerden başka, *P. acnes*'te bulunan ve mikobakterilere özgü olan HSPs'lere homolog DnaJ, GrpE, 18-kDA proteinlerinin *P. acnes*'e karşı immun yanıt oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (41).

2.4.4.8. Adezinler

P. acnes'in genomunda bakterinin yüzey adezinlerini kodlayan ve insan derisindeki kolonizasyonunu sağlayan birçok gen bulunmaktadır. Bu proteinlerden birçoğu kollejenle bağlanmaktadır. Özellikle PPA6 proteininin *P. acnes*'in kollejen ile bağlanmasında önemli rolü olduğu bildirilmektedir (41).

2.4.4.9. Porfirinler

Bilindiği gibi *P. acnes* yüksek miktarda porfirin üretmektedir. Porfirinler cilt dokusunun hasarından sorumlu tutulmaktadır. Artan oksijen basıncının varlığında, salınan porfirinlerle, moleküler oksijen arasındaki toksik etkileşimin keratinosit hasarına neden olduğu gösterilmiştir. *P. acnes*'te porfirin üretiminin ayrıca, progresif makular hipomelanozis'in patogenezinde de rol oynadığı öne sürülmektedir. Bu durum

oksijenin indirgenmesi sonucu çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisiyle oluşmaktadır (41).

2.4.5. *P. acnes*' in Antimikrobik Maddelere Direnci

Akne tedavisinde antibiyotikler 40 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Akneli hastalardan izole edilen *P. acnes* kökenlerine karşı ilk direnç 1979'da ABD'de bildirilmiş, kısa bir zaman sonra yine ABD'de topikal olarak kullanılan eritromisin ve klindamisine dirençli kökenler bildirilmiştir (3). Zaman içinde ABD'den, Avrupa'dan, Avustralya'dan ve Uzak Doğu'dan; makrolidlere, eritromisine, linkozamide ve klindamisine dirençli kökenler bildirilmeye başlanmıştır. Tetrasiklinlere karşı direnç hakkında az sayıda veri vardır. 1991- 97 yılları arasında İngiltere'deki bir akne kliniğine başvuran poliklinik hastalarında antibiyotik dirençli propiyonibakterilerin yıllar içinde %67 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Diğer ülkelerdeki direnç durumu artışları daha düşük olarak bildirilmiştir (42).

2.4.5.1. *P. acnes*' te Direnç Gelişimini Etkileyen Faktörler

- Düşük dozda antibiyotik kullanımı dirençli *P. acnes* kökenlerinin artmasına ya da normal mikroflorada bulunan bakterilerin direnç genleri kazanmasına neden olmaktadır (3).
- Pek çok akneli hasta dirençli kökenler ile kolonizedir. Bu durumda bazı ilaçların seçilerek kontrollü bir şekilde verilmesi önem taşımaktadır. Bu seçim kantitatif mikrobiyolojik çalışmalar ile yapılabilmektedir. Seçilmeden, kontrolsüz ilaç verilmesi dirençli kökenlerin artmasına neden olur (3).
- Tedavinin süresine orantılı olarak dirençli *P. acnes* kökenleri ile kolonizasyon artmaktadır. Daha önce böyle bir tedavi uygulanmamış hastalarda dirençli kökenler tedaviden 12-24 hafta sonra ortaya çıkmaktadır. Bu bakımdan tedavi süresi de direnç gelişimini etkileyen önemli bir faktördür (3).

- Farklı direnç mekanizmaları taşıyan propionibakteriler farklı kimyasal yapılardaki antibiyotiklerin arka arkaya ya da bir arada kullanılmasından kaynaklanmaktadır (3).
- Yetersiz tedavinin uygulanması antibiyotik baskısını ortadan kaldırmakta ve dirençli kökenlerin meydana çıkmasını sağlamaktadır (3).

2.4.5.2. *P. acnes*'te Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Bu konuda yapılan çalışmalar, *P. acnes*'te antimikrobiyal direncin makrolid linkozamid streptogramin B (MLSB) grubu antibiyotiklere ve tetrasiklinlere karşı geliştiğini belirtmektedir. MLSB grubu antibiyotikler farklı kimyasal yapıya sahip olmakla birlikte benzer etki mekanizmasıyla etkilerini gösterirler. Bu nedenle MLSB antibiyotiklerden birine dirence neden olan genler diğerlerine de çapraz direnç gelişmesine neden olabilmektedir. Dirence neden olan mekanizmaya bağlı olarak MLSB direnci fenotipik olarak indüklenebilir veya yapısal direnç şeklinde ortaya çıkabilir. Eritromisine direncin efluks sisteminde değişikliğe bağlı olduğu durumlarda eritromisine dirençli olan köken klindamisine duyarlı iken, makrolid direncinin ribozomal metilasyondan kaynaklandığı durumlarda (indüklenebilir veya yapısal) ilgili köken klindamisine duyarlı veya dirençli olabilmektedir (43). MLSB direncinde en sık rastlanılan mekanizma 23S rRNA'nın peptidiltransferaz ilmeğinin 5. domeninin kodlanmasında görev alan gende meydana gelen 3 farklı nokta mutasyondan kaynaklanmaktadır. Bu mutasyonların herbiri MLSB grubu antibiyotiklere karşı çapraz direnç gösteren bir fenotipe neden olmaktadır. MLSB grubu antibiyotiklere yüksek direnç gösteren *P. acnes* kökenlerinde *erm(X)* direnç genini taşıyan korinebakteriyal bir transpozon olan Tn5432 saptanmıştır. *Erm* (eritromisin ribozom metilaz) *E. coli* A2058 bazının 23 S rRNA'sının N⁶ pozisyonunda metil transferazların metilasyonunu kodlar. Bu pozisyon MLSB grubu antibiyotikleri ile karşılıklı bağlanma bölgesini oluşturur ve böylece bu antibiyotiklere karşı çapraz dirence neden

olur. *Erm(X)* geni yüksek konsantrasyondaki MLSB gurubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine neden olur, bu durum nokta mutasyonun oluşması ile sonlanır. Bu yüzden, topikal antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak transpozonların insidansının artması olasıdır ve mutasyonel direnç antibakteriyal maddelere karşı etkin bir koruma sağlamayabilir (3).

P. acnes'te görülen tetrasiklin direncinden *E. coli*' de bulunan eşdeğer 1058 bazının sorumlu olduğu görülmüştür. Bu baz 16S rRNA'nın küçük alt ünitesinde tek bir G-C transisyonu ile oluşmuştur. Tetrasiklin direnci gösteren kökenler minosiklin ve doksisisikline karşı değişik oranlarda çapraz direnç geliştirebilmektedir. Gittikçe artan antibiyotik dozlarının uygulanması pek çok direnç faktörünün gelişmesine neden olmakta, bu durum klinik olarak uygulanabilir minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerini yükseltmektedir (3).

2.4.6. *P. acnes*' te Antimikrobiyal Direncin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Aerop bakterilerin, antibiyotiklere duyarlılıkları öncelikle kalitatif yöntemlerle saptanabilirken anaerop bakteriler için yapılan duyarlılık testlerinde kantitatif yöntemler tercih edilmektedir. Kalitatif yöntemlerle, bakteri, duyarlı, orta düzeyde duyarlı ya da dirençli olarak sınıflandırılabilir. Kantitatif yöntemlerle ise antibiyotiğin, MİK değeri saptanabilir (44).

Duyarlılık deneyinde uygulanan yöntem ne olursa olsun standart kökenler ile kalite kontrolünün mutlaka yapılması gerekmektedir. Her bir agar dilüsyon testi için en az iki kalite kontrol kökeni olmalıdır. Diğer yöntemlerde (sıvı mikrodilüsyon ya da E-test gibi) tek bir kalite kontrol kökeni ise yeterlidir.

2.4.6.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

Anaerop bakteriler için kullanılabilen antibiyotiklerin minimal MİK değerinin belirlenmesinde sağlıklı sonuç vermesi bakımından en sık önerilen yöntemdir. Bu yöntemde denenen antibiyotiklerin farklı dilüsyonları hazırlanır

ve hemin (5 g/ml), K1 vitamini (1 g/ml) ve sodyumbikarbonat (1mg/ml) ile zenginleştirilmiş Brucella agar besiyerine 1/10 oranında olacak şekilde ilave edilir. Değişik dilüsyonlarda antibiyotik içeren Brucella agar besiyerlerine çalışılacak bakteri kökenlerini 0.5 McFarland yoğunluğunda içeren süspansiyondan 1:200 oranında yerleştirilir ve anaerop ortamda 2 günlük inkübasyon süreci sonunda değerlendirilir. Üremenin görülmediği ilk dilüsyon değeri o antibiyotiğin çalışılan bakteri için MİK değeri olarak kabul edilir (45).

