

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İN VİVO ORTAMDA QS İNHİBİTÖRLERİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE DOKULAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN SAPTANMASI**

Dr. Ayşe Gül ERGÜN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Selçuk KAYA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından
3172-TU1-12 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No:

2013 ISPARTA

TEŞEKKÜR

Öngörüsüne, yerinde tespitlerine, tecrübelerine ve değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, çok değerli hocam Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN'a, ihtisas sürem boyunca birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve eğitim sürecime büyük katkıları olan hocalarım; Doç. Dr. Selçuk KAYA, Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN'e, Yrd. Doç. Dr. Süleyman ÖNAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bilgi ve deneyimlerinin yanında, her zaman bana destek olan tez hocam Doç. Dr. Selçuk KAYA'ya ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmanın her aşamasında desteklerini hiç esirgemeyen sayın hocam Veteriner hekim İbrahim ONARAN'a da teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım boyunca laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarım gördüğüm asistan arkadaşlarıma, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zorlu 4 yıllık eğitim sürecinde bana desteklerini hiç eksik etmeyen aileme ve biricik eşim Dr. Osman ERGÜN'e teşekkür eder, kızlarım Nigar ve Havva'dan eğitim sürecim boyunca kendilerine yeterli zaman ayıramadığım için özür diler bundan sonraki süreçte her zaman yanlarında olacağıma söz veririm.

Tezimin her aşamasında ve hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan anneme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

3172-TU1-12 nolu projeme maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Dr. Ayşe Gül ERGÜN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
TABLOLAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.2. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın Epidemiyolojik Özellikleri	4
2.3. <i>P. Aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi.....	5
2.3.1. Konağa Ait Faktörler	5
2.3.2. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri.....	6
2.3.2.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri.....	6
2.3.2.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri	7
2.4. Quorum Sensing (QS).....	10
2.4.1. <i>P. Aeruginosa</i> ve Quorum Sensing	12
2.4.2. QS İnhibitörleri	13
2.4.3. QS İnhibitörlerinin tedavideki yeri	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Hayvanlar ve Gruplar	19
3.2. Deney Protokolü ve Pnömoni Modelinin Oluşturulması:.....	20
3.3. Z-4-Bromo-5-2(5h)Furanone Enjeksiyonu	23
3.4. Azitromisinin Hazırlanması ve Enjeksiyonu	23
3.5. BAL Alınması	24
3.6. Akciğer, Böbrek, Karaciğer Dokusu Alınması	24
3.6.1. Histopatolojik Takip, Boyama ve Değerlendirme	25
3.7. Fare Bal Sıvısında IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 ve IL-19 ELISA Yöntemi ile Değerlendirilmesi	27
3.8. İstatistiki Analiz	31

4. BULGULAR.....	32
4.1. BAL Sıvısında Sitokin Değerleri	32
4.2. Histopatolojik Bulgular	34
5. TARTIŞMA	40
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67

KISALTMALAR

QS	: Quorum Sensing
EMB	: Eozin Metilen Blue
LPS	: Lipopolisakkarit
CFTR	: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
EF2	: Elongasyon faktör 2
AI	: Otoindükleyici (auto-inducer)
AHL	: Açıl homoserin lakton
PAO1	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vahşi suşu
SC	: Subcutan
CFU	: Koloni oluşturan birim
BAL	: Bronko alveolar lavaj
G	: Gauge
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
IL	: İnterlökin
SCID	: Severe combined immune deficient
IFN-γ	: İnterferon gama
MR	: Manyetik rezonans
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
PE	: Pseudomonas elastaz
MAP	: Mitogen activated protein kinase
ERK ½	: Extracellular signal-regulated proteins
STAT	: Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörü
GİS	: Gastro intestinal sistem
KF	: Kistik fibrozis
DPB	: Diffüz panbronşiyolitis
ng	: Nanogram
ml	: Mililitre
μg	: Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın morfolojik yapısı.....	3
Şekil 2. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın pili yapısı.....	6
Şekil 3. <i>P. Aeruginosa</i> 'da Alginat Biyosentezi Yolu ve Rol Oynayan Enzimler.....	7
Şekil 4. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın hücre içi ve dışı virülans faktörlerinin şematik özeti.....	9
Şekil 5. QS işleyiş mekanizmasının şematik özeti.....	12
Şekil 6. <i>P. Aeruginosa</i> 'nın quorum sensing sistemi aşamaları H.D, hücre dışı; H.İ, hücre içi.....	12
Şekil 7. Halojenize furanon bileşikleri.....	15
Şekil 8. QS modelleri ve sinyal engelleme mekanizmaları.....	18
Şekil 9. Gruplara göre histopatolojik veriler grafiği.....	36