2.4.6.2. Sıvıda Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu test manuel, yarı otomatik ya da tam otomatik sistemler kullanarak sıvıda değişik dilüsyonlardaki antimikrobiyal maddelerin çalışılan mikroorganizmaya etkinliğini belirlemek için kullanılmaktadır. Anaerop bakteriler için önerilen besiyeri hemin (5 g/ml), K1 vitamini (1 g/ml) ve sodyum bikarbonat (1mg/ml) ile zenginleştirilmiş Brucella broth'tur. Bu test sonucunda üremenin anlamlı şekilde azaldığı dilüsyon antimikrobiyal maddelerin çalışılan bakteri için MİK değerini vermektedir. Bu yöntem için Brucella sıvı besiyerine ilave edilecek inokulumdan hazırlanan 0,5 McFarland yoğunluğundaki süspansiyon oranı 1: 15 dilüsyondur (45).

2.4.6.3.Sıvıda Makrodilüsyon Yöntemi

Bu test daha çok antibiyotiklerin minimal bakterisidal konsantrasyonunu (MBK) hesaplamak için kullanılır. Bunun dışında *Clostridium sp.* gibi zor üreyen mikroorganizmalar için de önerilmektedir. Sıvıda mikrodilüsyon testi için önerilen besiyeri, sıvıda makrodilüsyon için de önerilmektedir. Bu yöntemde Brucella brota ilave edilecek inokulumdan hazırlanan 0,5 McFarland yoğunluğundaki süspansiyon oranı 1: 200 dilüsyondur. Test sonucunda üremenin görülmediği tüpte bulunan antibiyotik yoğunluğu o antibiyotiğin MİK değeridir. Eğer MBK hesaplanmak isteniyorsa üreme görülmeyen tüplerden 0,1 ml katı besiyerlerine alınarak anaerobik

inkübasyona bırakılır. Sonuç olarak 30 koloniden az üremeye neden olan antibiyotik konsantrasyonu MBK olarak değerlendirilir (45).

2.4.6.4. E Test

E test, MİK saptanmasında kullanılan, gradient difüzyon yöntemidir. Bir şerit üzerinde antibiyotiğin dereceli olarak azalan konsantrasyonları yer alır. Agar plak üzerine yayılmış bakteri süspansiyonu üzerine şerit yerleştirilir. İnkübasyon sonrası inhibisyon zonunun şeridi kestiği noktada okunan değer MİK olarak kabul edilir (45).

2.4.6.5. Spiral Gradient Endpoint System

Agar pleyt üzerinde spiral şekiller bulunur ve bu spiral modelde antimikrobiyal stok sölüsyonlar mevcuttur. Konsantrasyon gradientindeki ışınsal (radyal) azalma ile sonuçlanır. Kökenler, radyal modele göre otomatize inokulasyon aleti kullanarak pleyte konulur. MİK değeri; pleytin merkezinden üremenin sonlandığı noktaya kadar olan alanın ölçümüdür. Pek çok laboratuvarın ortak yargısına göre agar dilüsyon tekniği ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Spiral gradient sistem, agar dilüsyon duyarlılık testine göre sonuçları iki kat daha güvenilirdir. Daha çok toplu testler için uygun bir metoddur, tek bir köken için kullanılmaz (45).

2.4.6.6. Moleküler Çalışmalar

Propionibakterilerde moleküler direnç çalışmaları 23S ve 16S rRNA amplifikasyonu ile başlamıştır (42).

Klindamisin ve eritromisin direnci, 23S rRNA'nın 5. domenini kodlayan gen sekans analizi *erm(x)* geni saptanmasıyla araştırılmıştır.

Tetrasiklin direnci ise, 16S rRNA'nın amplifikasyonu ve 1058 bazında G-C transisyonu saptanarak araştırılmıştır (42).

2.4.7. *P. acnes* tanımlanmasında kullanılan yöntemler

2.4.7.1. Morfolojik inceleme

Propionibakteriler geç üreyen, sporsuz, Gram pozitif, anaerobik bakterilerdir. Şekilleri çomak şeklinde veya dallanmış, tek tek, çiftler halinde veya grup halinde olabilir (35).

2.4.7.2. Biyokimyasal Yöntemler

2.4.7.2.1. Konvansiyonel Yöntemler

Katalaz ve indol üretimi ve nitrat redüksiyonu test edilir. *P. acnes* eskülin veya üreyi hidroliz etmez ve şekerlerden glukozu etkili olup, maltoz ve sükrözün etkisizdir (37).

2.4.7.2.2 Yan Otomatize ve Otomatize Sistemler

Hızlı identifikasyon sistemleri (2-4 saat), kromojenik veya floresan substratlar ya da her ikisinde kullanılarak enzimin araştırılması temeline dayanmaktadır. Bu sistemler; RapID ANA II (Remel), Rapid ID 32A (bioMerieux), ANI Card (Vitek Sistemleri), API ZYM (bioMerieux), MicroScan (American MicroScan) ve BBLCrystal Anaerobe (ANR) Identification (ID) sistemleridir (Becton- Dickinson) (44). API 20A (bioMerieux, France) mikropak sisteminde karbonhidratlar için 16, indol, üreaz, jelatin ve eskülin için 4 kuyucuk bulunmaktadır. 24-48 saat inkübasyondan sonra reaksiyonlar gözle değerlendirilip skorlanır. Profil numarası oluşturulur ve daha sonra kod kitapçığından isimlendirilir (45).

Günümüzde Malditof Spektrofotometri olarak isimlendirilen MS yöntemiyle koloniden çok kısa sürede tanımlama yapılabilmektedir.

2.4.7.3. Kromatografik Teknikler

Gaz- likit kromatografisi (GLC), bakteri fermentasyonunun metabolik son ürünlerini saptamak amacıyla kullanılır. Bu tekniğin sık kullanıldığı bir alan, glukoz fermentasyonu esnasında zorunlu anaerop

bakteriler tarafından oluşturulan kısa zincirli yağ asitlerinin tanımlanmasıdır. Değişik bakteriler arasında oluşan uçucu asitlerin çeşitleri ve miktarca değişimleri bakterilerin bir açıdan metabolik parmak izini açığa çıkartarak tanımlarına olanak sağlar (46).

Yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), bakterilerin ve mantarların dış membranları ve hücre duvarlarındaki uzun zincirli yağ asitleri analiz edilerek ileri düzeyde fenotipik özellikler açığa çıkarılabilmekte ve çok yakın ilişkili türlerin bile ayrımı mümkün olabilmektedir (46).

2.4.7.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler tanımlama teknikleri yıllardan beri yaygın olarak yapılmaktadır. Bu teknikler, konvansiyonel tanımlama ve identifikasyon yöntemlerine göre, hızlı ve duyarlı olması nedeni ile daha avantajlıdır. Moleküler teknikler 4 grupta toplanabilir. Bunlar, nükleik asit problemleri, hedef amplifikasyonu (polimeraz zincir reaksiyonu gibi), prob amplifikasyonu (Qfi replikaz temelli amplifikasyon) ve sinyal amplifikasyonu (bDNA problemleri gibi)' dur (47).

P. acnes'in de bulunduğu anaerobik, sporsuz, Gram pozitif çomakların identifikasyonunda PZR yöntemi ile 16S rRNA' nın amplifikasyonu yapılır. 16S rRNA'nın gen sekansı bu grup bakterilerin identifikasyonu ve sınıflandırılması için temel yöntemdir (47). *P. acnes* doğası gereği yavaş üreyen bir bakteri olduğundan klinik örneklerden direkt PZR amplifikasyonu *P. acnes* enfeksiyonlarının tanısında yararlı olabilmektedir (47).

2.5. Gül yağı ve türevleri

Yaygın kullanılan ismiyle Şam Gülü olarak bilinen, pembe çiçekleriyle birlikte ve uzun yıllar canlı kalabilen çalısı olan, Avrupa, Orta Doğu ülkelerine, İran ve Türkiye'ye özgü olan *Rosa damascena Mill.* Rosaceae ailesinin bir üyesidir (49). Bu bitki, ticari olarak esansiyel yağı için üretilmektedir. Esansiyel gül yağının yanında, hidrosol ve absolut molekülleri de *R.damascena Mill'*den bolca elde edilebilen moleküllerdir (50). Esansiyel gül yağı, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Parfümeri etkisinin yanı sıra yaygın oranda analjezik, hipnotik, antispazmodik, anti-inflamatuvar ve antikonvülzan gibi biyokimyasal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (51,52). Gül özütleri, serinletici, sakinleştirici, kanamayı durdurucu ve anti inflamatuvar özellikleri sayesinde tıpta, gıda ve kozmetik endüstrisinde kullanılmışlardır (53,54). Son yıllarda, esansiyel gül yağının kimyasal bileşimi, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri hakkında çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır (55,56). Esansiyel gül yağı, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanımı nedeniyle çok yüksek bir satış değerine sahiptir. Gül yağına kıyasla, absolut daha ucuzdur (10).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Besiyerleri

- % 5 koyun kanlı Columbia agar (Biomerieux)
- Çukulata agar (Biomerieux)
- Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyeri (Becton Dickinson)
- Brain Heart İnfüzyon agar (Becton Dickinson)
- Skim milk (Oxoid)
- DNA' az agar (Oxoid)
- Reinforced Clostridial Medium (Oxoid)
- Bakteriyolojik agar (Oxoid)
- Brucella sıvı besiyeri (Remel)
- Brucella kanlı agar (Remel)

3.1.2 Standart Kökenler

- ATCC 11828 *Propionibacterium acnes* serotip II
- ATCC 11827 *Propionibacterium acnes* serotip I A

3.1.3 Kimyasal Maddeler

- Anaerogen compact (Oxoid)
- Kristal viyole (Merkez laboratuvarı)
- Anaerojen (Thermo scientific)
- Etil alkol (Riedel- de Haen)
- Metil alkol (Merck)
- Aseton (Gülşah Kimya)
- Fosfat tamponlu salin (PBS) (Merkez laboratuvarı)
- Defibrine at kanı (Oxoid)

3.1.4. Hazırlanan Solüsyonlar ve Besiyerleri

%1 Glukoz içeren Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyerinin hazırlanışı

37 gram toz besiyeri ve 10 gram glikoz tartılıp 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

%3'lük Skim Milk Agar

300 gram skim milk toz, 15 gr bakteriyolojik agar ve 1 lt distile su karıştırılıp, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır.

Brain Heart İnfüzyon Agar

56 gr toz, 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

%5'lik At kanlı Reinforced Clostridial Medium Agar

15 gr agar bacteriological, 38 gr reinforced clostridial medium ve 1 lt distile su karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sonrasında, 50 cc defibrine at kanı ilave edilerek besiyeri plaklara dökülmüştür.

DNA' az agar

39 gr toz, 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Brucella sıvı besiyeri

43 gr toz, 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

K1 vitamini içeren Brucella kanlı agar

28 gr toz, 100µl K1 vitamini 1 lt distile su ile karıştırılıp 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sonrasında 50 ml koyun kanı eklenerek agar dilüsyon yönteminde kullanılmıştır.

Kristal Viyole Solüsyonu

Gram boyamada kullanılan kristal viyolede 10 cc alınarak, 1 lt steril distile su ile karıştırılıp %1'lik kristal viyole solüsyonu elde edilmiştir.

Aseton etanol solüsyonu (20: 80, v/v)

20 cc aseton ile 80 cc etil alkol karıştırılmış ve vortekslenerek kullanılmıştır.

Esansiyel gül yağı ve absolut türevi

3 ml esansiyel gül yağı ve 3 ml absolut türevi Sebat Ltd., Isparta tarafından çalışmamız için ücretsiz olarak temin edilmiştir. Kendilerine teşekkür ederiz.

3.2. Araçlar ve Aygıtlar:

- Etüv (Memert)
- Pasteur fırını (Memert)
- Otoklav (Hirayama)
- Buzdolabı (Uğur)
- (- 20 °C) Dondurucu (Uğur)
- (- 80 °C) Dondurucu (iShin)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Kaba terazi (Scaltec)
- Vorteks (Yellowline, Ika)
- Steril eküvyonlar
- Distile su cihazı
- Santrifüjler (Hettich)
- Etüv (Binder)
- Işık Mikroskobu (Olympus)
- Cam balonlar, lamlar
- Pipet (Thermo- scientific)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Araştırma kökenleri

Çalışma kökenleri MAR-YÇ-2008- 0232 protokol nolu “Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Propionobacterium acnes* kökenlerinin genotiplendirilmesi, genotip ile akne şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması” isimli proje çerçevesinde izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

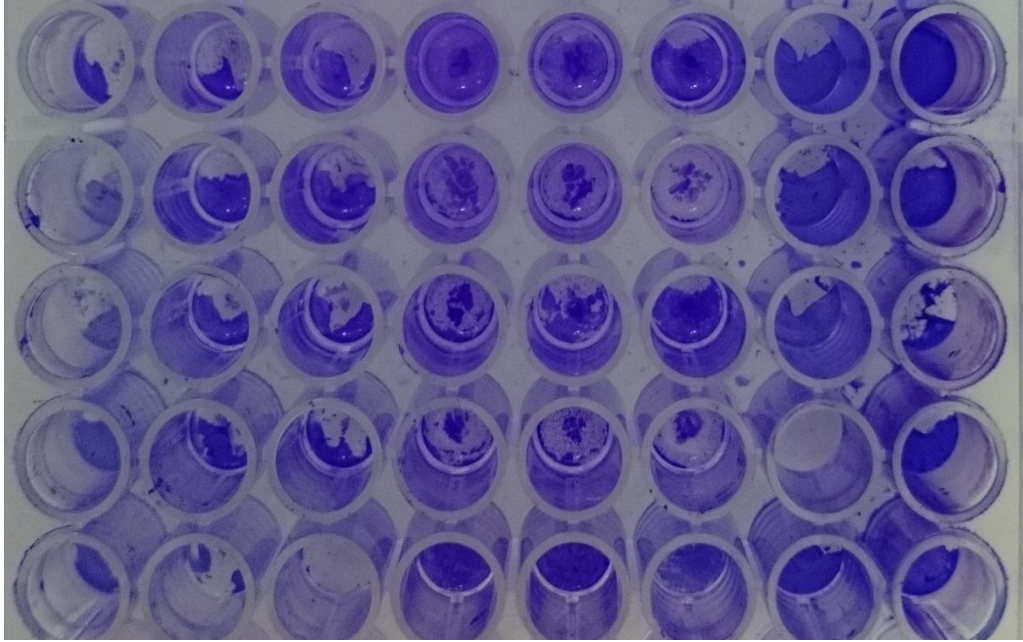
Bu projeye, Ocak - Haziran 2009 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Dermatoloji Kliniğine başvuran, son 4 hafta öncesine kadar sistemik antibiyotik veya isotretinoin ile topikal herhangi bir akne ilacı almamış ve son 3 ay öncesine kadar sistemik kortizon veya immünsüpresif bir ilaç kullanmamış, 15 ile 35 yaş arasındaki akneli hastalar dahil edilmiştir.

Çalışmamızda stoklanmış kökenler anaerop ortamda koyun kanlı agara pasajlanmış, 37°C’de yaklaşık 72 saat inkübe edildikten sonra oda ısına alınmış (25°C) ve tekrar pasajlanarak 37 °C’de inkübe edilmiştir. Önceden morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanan kökenlerin *P. acnes* oldukları Mauditof Spektrofotometri (Vitek MS, Biomereieux) ile doğrulanmıştır.