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Farelerin laboratuvar ortamındaki görüntüleri	20
Resim 2. Fareleri 45 ⁰ eğimli pozisyonda yerleştirdiğimiz mekanizma.....	20
Resim 3. Farelerin cerrahiye hazırlanması	21
Resim 4. İntratrakeal instilasyon için trakeanın cerrahi olarak hazırlanma aşamaları.	22
Resim 5. Trakeanın anatomik planda kapatılması	23
Resim 6. Furanon ve azitromisin	24
Resim 7. Farenden organ eksizyonu.	25
Resim 8. Platerin stop solüsyonu konulduktan sonraki görüntüleri.....	31
Resim 9. Fare akciğer dokusunun gruplara göre histopatolojik kesitleri. Resimler; Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C-D), Grup 4 (E) ve Grup 5 (F). (H-E, 200X).	35

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Histopatolojik çeteleme tablosu.....	27
Tablo 2. Grupların sıfırncı gün vücut ağırlığı değerleri (Ortalama ± Standart sapma) ve dağılımlarının normallik ve homojenlik anlamlılık düzeyi	32
Tablo 3. Tüm grupların BAL sıvısındaki IL 4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL 19 ortalama değerleri (Ortalama ± Standart sapma)	33
Tablo 4. Grup IV' ün IL 12 değerlerinin diğer gruplar ile karşılaştırılması ve gruplar arasındaki anlamlılık düzeyi.....	34
Tablo 5. Farelerin akciğer dokusu histopatolojik değerlendirme özetleri.....	37
Tablo 6. Grupların Akciğer hasar skoru değerleri ve gruplar arasındaki anlamlılık durumu	37
Tablo 7. Grup 2, 3, 4 ve 5'in peribronşial nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi	38
Tablo 8. Grup 2, 3, 4 ve 5 in perivasküler nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi	39
Tablo 9. Grup 2, 3, 4 ve 5 in perivasküler nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi	39

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en önemli insan patojenidir. Aerob, nonfermentatif, gram negatif bir çomak olan *P. Aeruginosa*, ilk kez 1882'de Gessard tarafından irinli materyalden izole edilmiştir. Toprakta, suda ve organik yüzeylerde yaygın olarak bulunabilen bakteri, fırsatçı tipte enfeksiyonlara yol açar (1). Bu organizma nazokomiyal enfeksiyonların majör bir nedenidir ve başta kistik fibrozis olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonlarından sorumludur (2).

P. Aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Enfeksiyonların ilk basamağı kolonizasyondur, konak savunmasının bozulduğu ve bağışık yanıtın yetersiz kaldığı durumlarda kolonizasyonun ardından genellikle enfeksiyon gelişir.

Sağlıklı bireylerde *P. Aeruginosa* kolonizasyonu nadir olarak görülür, kolonizasyon geliştiğinde ise sıklıkla cilt, bağırsaklar, üst ve alt solunum yolları kolonize olur. Hastanede yatan hastalarda kolonizasyon sıklığı çok daha fazladır. Bağışıklık sistemi zayıflamış hastalar, invaziv uygulamalar (kataterizasyon, entübasyon gibi), geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanımı ve hastanede bir enfeksiyon kaynağının olması kolonizasyon gelişimini kolaylaştırır (3).

P. Aeruginosa'nın virülansında hem hücrel hem de hücre dışı faktörler rol oynamaktadır. Özellikle pili, flagella ve lipopolisakkarit gibi yüzey komponentleri ile konak hücre yüzeyine yapışır ve konak immün yanıtına neden olur. Yapılan pek çok hayvan modelli çalışmada proteazlar (elastaz, alkali proteaz, lasA proteaz ve proteaz 4), toksinler (ekzotoksin A ve ekzoenzim S) ve hemolizinlerin (fosfolipaz ve ramnolipid) *P. Aeruginosa* virülansında rol aldığı gösterilmiştir. Bakterilerin yeni bir çevreye adaptasyonu ve bu çevreyi tanıma, algılama cevabı patogenede önemlidir. Bakteri pek çok mekanizma ile Ph, Besin kaynağı ve popülasyon yoğunluğu gibi çevresel şartları algılar. *P. Aeruginosa*'nın hücre dışı virülans faktörlerinin salınımı Quorum Sensing (QS) olarak adlandırılan hücre yoğunluğuna bağımlı ve “açıl homoserin lakton” sinyal moleküllerinin kullanıldığı bir mekanizma ile kontrol edilip düzenlenmektedir (4, 5).

Her QS sistemi “autoinducer” adı verilen sinyal moleküllerini sentezleyen (LasI ve RhII) ve bunlarla aynı kökenden gelen transkripsiyonel regülatör olarak bilinen (LasI ve RhII) iki bileşenden oluşmaktadır. LasI, autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserin lactone (3OC12-HSL) molekülünü sentezlerken, RhII, autoinducer N-butyryl homoserin lactone (C4-HSL) molekülünü sentezlemektedir. Hücre yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda 3OC12-HSL ve C4-HSL kritik seviyelere ulaşır ve farklı virülans faktörlerinin transkripsiyonunu arttıran bu regülatörleri aktive eder (6,7).