3.3.2. Biyofilm üretiminin saptanması

Biyofilm testi mikropalak yöntemi ile yapılmıştır (4). %1 glukoz içeren Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyerine 1×10^8 cfu/ml (0.5 Mac Farland) yoğunluğunda bakteri ekilmiş ve anaerop ortamda 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında, bu bakteri süspansiyonlarından 50 µl alınarak, kuyucuklarında 150 µl besiyeri bulunan steril düz tabanlı plaklara eklenmiş ve anaerop ortamda 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Her plakta koagülaz negatif stafilokok (ATCC Staphylococcus epidermidis 12288) pozitif kontrol olarak kullanılmış ve sadece besiyeri içeren kuyucuklar da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Her test 3 kere tekrarlanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki besiyeri dökülerek 200 µl fosfat tamponlu salin

(PBS) ile en az 3 defa yıkanmıştır. Geride kalan biyofilm tabakası 200 µl metanol ile 10 dakika fikse edilmiştir. Sonrasında, her bir kuyucuğa 160 µl kristal viyole (distile suda %1 (w/v)) eklenmiş ve 4 dakika boyanmıştır. Takiben boya dökülmüş ve kuyucuklar 200 µl PBS ile üç defa yıkanmış, kalan boya 200 µl aseton-etanol (20:80 (v/v)) ile çözülmüştür. Absorbans ELISA okuyucusunda (Ciom, Microplate reader, Model ER-2006) 540 nm'de ölçülmüştür. Eşik değerin (cut- off) belirlenebilmesi amacıyla, negatif kontrol olarak kullanılan steril besiyeri içeren kuyucuklardan elde edilen OD verilerinin ortalamalarına 0.17 standart sapma eklenerek eşik değeri >0.37 olarak tespit edilmiş, 540 nm'de absorbans değeri >0.37 olarak saptanan kökenler biyofilm üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2. Mikroplak yöntemiyle biyofilm pozitifliği.

3.3.3. Gül yağı ve absolut türevinin anti bakteriyel etkinliğinin saptanması

Anti bakteriyel etkinliğin saptanmasında agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Esansiyel gül yağı ve absolut 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Brain Heart Infusion (BHI) agar besiyerine, bakteri süspansiyonu (10^8 cfu/ml) yayılmış ve 4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. 6 mm çaplı steril kağıt disk 5µl esansiyel gül yağı ve 5 µl absolut türevi emdirilmiş

ve bu diskler agar yüzeylerine yerleştirilmiştir. Plaklar anaerobik ortamda 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Bu test üç defa tekrarlanmış ve zon çapları olarak ortalamaları kabul edilmiştir (57).



Şekil 3. Esansiyel gül yağı (Beyaz disk) ve absolut türevi (turuncu disk) için disk difüzyon testi.

3.3.4. Gül yağı ve absolut türevinin MİK değerlerinin saptanması

MİK (Minimal İnhibitör konsantrasyonu) testi CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından araştırma ve sürveyans çalışmaları için önerilen agar dilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır (58). Brucella kanlı agar (1 µg/ml vitamin K1 eklenmiş) kullanılmıştır. Besiyerleri 50°C'ye soğutulduğunda % 5 oranında defibrine veya dondurulup çözülmüş koyun kanı ve %0.5' lik tween 80 içeren %0.9'luk serum fizyolojik ile seri sulandırılması yapılmış ilgili gül yağı türevi solüsyonundan 1/10 oranında eklenerek iyice karıştırılıp petrilere dökülmüştür. Besiyerleri kapak hafif açık olacak şekilde 37°C'de 30-45 dakika tutularak kurutulmuştur.

İnokulasyon için en düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan başlanmıştır. 20 ml'lik besiyerlerine 1×10^8 CFU miktarında bakteri içeren süspansiyonlardan 10 µl alınarak inököle edilmiştir. Ayrıca, biri aerop ortama biri de anaerop ortama kaldırılmak üzere iki adet gül yağı içermeyen kontrol besiyerine de ekim yapılmıştır.

Anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası koyu, ışığı yansıtmayan bir zemin üzerinde sonuçlar okunmuştur. Kontrol üreme ile

karşılaştırıldığında üremenin belirgin olarak değişiklik gösterdiği dilüsyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Üremede gözlenen belirgin değişiklik, hiç üreme olmaması ya da çok hafif bir üreme, sisli bir görünüm, çok sayıda minik koloniler veya bir iki tane normal büyüklükte koloni görülmesidir (59).



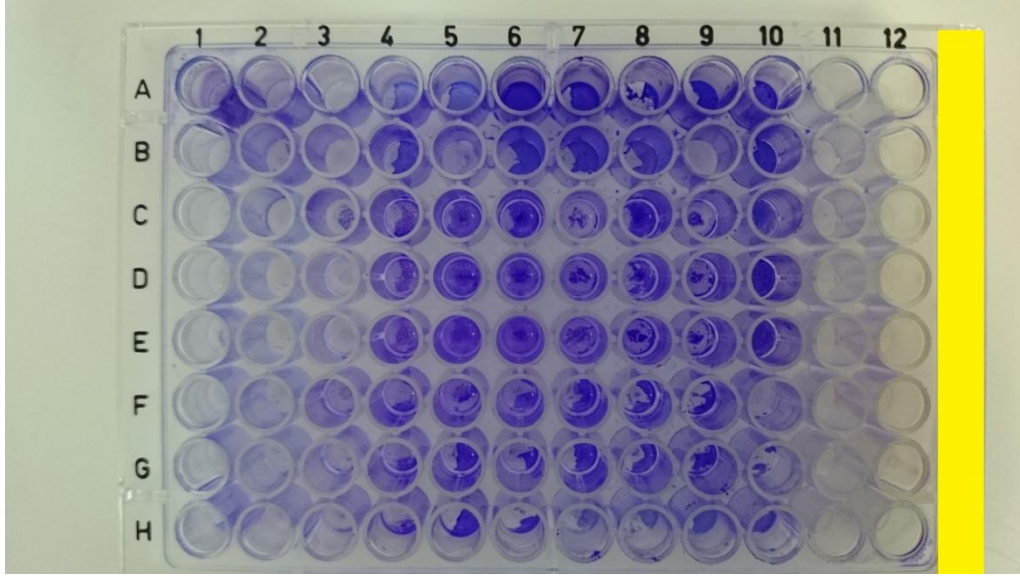
A

B

Şekil 4. Agar dilüsyon metodu yöntemiyle yapılan MİK testi A) İlgili gül yağı konsantrasyonunda dirençli iki farklı köken B) İlgili gül yağı türevi konsantrasyonunda duyarlı kökenlerde üreme gözlenmemesi.

3.3.5. Gül yağı ve absolut türevinin Anti biyofilm etkinliğinin saptanması

%1 glukoz eklenmiş BHI sıvı besiyeri ile 10^8 CFU/ml bakteri içerecek şekilde bakteriyel süspansiyonlar hazırlanmıştır. Anaerop koşullarda 37 °C'de 72 saat inkübe edildikten sonra, kuyucuklarında 150 µl besiyeri içeren düz tabanlı plaklara 50' şer µl bakteriyel süspansiyonlardan eklenmiştir. Her bir bakteri süspansiyonu için 10 kuyucuk kullanılmış ve her bir kuyucuğa MİK tespitinde kullanılan 10 ayrı gül yağı ve absolut konsantrasyonu içeren solüsyonlardan 50'er µl eklenmiştir. Tekrar anaerop ortamda ve 37°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra yukarıda anlatılan biyofilm fiksasyon ve boyama işlemleri yapıldıktan sonra 540 nm'de absorbans değerleri okutulmuş ve antibiyofilm etkinliğinin varlığı, varsa da hangi konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril besiyeri, pozitif kontrol olarak daha önce kullanılan ATCC *Staphylococcus epidermidis* kullanılmıştır.

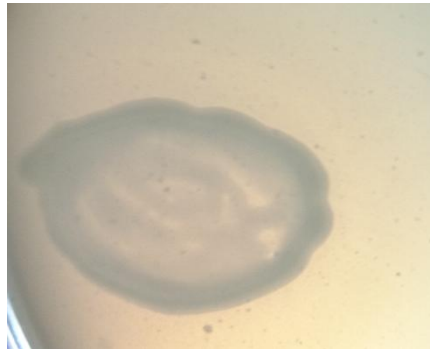


Şekil 5. Esansiyel gül yağının antibiyofilm etkinliği*

*Yüksek konsantrasyonlarda biyofilm üretiminin inhibisyonu (A1 ve H1 arası, A2 ve H2 arası, A3 ve H3 arasındaki kuyucuklar). Konsantrasyon azaldıkça biyofilm üretiminin artması (A4 ve H4 arası ile A10 ve H10 arasındaki kuyucuklar)

3.3.6. *P. acnes* kökenlerinin proteaz aktivitesinin tespit edilmesi

Proteaz aktivitesinin tespit edilmesinde %3' lük skim milk agar kullanılmıştır. Kökenler Skim milk agara pasajlanmıştır. Besiyerleri anaerop ortamda 37°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. 7 gün sonunda proteaz pozitif olan kökenler kolonileri etrafında hemoliz benzeri beyaz bir zon oluşturmuşlardır. Pozitif kontrol olarak ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 kullanılmıştır.



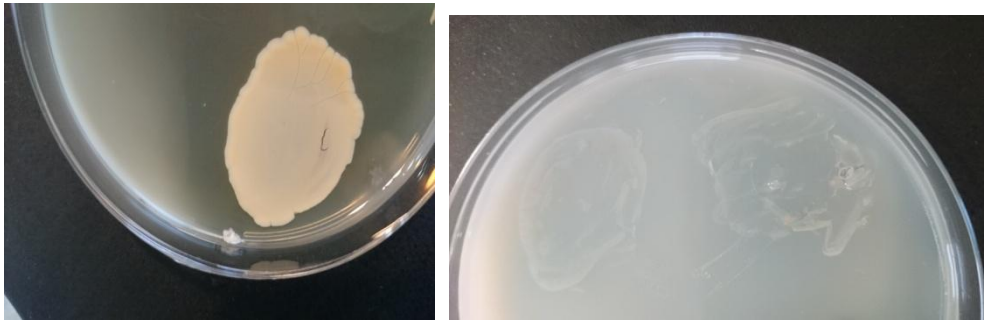
Şekil 6. %3'lük Skim milk agarda proteaz testi pozitifliği

3.3.7. *P. acnes* kökenlerinin beta hemoliz aktivitesinin araştırılması

Beta hemoliz aktivitesinin tespitinde %5 at kanı içeren Reinforced Clostridial Medium (RCM) agar kullanılmıştır. Kökenler pasajlandıktan sonra, 37 °C'de 72 saat inkübasyona kaldırılmış ve sonrasında 72 saat oda ısısında inkübe edildikten sonra beta hemoliz oluşturup oluşturmamalarına bakılmıştır. Pozitif kontrol olarak beta hemoliz oluşturan ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, negatif kontrol olarak non hemolitik ATCC *Enterococcus faecalis* 29212 kullanılmıştır.

3.3.8. *P. acnes* kökenlerinin DNA' az aktivitelerinin araştırılması

DNA' az besiyeri hazırlandıktan sonra kökenler dairesel şekilde besiyerlerine inöküle edilip, anaerop ortamda 37 C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler oluşuktan sonra 1 N Hidroklorik asit (HCl) besiyerine eklenmiştir. Renk değişimi gerçekleşip hemoliz benzeri zon oluşturanlar pozitif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, negatif kontrol olarak ATCC *Staphylococcus epidermidis* 12228 kullanılmıştır.



A

B

Şekil 7. DNA' az testi. A) Pozitif kontrol; B) Negatif kökenler

3.3.9. İstatiksel değerlendirme

Çalışma veri analizinde SPSS Statistics 17.0.0 programı kullanıldı. Esansiyel gül yağının antibiyofilm etkisinin istatiksel olarak değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanılmış, ikiden fazla değer kıyaslandığı için p değeri için Bonferron düzeltmesi yapılmış ve $p < 0.0033$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Değerlendirmeye alınan hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2.Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Hasta(n,%)	Kontrol(n,%)	Toplam
Kadın	3 (43)	4 (57)	7
Erkek	4 (57)	3 (43)	7
Toplam	7 (50)	7 (50)	14

Hasta ve kontrol grubu 15-35 yaş aralığındaki kişilerden oluşturulmuştur, yaş dağılımı Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3.Hasta ve kontrol grubundaki yaş dağılımı

Yaş aralığı	Hasta(n,%)	Kontrol(n,%)	Toplam
15-24	6 (86)	7 (100)	13
>25	1 (14)	0 (0)	1
Toplam	7 (50)	7 (50)	14

MAR-YÇ-2008- 0232 protokol nolu “Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Propionobacterium acnes* kökenlerinin genotiplendirilmesi, genotip ile akne şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması” isimli proje çerçevesinde, kökenlerin genotipleri araştırılmış, kontrol kökenlerinden dördü Tip IA, üçü Tip IB, hasta kökenlerinden üçü Tip IA, dördü Tip IB olarak tespit edilmiştir.

Kökenlerin virülans faktörleri tablo 4 ’de verilmiştir. Tüm kökenler biyofilm üretmiş, üç hasta kökeni hariç, tüm kökenler beta hemoliz ve proteaz aktivitesi göstermiştir. Kökenlerin hiçbirinde DNA’ az aktivitesi saptanmamıştır.

Tablo 4.P. *acnes* kökenlerinin virülans faktörleri

Köken	Genotip (PCR)	Beta Hemoliz	Proteaz	Biyofilm (O.D.)*	DNA' az
Kontrol 1	Tip 1B	Pozitif	Pozitif	2.7 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 2	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	2.6 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 3	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	2.5 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 4	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	2.4 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 5	Tip 1B	Pozitif	Pozitif	2.6 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 6	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	1.6 (Pozitif)	Negatif
Kontrol 7	Tip 1B	Pozitif	Pozitif	1.3 (Pozitif)	Negatif
Hasta1	Tip 1A	Negatif	Pozitif	2.1 (Pozitif)	Negatif
Hasta 2	Tip 1B	Negatif	Pozitif	2.3 (Pozitif)	Negatif
Hasta 3	Tip 1B	Negatif	Negatif	2.4 (Pozitif)	Negatif
Hasta 4	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	2.5 (Pozitif)	Negatif
Hasta 5	Tip 1B	Pozitif	Negatif	2.4 (Pozitif)	Negatif
Hasta 6	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	2.3 (Pozitif)	Negatif
Hasta 7	Tip 1B	Pozitif	Negatif	2.4 (Pozitif)	Negatif
ATCC <i>P. acnes</i> 11827	Tip 2	Pozitif	Pozitif	0.8 (Pozitif)	Negatif
ATCC <i>P. acnes</i> 11828	Tip 1A	Pozitif	Pozitif	1.1 (Pozitif)	Negatif

*Biyofilm için standart sapma 0.17 olarak saptanmıştır.

Esansiyel gül yağının antibakteriyel etkinliğine baktığımızda, disk difüzyon yöntemi sonucunda en küçük ortalama disk zon çapı 16.5 mm iken, en büyük disk difüzyon çapı 44 mm olarak ölçülmüştür (Ortalama 26.3 ± 7.6). Agar dilüsyon yöntemiyle yapılan MİK değeri tespiti çalışması sonucunda da, bütün kökenler için MİK değeri %2 olarak saptanmıştır.

Absolut türevi için ise, disk difüzyon yönteminde 3 kökünde zon oluşmadığı, oluşan zon çaplarından ise en büyük zon çapının 26.5 mm olduğu gözlemlenmiştir (Ortalama 11.4 ± 5.3). Yine agar dilüsyon yöntemiyle

yapılan MİK değeri çalışmasında bütün kökenler için MİK değeri %4 olarak saptanmıştır.

Antibiyofilm etkinlik araştırmasında ise absolut türevi için herhangi bir antibiyofilm etkinlik saptanmamıştır. Esansiyel gül yağı için ise, seri dilüsyonlardan ilk beş konsantrasyonda (%4, %2, %1, %0.5, %0.25) O.D. değerlerindeki (biyofilm yoğunluğu) azalma istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p < 0.0033$). Dolayısıyla bu beş konsantrasyonda antibiyofilm etkinliği, ilk iki konsantrasyonda da (%4 ve %2) antibakteriyel etkinliği gösterilmiştir.

MAR-Y-2008- 0232 protokol nolu "Akne vulgarisli hastalardan üretilen *Propionobacterium acnes* kökenlerinin genotiplendirilmesi, genotip ile akne şiddeti arasındaki ilişkinin araştırılması" isimli proje çerçevesinde, tüm kökenlerin agar dilüsyon yöntemiyle klindamisin, tetrasiklin, eritromisin için MİK değerleri çalışılmış, ve çalışmamızda kullandığımız kontrol kökenlerinden sadece bir tanesi klindamisin ve eritromisine dirençli (MİK: 8, 8), hastalardan elde edilen kökenlerden de sadece bir tanesi sadece klindamisine dirençli (MİK:8) saptanmıştır. Tüm kökenler tetrasikline duyarlı bulunmuştur.