Çevreyi algılama sisteminin engellenmesi multi antibiyotik dirençli bakterilerle savaşmada yeni bir umuttur. Bakterisidal ve bakteriyostatik stratejilerden ziyade bakteriyel çevreyi algılama sistemlerinin engellenmesi, gıda teknolojisi, tarım ve tıp gibi çok farklı alanlarda talep görebilir (8). Bundan dolayı bu konuda her gün yeni tedavi modalitelerinin oluşturulmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bu konuda karşılaşılan en büyük sıkıntı bulunan tedavi modalitelerinin gerek etik gerekse de kanuni yönden direkt olarak insan üzerinde uygulanamamasıdır. Bu durumda araştırmacılar hayvan modellerini kullanmaktadırlar. Bu konuda insan akciğer morfolojisini ve patolojisini en güzel taklit eden ve çalışması kolay olan hayvan modeli immün yetmezlikli fare olan BALB/C üzerinde oluşturulabilmektedir. Bu çalışma, in vivo ortamda *P. Aeruginosa* tarafından oluşturulan enfeksiyon modellerinde, QS inhibitörlerinin etkinliğinin araştırılması ve bu inhibitörlerin doku üzerinde etkilerinin saptanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *P. Aeruginosa*'nın Mikrobiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa; 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olabilen basil veya kokobasil morfolojisinde bakterilerdir (Şekil 1). Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor oluşturmazlar. Gram negatif olarak boyanır. Tek polar flagellası ile hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flagella bulunabilir (9).



Şekil 1. *P. Aeruginosa*'nın morfolojik yapısı.

Zorunlu aerobtur, ancak oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO₃ varsa yaşamını devam ettirir. En iyi 37°C'de olmakla beraber, 20-42°C arasındaki ısılarda üreyebilir. Tek karbon kaynağı olarak çok fazla sayıda substratı kullanabilmesi sayesinde birçok besiyerinde üreyebilir. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolayca üredikleri için izolasyonları kolaydır. *P. aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virülansı daha yüksek olan diğer tipte alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir. Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondulan

yapıda koloniler oluşturur. Bazıları hücre dışına alginat salgıladıklarından mukoid koloniler yapar (10). Genellikle β hemoliz oluştururlar. Eozin Metilen Blue (EMB), McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. Besiyerinde kendine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2-aminoasetofenon'a aittir ve *P. Aeruginosa*'ya özgüdür (11,12).

Karbonhidratları fermente etmez ama glukoz, fruktoz ve ksilozdan oksidatif metabolizma ile asit oluşturur, laktoz ve sükrozdan asit oluşturmaz. Oksidaz testi güçlü pozitifdir, 42°C'de üreyebilmesi ile *P. fluorescens* ve *P. putida*'dan ayrılır. Asetamid alkalinizasyonu pozitifdir, nitrat ve nitriti denitrifiye eder, Simmon's sitrat besiyerinde üreyerek pozitif reaksiyon verir, hidrojen sülfid üretimi negatiftir. L-arjinin dehidrolaz testi pozitif, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz testleri negatiftir. Polar yerleşimli flageli sayesinde hareketlidir. Kırk beş-elli derece ısıya kadar dirençlidir. Distile suda dahi üreyebilir. Düşük pH değerlerinde (pH < 4,5) üreyemez.

2.2. *P. Aeruginosa*'nın Epidemiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa nemli ortamı sever. İnsanda perine, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşir. Solunum cihazları, temizlik solüsyonları, ilaçlar, dezenfektanlar, küvetler, paspaslar yerleşim yerleridir. Bulaş yüzme havuzu, jakuzi, sauna, kontak lens solüsyonları gibi hastane dışında su ile ilgili kaynaklardan da olabilir (13).

Pseudomonas türleri insanların normal florasında yer alabilir (14). Deride %0,2, burun mukozasında %0-3,3, boğazda %0-6,6, dışkıda %2,6-24 oranında görülebilir. Hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bakteri, hastanede yatan yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde, antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılığı olabilmektedir (15).

Hastane enfeksiyonuna yol açan suşların toplum kökenlilerden farkı; hastane ortamında yaşamlarını sürdürebilmeleri, hastane personelinin deri ve mukozalarında

kolonize olmaları, çeşitli yüzeylerde canlılıklarını koruyabilmeleri ve antibiyotik tedavilerine bazen de antiseptiklere direnç gösterebilmeleridir (16, 17). Yapısal olarak dirençli olması ve yeni direnç mekanizmalarını edinebilmesi, mikroorganizmaya hastane ortamında canlılığını sürdürebilmesi bakımından bir üstünlük sağlar (18).