Tablo 5.Kökenlerin direnç profili

Köken	Klindamisin	Tetrasiklin	Eritromisin
Kontrol 1	0,06	1	0,25
Kontrol 2	0,125	1	0,25
Kontrol 3	1	0,5	0,5
Kontrol 4	0,125	0,5	0,03
Kontrol 5	0,125	1	0,25
Kontrol 6	8 (Dirençli)	0,5	8 (Dirençli)
Kontrol 7	0,06	0,125	0,25
Hasta 1	0,125	1	0,06
Hasta 2	0,06	1	0,25
Hasta 3	0,125	0,25	0,06
Hasta 4	8 (Dirençli)	0,25	0,06
Hasta 5	0,03	0,03	0,125
Hasta 6	0,06	0,25	0,25
Hasta 7	0,125	0,5	0,125

5. Tartışma ve Sonuç

Derinin normal florasında yer alan, bir takım fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilen *Propionibacterium acnes*, akne vulgaris oluşumunda önemli role sahip bir bakteridir (17). *P. acnes* yüz, göğüs ve sırtta, sebumdan zengin foliküllerde kolonize olmaktadır. Foliküle yerleşen *P.acnes* ürettiği lipaz enzimi ile trigliseridleri serbest yağ asitlerine hidrolize etmektedir. Ardından aknenin öncü molekülü komedon oluşmakta ve inflamasyon gelişmektedir. Aynı zamanda *P. acnes*' in salgıladığı kemotaktik sitokinler ile kompleman sistemi aktive olmakta ve nötrofillerin komedonun olduğu bölgeye doğru çekilmesi sağlanmaktadır (17). Ayrıca *P. acnes*'in salgıladığı proteaz, fosfataz ve hyalüronidaz gibi ekstrasellüler enzimler ve kemotaktik faktörlerin de foliküler inflamasyonda sorumlu oldukları gösterilmiştir (6). Ancak çalışmamızda proteaz açısından, hastalık yapan kökenler lehine bir bulgu saptanmamıştır.

Bazı kökenler anaerop kanlı agarda dar hemoliz zonu yapabilmektedir. *P. acnes* kökenleri koyun ve insan eritrositleri ile ko-hemolitik reaksiyon meydana getirebilmektedirler. Bu reaksiyon, ilk defa 1944 yılında gösterilen Christie- Atkins Petersen (CAMP) reaksiyonu ile aynıdır (40). Çalışmamızda üç köken hariç tüm kökenlerde beta hemoliz reaksiyonu gözlemlenmiştir. Beta hemoliz için %5' lik at kanı içeren RCM agar besiyeri kullanılmıştır. Bazı kökenler koyun kanlı agarda daha zayıf hemoliz gösterirken, %5 at kanı içeren RCM agarda daha büyük hemoliz zonları oluşturmuşlardır. Virülans ile beta hemoliz arasındaki ilişkiye baktığımızda, hastalardan izole edilen kökenler lehine bir bulgu saptanmamıştır.

P. acnes' in biyokimyasal özelliklerine baktığımızda DNA' az aktivitesi genel olarak gözlenmez (39). Ancak, bazı kökenlerde sıra dışı durumlar gözlenebilmektedir. Çalışma kökenleri bu açıdan kontrol edilmiş ve hiçbirinde DNA' az aktivitesi gözlemlenmemiştir.

Patogeneizde sorumlu tutulan önemli virülans faktörlerinden biri de *P. acnes*'in biyofilm üretimidir (6). Biyofilm matriksinin içinde bakteriler, mevcut besinleri en optimal şekilde kullanmak için organize olurlar, ve çeşitli mikro

çevrelerin oluşmasına olanak sağlayan mikro- heterojeniteye sahiptirler (60). Biyofilmin içinde bakteri çok çeşitli enzimatik aktiviteler gösterebilir. *P. acnes* proteaz, fosfataz ve hyalüronidaz gibi ekstrasellüler enzimler ve nötrofil, lenfosit ve makrofajlar için kemotaktik faktörler salgılayabilir. Enzim aktiviteleri çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak çok sık değişebilmektedir. Mikro çevre, dışa salınan enzim miktarında çok büyük bir rol oynamaktadır(6).

Dolayısıyla biyofilmin doğası, intrinsik ve ekstrinsik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. İntrinsik faktörler, mikrobiyal hücrenin genetik profili ile ilişkilidir. Ekstrinsik faktörler arasında da biyofilmin yerleştiği fiziko-kimyasal çevre yer almaktadır (60). İn vitro ortamda dahi, *P. acnes*'in enzim üretiminin, pH ve oksijen basıncı gibi faktörlerle değiştiği gösterilmiştir. Bu yüzden, akne tedavisinde akne biyofilminin bulunduğu mikro çevreyi değiştirerek salınan enzimlerin ve dolayısıyla bakteri virülansının azalmasını sağlamak da önemli olabilir (6).

Biyofilm açısından bakıldığında, standart kültürlerde antibiyotik direncinin saptanması veya saptanmaması, tedavi sonucu değerlendirme açısından güvenilir bir kriter değildir. *P. acnes*'in piloseböz kısmının tamamen uzaklaştırılması antibiyotikler ile mümkün olamayabilir. Minosiklin diğer antibiyotiklere göre daha fazla yağ içinde çözülerek biyofilm içine girebilmekte ve daha etkili bir tedavi gerçekleştirilmektedir (6). Aslında, biyofilmlerde canlı bakteriyel hücre sayımı için ATP-biyoluminans kullanılarak yapılan araştırmalarda, tetrasiklin türevlerinin diğer antibiyotiklerle kombine kullanıldığında en yüksek sinerjistik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (61). Akne tedavisinde ideal yaklaşım, *P. acnes*' in yaşadığı piloseböz ünitenin fiziko-kimyasal çevresini değiştirmektir. Örneğin, piloseböz bez içerisindeki hücresel profilerasyon ve farklılaşmayı kontrol eden bir ajan, tedavide etki gösterebilir. Ek olarak, benzoil peroksit radikali oluşturan ürünler, biyofilm matriksinin yer aldığı mikro çevrede çok daha önemli değişiklikler yapabilir gibi görünmektedir (62). Tedavide kullanılan isotretinoin sebasöz bez boyutunu değiştirdiğinden biyofilm de etkilenmekte, tedaviyle biyofilm bir kere değiştirilince, isotretinoin öncesi şartlara benzer bir çevrenin

tekrar oluşturulması mümkün olmayabilir, belki bu durum da isotretinoinin uzun süren etkisini açıklayabilir.

Dental plaklar (63) ve otitis media hastalarında (64) biyofilmin, bakteriyofaj varlığı, protein ekspresyonu, antibiyotik direnci, adheziv özellikler oluşumunda fonksiyon sahibi olduğu *Streptococcus mutans*, (62) *Staphylococcus epidermidis* (61) ve *Escherichia coli* (65) üzerinde gösterilmiştir. Akne benzer çalışmalar, *P. acnes*' i farklı mikro çevresel etkenler açısından değerlendirebilir. Bu etkenler arasında, oksijen basıncı, pH seviyesi, besin elde edilebilirliği, antibiyotik veya benzoil peroksit radikallerinin varlığı gibi durumlar yer alabilir. Foliküler kısma *P. acnes*' in bağlanmasını azaltan bir ajan biyofilm üretimini durdurabilir. *P. acnes*' in ekstrasellüler matriks üretebilme yeteneğini değiştirebilecek herhangi bir ilaç akne tedavisinde etkili olabilir (6). Bakterinin antibiyotik duyarlılık testinde hassas olmasına rağmen tedaviye yanıt alınamaması gibi nedenlerle tedavi arayışları devam etmektedir.

Holmberg ve ark. (5) çalışmasında invaziv enfeksiyon etkeni olarak saptanan, enfekte kalça ve diz eklem protezlerinden izole edilen *P. acnes* kökenleri, kontrol kökenlere kıyasla daha yüksek miktarlarda biyofilm üretmişler ve aralarındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışmamızda sağlıklı kontrol ve akne hastalarının lezyonlarından izole edilen kökenler arasında biyofilm üretimleri açısından herhangi bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda kullanılan gül yağı ve absolut türevinin antibiyofilm etkinliğine bakıldığında, absolut türevinin herhangi bir antibiyofilm etkinliği göstermediği saptanmıştır. Esansiyel gül yağı için ise, biyofilm yoğunluğunda ciddi bir azalma olduğu gözlemlenmiş, istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanılmış, ikiden fazla değer kıyaslandığı için p değeri için Bonferroni düzeltilmesi yapılmış ve $p < 0.0033$ anlamlı kabul edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda da, ilk beş konsantrasyondaki azalma istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. ($p < 0.0033$) Dolayısıyla, gül yağının %4, %2, %1, %0.5 ve %0.25'lik konsantrasyonlarda *P. acnes*' in biyofilm üretimini azalttığını söyleyebiliriz.

Akne vulgaris patogenezinde sebum üretiminin artışının quorum sensing ve oto indükleyici (AI)-2 moleküllerinin üretilmesi ile biyofilm üretiminde artışa neden olduğu gösterilmiştir. (4) Biyofilm fonksiyonlarından biri de bakterilerin birbirlerine tutunmalarını sağlamaktır. Aralarındaki quorum sensing sistemi de bu virülans faktörünü artırmaktadır. Esansiyel gül yağı türevinin antibiyofilm etkinliği de quorum sensing sistemi inhibisyonu ile gerçekleşmiş olabilir.

Akne vulgariste antibiyotik tedavisi ilk olarak 1960'lı yıllarda başlamıştır. Zaman içinde akılcı antibiyotik kullanımının tam olarak gerçekleşmemesi nedeniyle *P. acnes*'te antibiyotik direnci gelişmeye başlamıştır. Bildirilen ilk direnç 1979'da ABD'de bir akne vulgaris hastasından izole edilen bir *P. acnes* kökeninde eritromisine karşı saptanmış ve daha sonra Avrupa ve Uzak Doğu'dan da dirençli kökenler bildirilmeye başlanmıştır (3).

Leyden ve arkadaşlarının 1976 yılında binden fazla akne hastalarından izole ettikleri *P. acnes* kökenlerinde tetrasiklin direnci saptanmaması üzerine, bu antibiyotik yıllarca kullanılmış, ancak 1983 yılında, yine ABD'de aynı araştırmacı tarafından ilk tetrasiklin dirençli *P. acnes* kökeni izole edilmiştir (66).

1991-1997 yılları arasında İngiltere'de belirli bölgelerde dirençli köken taşıyan hasta sayısının %60'lara kadar çıktığı gözlenmiştir. 1989-1999 yıllar arasında muhtemelen tedavi protokolünde yapılan değişimlerle dirençli köken kolonizasyonunda azalma görülse de, 2000'li yıllarla birlikte dirençli *P. acnes* kökenlerinde yeniden artış gözlenmiştir (3).

Coates ve ark. (67) çalışmasında dirençli köken oranlarının genç hastalarda nispeten düşük görülmesinin, doktorların hastalığın başlangıç evrelerinde antibiyotik kullanmamalarının sonucu olabileceği belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızdaki hastaların %86'sı 15-24 yaş aralığında yer almaktadır. Hastalarımızdan izole edilen tek bir kökende sadece klindamisine

direnç saptanmıştır. Bu kökenin izole edildiği hastamız 20 yaşındadır. Hastalarımızın çoğunluğunun genç olması ve kökenlerin çok büyük oranda duyarlı olması da Coates'in verisiyle uyumludur.

Uzun süre antibiyotik kullanımına rağmen bazen istenilen düzeyde klinik yanıt alınamamakta ve direnç oranının da artmasıyla, alternatif tedavi arayışları hız kazanmaktadır. Biz de çalışmamızda, gül yağı ve absolut türevinin antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra antibiyofilm etkinliğini test ettik. İlk olarak 5 µl saf esansiyel gül yağı ve absolut steril disklerle emdirilerek disk difüzyon yöntemiyle zon çapı oluşumu tespit edildi. Esansiyel gül yağının antibakteriyel etkinliğine baktığımızda, disk difüzyon yöntemi sonucunda en küçük ortalama disk zon çapı 16.5 mm iken, en büyük disk difüzyon çapı 44 mm olarak ölçülmüştür. Agar dilüsyon yöntemiyle yapılan MİK değeri tespiti çalışması sonucunda da, bütün kökenler için MİK değeri %2 olarak saptanmıştır. Elimizde esansiyel gül yağı ve *P. acnes* için yapılmış standardizasyon verileri bulunmadığı için belirli değerlere bakarak hassas veya dirençli denmese bile %2'lik konsantrasyonda bakteri ölümünün gerçekleşmesi ve disk difüzyon yönteminde bütün kökenlere karşı zon çapının oluşması nedeniyle hassas olarak kabul edilmiştir.

Literatürde esansiyel gül yağı ve absolut türevinin *P. acnes* üzerine etkisinin birlikte çalışıldığı başka bir çalışmaya biz rastlamadık. Yuangang Zu ve ark (57), esansiyel gül yağının *P. acnes* üzerinde antibakteriyel etkinliğini göstermişlerdir (Zon çapı= 16.5±0.5, MİK: 0.0031). Ancak, bu çalışmada sadece tek bir köken (*P. acnes* CMCC 6502, China General Microbiological Culture Collection Center) kullanılmıştır. Çok daha fazla kökenle, in vitro ve in vivo çalışmalar özellikle esansiyel gül yağı için ümit verici olabilir. MİK değeri %2 iken, antibiyofilm etkinlik için MİK değeri %0.25 olarak saptadığımız için, %2 esansiyel gül yağı içeren bir krem, topikal olarak kullanıldığında antibakteriyel aktivite gösterebilir. Ayrıca, biyofilm etkinliğinin anlamlı saptandığı en düşük doz olan %0.25'lik esansiyel gül yağı içeren bir krem dahi, antibiyofilm etkinliği sayesinde oral bir antibiyotik verildiğinde antibiyotiğin penetrasyonunu artırarak daha hızlı klinik yanıt alınmasına olanak sağlayabilir. Çalışmamız, ülkemizde gençlerde çok sık görülen,

depresyon, sosyal kaygılar gibi ciddi problemlere neden olan akne vulgaris hastalığına karşı, yine ülkemizde bolca yetiştirilen gülden elde edilen gül yağının tedavide kullanımının araştırılmasına ve belki de yeni ilaçların geliştirilmesine yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Zaenglein AL, Thiboutot DM. Acne Vulgaris In: Dermatology. Eds: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini PR. (1). 2003; 532- 543
2. Cotterill JA, Cunliffe WJ. Suicide in dermatological patients. Br J Dermatol, 2003; 137 (2): 246-250
3. Nord CA, Oprica C. Antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes*. Microbiological and clinical aspects. Anaerobe 2006; 12: 207-210.
4. Lwin SM, Kimber I, McFadden JP. Acne, quorum sensing and danger. Clin Exp Dermatol, 2014; 39(2):162-167
5. Holmberg A, Lood R, Soderquist B, Collin M, Christtensson B, Rasmussen M. Biofilm formation by *Propionobacterium acnes* is a charecteristic of invasive isolates. Clin Microbiol Infect Dis, 2009; 1: 787-795
6. Burkhat CN, Burkhat CG. Microbiology's principle of biofilm as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. Int J Dermatol, 2003; 42: 925-927
7. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(4): 999-1007
8. Tom Coenye, Elke Peeters, Hans J. Nelis. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. Res Microbiol, 2007; 158 (4); 386-392
9. Tom Coenyea, Gilles Brackmana, Petra Rigolea, Evy De Wittea, Kris Honraetb, Bart Rosselb, Hans J. Nelisa. Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. Phytomedicine, 2012; 19 409– 411
10. Ulusoy S, Boşgelmez-Tinaz G, Seçilmiş-Canbay H. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute. Curr Microbiol. 2009; 59(5):554-8.
11. Dreno B, Poli F. Epidemiology of acne, Dermatology, 2003; 206 (1): 7-10
12. Rzany B, Kahl C. Epidemiology of acne vulgaris, J Dtsch Dermatol Ges, 2006; 4(1): 8- 9