2.3. *P. Aeruginosa* Enfeksiyonlarının Patogenezi

P. Aeruginosa enfeksiyonları genellikle konak immün sisteminde bir defekte neden olan travma, cerrahi, yanık ya da katater uygulamaları gibi sekonder durumların normal cilt ya da mukozal yüzeylerin bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu durumlarda gelişmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, normal mukozal florayı baskılayabilir veya nötropeni, kistik fibrozis, AIDS gibi durumlarda savunma mekanizmalarının bozulmasına neden olabilir. Bunların sonucunda bakteri kolonizasyon imkânı sağlayabilir (19).

Kolonizasyon sonrasında üretilen birçok hücre dışı virülans faktörleri doku hasarı, kan dolaşımına karışma ve yayılıma neden olur. In vivo çalışmalarla ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz ve alkali proteazın *P. Aeruginosa*'nın virülansının en yüksek seviyede sergilenebilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Özetle *P. Aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi konağa ait faktörler ve bakterinin kendi virülans faktörleri rol oynar ve enfeksiyonların patogenezinin anlaşılabilmesinde iki durumda göz önüne alınmalıdır.

2.3.1. Konağa Ait Faktörler

Bir kişinin genel sağlık durumu ve immün sisteminin direnç kapasitesi enfeksiyonlara karşı korunmada önemlidir. Örneğin vücudun cilt ve mukoza gibi anatomik bariyerlerinde oluşabilecek bir bozulma kişiyi enfeksiyon etkenlerine açık hedef haline getirecektir. Ayrıca kompleman proteinleri (opsoninler, anafilatoksinler), akciğer sürfaktanı, sitokinler, kemokinler, kollektin ailesi proteinler (sürfaktan protein A ve D), polimorfonüveli lökositler gibi immün sistem

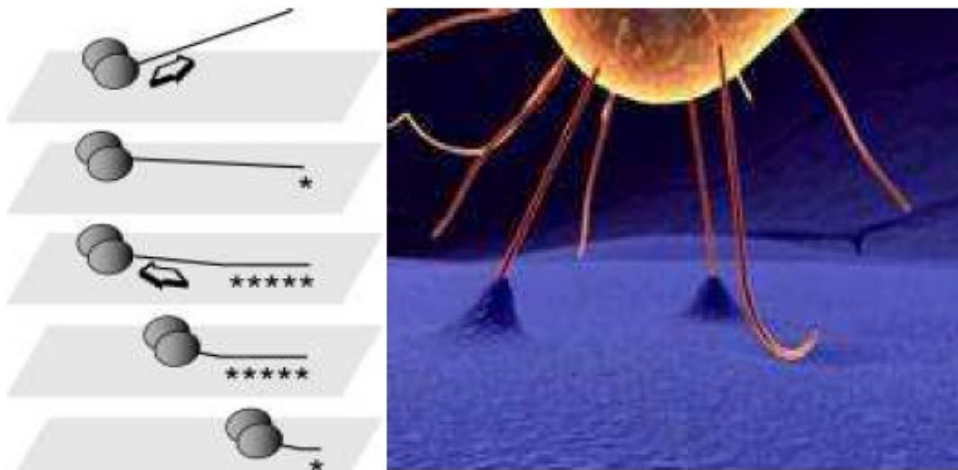
komponentleri enfeksiyonlara karşı gösterilen dirençte ana rollerden birine sahiptirler (20). Epitel yüzeyi üzerinde yer alan mûsin tabakası bakterinin adezyonunu engelleyen bir savunma mekanizmasıdır (21).

2.3.2. *P. Aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

2.3.2.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri

Flajel: *P.Aeruginosa*'nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve *P.Aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Flajel patogeneizde kritik role sahiptir, asiolaGM1 gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar. Flajel *P.Aeruginosa*'nın kolonizasyonunun başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (22).

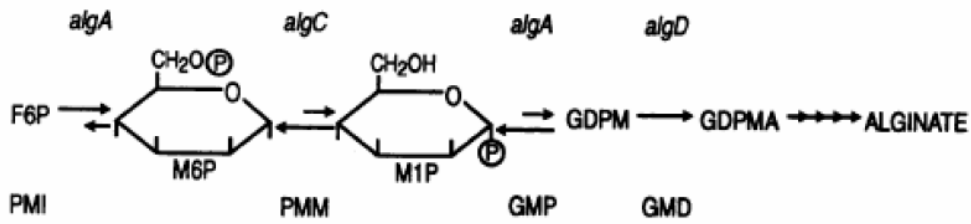
Pili (Fimbriae): *P.Aeruginosa*'nın kısa, filamantöz yüzey uzantılarıdır (Şekil 2). Çoğunlukla çoklu pililer mevcuttur ve pililer *P.Aeruginosa*'da seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. *P.Aeruginosa*'nın pilileri bakteriyel harekette rol alan nadir prokaryotik piluslardandır. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Flajel gibi pililer de epitel hücre yüzeyinde asioloGM1 yapılarına bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar (23).



Şekil 2. *P. Aeruginosa*'nın pili yapısı.

Lipopolisakkarit (LPS): *P. Aeruginosa*'da dış membranın iç yüzü tipik çift katlı fosfolipid tabakaya benzese de, dış membranın dış yüzü başlıca lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmaktadır. LPS tabaka, fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-spesifik polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Farklı O-spesifik polisakkarit zincirleri, esas olarak *P.aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır. LipidA komponenti ise pek çok pro-inflamatuvar yolakta aktiftir (24). LPS tabaka, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerinin tanınması ve asialoGM1 veya CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reseptörlerine bağlanması aracılığıyla adezyonda rol alan önemli bir virülans faktörüdür (25).

Aljinat: Aljinat, *P.aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır, tekrarlayan mannuronik asit ve glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Aljinat, LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P.Aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar. Aljinatın aşırı üretimi *P.aeruginosa*'yı fagositozdan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (26). *P aeruginosa*'da aljinat biyosentezinin basamakları ve rol oynayan genler ile bu genlerin kodladığı enzimler Şekil 3 de gösterilmiştir.



Şekil 3. *P Aeruginosa*'da Aljinat Biyosentezi Yolu ve Rol Oynayan Enzimler.

2.3.2.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

Elastaz: Elastaz, LasA (serine proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) olarak iki formda bulunan ve *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastini sinerjistik olarak parçalayabilen enzimdir. Virülansla ilişkisi açık olan bu enzim elastin içeren dokularda ve akciğer parankiminde hasara neden olmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun yayılması ile ilişkili olarak hemorajik lezyonlardan (ektima gangrenozum)

sorumludur. Bu enzimler (Las A ve Las B) kompleman bileşiklerini parçalar ve nötrofillerin kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederler. Böylece akut enfeksiyonlarda doku hasarına ve daha fazla yayılıma sebep olurlar (27,28).

Alkali Proteaz: Elastaz benzeri bir protein olan alkale proteaz ise doku hasarına ve *P. aeruginosa* enfeksiyonunun yayılmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda konağın immün cevabına engel olmaktadır. Her iki enzim (elastaz ve alkale proteaz) de deride, akciğerde ve korneada nekrozlar yapar (27,28).

Piyosiyenin: *P.aeruginosa*'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyenin, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patogeneze rol alır (29).

Piyoverdin: Bir siderofordur, çevredeki demiri bağlayarak *P. Aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynar (30).

Proteaz IV: Proteaz IV, *P.aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patogeneze rol alır. Proteaz IV'ün özellikle *P.aeruginosa* keratitinin patogeneze katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda sürfaktan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı aracılığıyla akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de etkili olduğu gösterilmiştir (31).

Fosfolipaz C: Fosfolipaz C, özellikle hemolitik fosfolipaz C, *P.aeruginosa* tarafından tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. *P.aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Patojenik etkilerinin bir kısmı elastaz gibi, sürfaktan inaktivasyonu ile olmaktadır. Konak nötrofil oksidatif patlama yanıtını baskılar (32).

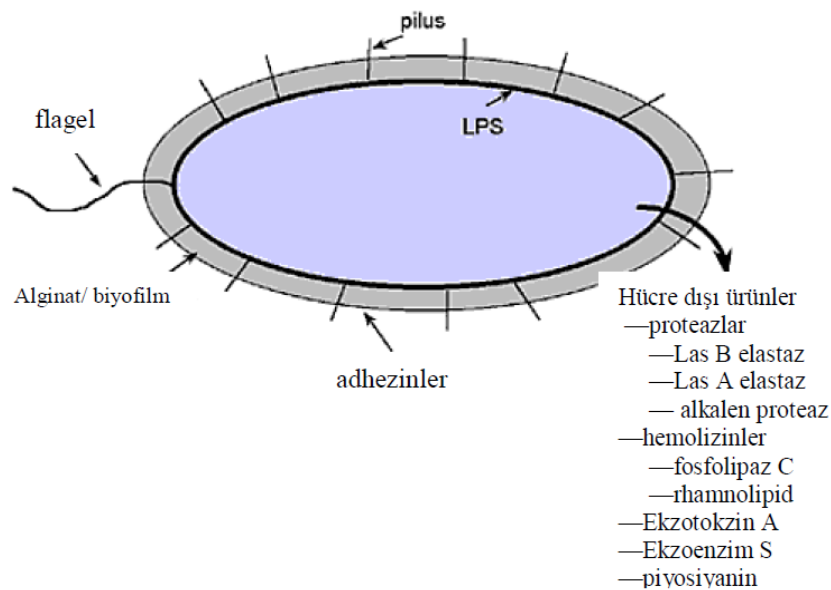
Ramnoflipid: Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer

sümfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (33).