13. Odom RB, James WD, Berger TG. Acne Vulgaris. In: Andrew's Diseases of the skin: Clinical Dermatology. 9th ed, WB Saunders Co. : pp. 284- 292; Philadelphia, 2000.
14. Ballanger F, Baudry P, Guyen JM, Kahmmari A, Dreno B. Heredity: prognostic factor for acne, *Dermatology*, 2006; 212(2): 145- 149.
15. Voorhees JJ. Nodulocystic acne as a phenotypic feature of the XYY genotype. *Arch Dermatol*, 1972; 105: 913
16. Pawin H, Beylot C, Chivot M, Faure M, Poli F, Revuz J, Dreno B. Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. *Eur J Dermatol*, 2004; 14: 4-12
17. Erkin G, Boztepe G. Akne vulgaris. *Hacettepe Tıp Der*, 2004; 35: 207-211
18. Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, Rosenfield R. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol*, 2005; 14(2): 143- 52
19. Acne. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, 2013,
http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Acne/default.asp
20. R.H. Champion, Rook/ Wilkinson/ Ebling. *Textbook of Dermatology*. Ed: Burton JL, Burns T, Breatnach S (3). p: 1940
21. Guy R, Kealey T. The effects of inflammatory cytokines on the isolated human sebaceous infundibulum. *J Invest Dermatol*, 1998; 110: 410-5
22. Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimis G, Gilliland K, Hagari S. Activity of the type 5- alpha- reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol*, 1995; 105: 209-214
23. Canale D, Caglieresi C, Moschini C, Liberati CD, Macchia E, Pinchera A, Martino E. Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clin Endocrinol*, 2005; 63 (3): 356- 61
24. Blauer M, Vaalasti A, Pauli SL, Ylikomi T, Joensuu T, Tuohimaa P. Localisation of androgen receptor in human skin. *J Invest Dermatol*, 1991; 97: 264-8

25. Freinkel RK, Strauss JS, Yip SY, Pochi PES. Effect of tetracycline on the composition of sebum in acne vulgaris. *N Engl J Med*, 1965; 273: 850- 854
26. Marples RR, Downing DT, Kligman AM. Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol*, 1971; 56: 127- 131
27. Webster GF, Leyden JJ, Muson RA. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to killing and degradation by human neutrophils and monocytes in vitro. *Infect Immun*, 1985; 49: 116-21
28. Eady EA, Ingham E. *Propionibacterium acnes* – friend or foe? *Rev Med Microbiol*, 1994; 5: 163- 73
29. Cummins CS. Identification of *Propionibacterium acnes* and Related Organisms by Precipitin Tests with Trichloroacetic Acid Extracts. *J Clin Microbiol*, 1975; 2(2): 104–110
30. Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl Environ Microbiol*, 1979; 38(4): 585–589.
31. Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wezer A, Strittmatter A, Hujer S, Düre P, Gottschalk G. The Complete Genome Sequence of *Propionibacterium Acnes*, a Commensal of Human Skin, *Science*, 2004; 305; 671- 673
32. McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney M. M, Glenn V. J, Mclorinan C.G, Bhatia A, Maisonneuve JF, Lodes M, Persing H.D, PATrick S. *Propionibacterium acnes* Types I and II Represent Phylogenetically Distinct Groups, *J Clin Microbiol*, 2005; p: 326- 334
33. Cohen R J, Shannon A B, Mcneal J E, Shannon T, Garrett L K. *Propionibacterium acnes* associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution? *J Urol*, 2005; 173:1969- 1974
34. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji* 8. Basım. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1993; 340-341.

35. *Propionibacterium acnes*, 2011,
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Propionibacterium_acnes
36. Meile L, Le Blay G, Thierry A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol*, 2008; 126: 316-320
37. Bojar RA, Holland KT. Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol*, 2004; 22(5): 375-379.
38. Beylot C. Mechanisms and causes of acne. *Rev Prat* 2002; 52(8): 828-830
39. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger BC, Winn WC. *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology* 6th ed. J.H. Philadelphia, Lippincott, 2006.
40. Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, S. O'Hagan S, Wisdom GB, Fairley D, Bhatia A, Maisonneuve J-F, Lodes M, Persing DH, Patrick SP. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiology*, 2005; 151: 1369-1379.
41. Brüggeman H. Insights the pathogenic potential of *Propionibacterium acnes* from its complete genome. *Semin Cutan Med Surg* 2005; 24(2): 67-72
42. Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V, Tosti G, Katsambas A, Galvan Pérez Del Pulgar JI, Rollman O, Török L, Eady EA, Cove JH. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol* 2003; 148(3):467-478.
43. Çetin ES, Günes H, Aynali A, Kaya S, Arıdoğan BC, Demirci M. Makrolid- Linkozamid-Streptogramin B Direnci Gözlenen Klinik Stafilokok İzolatlarında Fusidik Asidin İn-vitro Aktivitesinin Belirlenmesi. *Ankem Derg* 2008; 22(2):59-63.
44. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Veterinary Medicines Evaluation Unit: Antibiotic Resistance in the European union associated with therapeutic use of veterinary medicines, report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products*, 14 July 1999.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf

45. Jousimies-Somer HR, Summanen P., Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. California: Star Publishing Co; 2002
46. Öztürk R. İnfeksiyon Hastalıklarında Laboratuvar Tanı. Klinik Gelişim, 2007; 20(4): 19-35.
47. Kato N, Kato H. Molecular detection and identification of anaerobic bacteria. J Infect Chemother 1997; 3: 5-14.
48. Susanna KP Lau, Patrick CY Woo, Ami MY Fung, King-man Chan, Gibson KS Woo, Kwok-yung Yuen. Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. J Med Microbiol, 2004; 53: 1247-1253.
49. Kaul VK, Singh V, Singh B Damask rose and marigold: prospective industrial crops. J Med Aromat Plant Sci, 2000; 22: 313–318
50. Kürkçüoğlu M, Başer KHC Studies on Turkish rose concrete, “absolute and hydrosol”. Chem Nat Comp, 2003; 39: 457–464
51. Boskabady MH, Kiani S, Rakhshandah H Relaxant effects of *Rosa damascena* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). J Ethnopharmacol, 2006; 106:377–382
52. Kheirabadi M, Moghimi A, Rakhshande H, Rassouli MB Evaluation of the anticonvulsant activities of *Rosa damascena* on the PTZ induced seizures in wistar rats. J Biol Sci, 2008; 8: 426–430
53. Tabrizi H, Mortazavi SA, Kamalinejad M, An in vitro evaluation of various *Rosa damascena* flower extracts as a natural antisolar agent. Int J Cosmet Sci, 1993; 25: 259–265
54. Kovatcheva-Apostolova E, Milen G, Mladenka I, Leif S, Anja R, Mogens A, Extracts of plant cell cultures of *Lavandula vera* and *Rosa damascena* as sources of phenolic antioxidants for use in foods. Eur Food Res Technol A, 2008; 227:1243–1249
55. Arıdoğan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Ozbasar D, Mumcu E Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch Pharm Res, 2002; 25: 860–864

56. Gochev V, Wlcek K, Buchbauer G, Stoyanova A, Dobрева A, Schmidt E, Jirovetz L, Comparative evaluation of antimicrobial activity and composition of rose oils from various geographic origins, in particular Bulgarian rose oil. *Nat Prod Commun*, 2008; 3: 1063–1068
57. Yuangang Zu, Huimin Yu, Lu Liang, Yujie Fu, Thomas Efferth, Xia Liu, Nan Wu. Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Molecules*, 2010; 15: 3200-3210
58. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard- Seventh Edition; M11-A7 (27);2, CLSI 2007
59. Tunçkanat F, Anaerob bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri, *Ankem Dergi*, 1991; 13(3): 325-331
60. Burkhart CN, Burkhart CG, Gupta AK. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment due to existence of fungal biofilm. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: 629–31
61. Monzon M, Oteiza C, Leiva J, Amorena B. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 793–801.
62. Burkhart CN, Specht K, Neckers D. Synergistic activity of benzoyl peroxide and erythromycin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2000; 13: 292–296.
63. Land AS, VanDerMei HC, Busscher HJ. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res* 1997; 11: 528–538.
64. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*, 2002; 287: 1710–1715.
65. Corbin BD, McLean RJ, Aron GM. Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. *Can J Microbiol*, 2001; 47: 680–684.
66. Eady EA, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WI. Erythromycin resistant propionibacteria in antibiotic treated acne patients: association with therapeutic failure. *Br J Dermatol*, 1989; 121: 51-7.

67. Coates P, Vyakrnam S, Eady EA et al. Prevalence of antibiotic resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol*, 2002; 146: 840–848.