Ekzotoksin A hücre dışı bir enzim olup, *P. Aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından yapılır. Difteri toksini için tanımlanan mekanizma ile ökaryotik hücrelerde (memelilerde) protein sentezini önler. Her iki toksin de adenozin difosfatın transferini katalize eder. Bu reaksiyon elongasyon faktör 2 (EF2) inaktive edilerek protein sentezi inhibe edilir. Ekzotoksin A, 613 aminoasitten oluşan tek bir polipeptit zinciridir. Ekzotoksin A'nın büyük ihtimalle yanık yaralarındaki doku nekrozundan, oküler enfeksiyonlarda korneal hasardan ve kronik akciğer hastalıklarında doku hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Saflaştırılmış ekzotoksin A, hayvanlar için oldukça letaldir. Bu toksin aynı zamanda immünosupresif etkiye sahiptir (köpek ve rhesus maymunlarında).

Ekzotoksin A: Şok yapar. Toksin yapan suşlar, bakteriyemik insan hastalığında, daha virulandır (27).

Yukarıda belirtmiş olduğumuz *P. Aeruginosa*'nın hem hücre içi hemde hücre dışı virülans faktörleri toparlanarak şematik özet olarak Şekil 4' de verilmiştir.



Şekil 4. *P. Aeruginosa*'nın hücre içi ve dışı virülans faktörlerinin şematik özeti

Tip 3 Salgı Sistemi: *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Pseudomonas* türlerinde saptanmıştır. Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. Aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (25).

2.4. Quorum Sensing (QS)

Quorum sensing: Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile birbirleri ile haberleşmeleri ve iletişim kurmalarıdır. QS sözcük olarak bir oturma veya toplantı için gerekli olan en az birey sayısının bir araya gelmesi anlamına gelmektedir. Biyoloji açısından ise, bir bakteri topluluğunda birey sayısı belli bir düzeye ulaştığında ortaya çıkan özel bir tip hücrelerarası iletişim anlamına gelir (34).

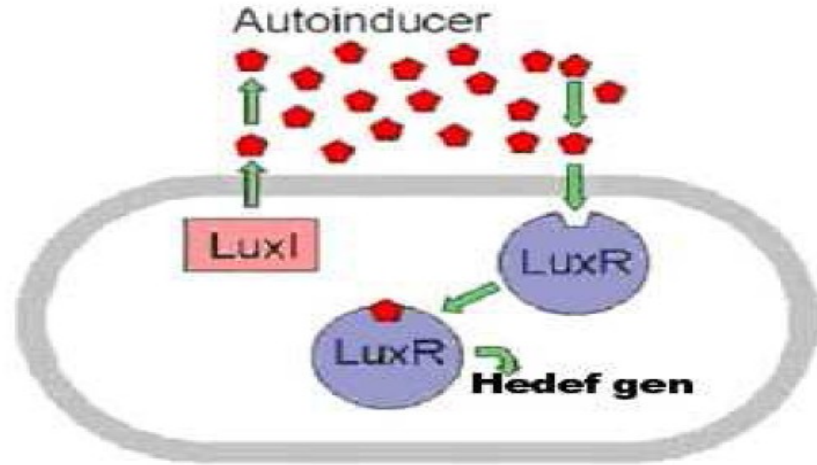
QS, hücre yoğunluğuna bağımlı gen ekspresyonunun kontrolü olarak açıklanabilir (35). Bu tür iletişimin temeli, bakteri hücrelerinin otoindükleyici olarak işlev gören bazı sinyal molekülleri sentezleyerek çevresinde bulunan aynı türden diğer bakterilerin sayısını/yoğunluğunu izlemesine dayanmaktadır (36). Belli bir ortamdaki otoindükleyici yoğunluğu, o ortamda bulunan bakteri sayısı ile doğru orantılıdır. Bu nedenle bir bakterinin ortamdaki otoindükleyici miktarını “hissetmesi” ortamdaki diğer bakterilerin sayısı hakkında fikir sahibi olmasını sağlamaktadır. Otoindükleyicilere karşı bakterinin gen ekspresyonunu değiştirerek yanıt vermesi, bir bakteri topluluğu içinde her bir hücrenin bir diğeri ile koordine bir biçimde davranması sonucunu doğurmaktadır (37). QS moleküllerinin “otoindükleyici” (auto-inducer) (AI) olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (38).

QS sisteminde kilit rol otoinducer'e aittir. Hücre içinde sentezlenen otoinducer ekstrasellüler ortama salınır. Bu otoinducer komşu hücre membranındaki reseptörlerce algılanır. Bu algılanma ise hücre içinde gen transkripsiyonuna kadar giden bir sinyal iletisini başlatır. Oluşan gen ekspresyonu ile de, hücre topluluğu ortak bir yanıt geliştirmiş olur. QS gerçekleşmesi için ekstrasellüler ortamdaki otoinducer'in yeterli düzeye ulaşması gerekir. Bunun için de hücre sayısının artarak

populasyonda belli bir yoğunlaşma sağlanması gereklidir. Hücre sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmadan QS gerçekleşmez. QS sistemi temel olarak gram negatif bakterilerde bir çift regülatör protein ve bir otoindücerden, gram pozitif bakterilerde ise bir prekürsör peptid, ondan oluşan otoindücer peptid, hücre membranında autoindücer peptidi algılayan histidin kinaz reseptöründen oluşur (39).

Farklı mikroorganizma türlerinin genellikle farklı QS molekülleri kullandıkları bilinmektedir. Bu nedenle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar da birbirleri ile anlaşamamaktadır. Sinyal molekülleri “Açıl homoserin lakton (AHL)”, “autoindücer peptidler” ve “autoindücer 2” bileşikler başta olmak üzere birkaç farklı sınıfta incelenmektedir. Her bir sınıf içerisinde yan zincir uzunluk farklılığı gibi küçük değişiklikler söz konusudur. Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır (40).

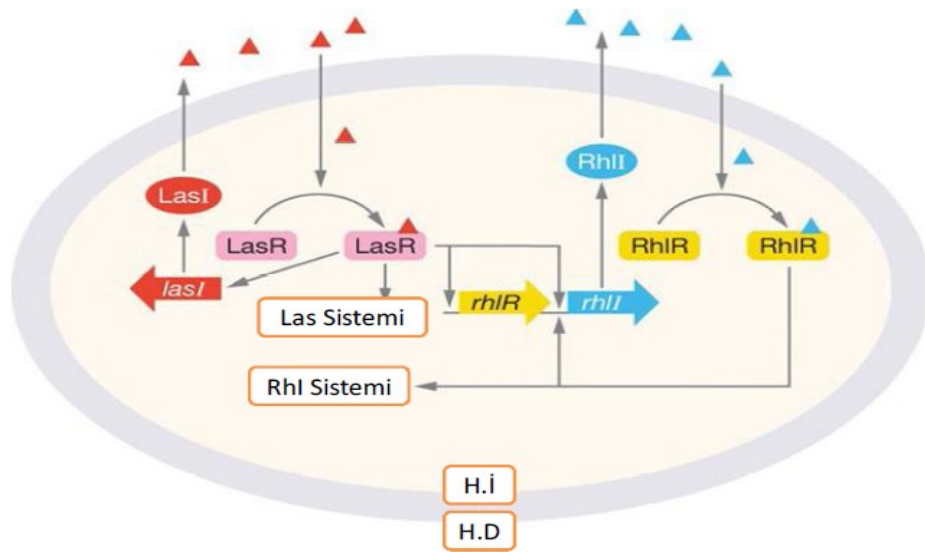
Gram negatif basillerde otoindüksiyon (örneğin, homoserin laktonlar) ilgili LuxI kimyasal reaksiyon ürünleri aracılığıyla sentezlenir, salınır ve sonra bakteri ve bağlarla reseptöre doğru başka bir hücreye hücresel elementle (LuxR) cevap verir. Gram pozitif basillerde AIP'dir. Ayrıca bağa doğru bakteri dış yüzeye yayılır ardından fosforilasyon etkinleştirir, transkripsiyonal değişim başlatılır ve amino asitler ya da kısa peptidler dışarıya bırakılır. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin her ikisinde de taşıyıcı LuxS/Lsr'dir. Otoindüksiyon (örneğin, furanonlar) sentezlenir (örneğin, LuxS ile ilgili kimyasal reaksiyon ürünleri aracılığıyla) salınır ve bakteri ayrıca (örneğin, Lsr taşıyıcısı aracılığıyla) yeniden kaydeder ve genlerin düzenlenmesini yapar (40). QS işleyiş mekanizması şekil 5 de özetlenmiştir.



Şekil 5. QS işleyiş mekanizmasının şematik özeti.

2.4.1. *P. Aeruginosa* ve Quorum Sensing

P. Aeruginosa'nın hücre dışına salgıladığı birçok virulans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili "las" ve "rhl" olarak tanımlanan iki QS sistemi ile kontrol edildiği gösterilmiştir (41). Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (LasA ve Las B), alkalin proteaz, hidrojen siyanid, ekzotokzin A, piyosiyenin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen, ve süperoksit dismutaz başta olmak üzere çeşitli virulans etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (Şekil 6) (42).



Şekil 6. *P. Aeruginosa*'nın quorum sensing sistemi aşamaları H.D, hücre dışı; H.İ, hücre içi

Las B elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de “las sistemi” olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3- oxo- C12 - HSL- L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI sentaz geni) ve *Las R* (“transcriptional activator” proteini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotoksin A gibi diğer ekstrasellüler virulans etmenlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder (43,44).

İkincil QS sistemi olan “*rhl sistem*” ise; *rhl I* (C4 - HSL, AI sentaz geni, kısa zincirli AHL) ve *rhl R* (“transcriptional activator” proteini kodlayan gen)' den oluşur. Rhl AB operonunun (operon: yönetici DNA bölgesi) yapımını kontrol eden bu sistemin, rhamnolipid üretimi için gerekli olan “rhamnosyltransferase” enziminin sentezlemesini düzenlemesinin yanı sıra, Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyenin, siyanid ve alkalin proteazın üretimini de düzenlediği bilinmektedir (42,44).

P.aeruginosa'nın patogenezinde rolü olan virulans faktörleri elastaz, alkali proteaz, LasA proteaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A, rhamnolipid ve piyosiyenin üretimi ve biyofilm oluşumu QS ile bağlantılıdır (45). QS sisteminin *P.aeruginosa* virulansındaki fonksiyonel önemi in vivo hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda açıkça gösterilmiştir (46).

Son yıllarda *QscR* olarak isimlendirilen üçüncü LuxR homologu saptanmıştır. Bu sistemin *LasI* ve *RhlI*'nin transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. *QscR*, çeşitli virulans faktörlerinin üretiminin düzenlenmesinde oldukça önemlidir fakat bu düzenleme *Las* ve *Rhl* sistemlerinin her ikisinin ekspresyonunun kontrolüyle meydana gelmektedir (45). QS moleküllerinin saptanmasında AHL varlığını inceleyen fenotipik (enzimatik) metodların yanı sıra *las* ve *rhl* genlerinin saptanmasında Polimerase Chain Reaction (PCR) temelli moleküler yöntemler kullanılmaktadır (47-49).

2.4.2. QS İnhibitörleri

P.aeruginosa'da QS sistemi tarafından düzenlenen gen ifadesi, bu bakterinin antimikrobiyallere karşı toleransına ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur.

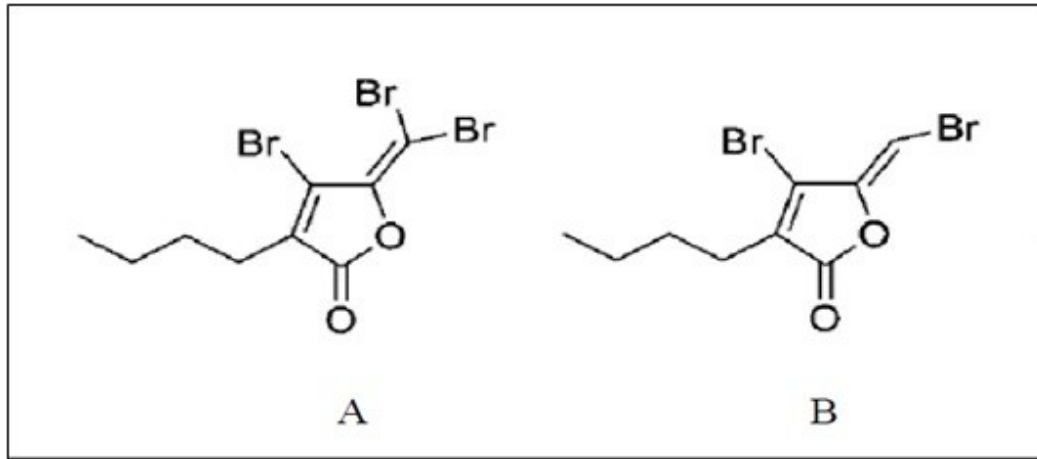
Laboratuvar şartlarında, QS sistemi, sinyal moleküllerinin alımını etkili bir şekilde engelleyen, yeni bir sınıf antimikrobiyal ilaç geliştirmek için yeni bir hedefdir. Hem doğal hem de sentetik orijinli kimyasal kütüphanelerle, tanımlanmış olan birkaç QS inhibitör bileşenlerinin, hayvanların akciğerlerinde meydana gelmiş olan enfeksiyonu yok ettiği ispat edilmiştir. Buna ilaveten, bakteriyel QS sinyal moleküllerini inaktive eden birkaç enzim tanımlanmıştır. Bu inaktivasyonun birkaç modelde, bitki patojenlerinin QS kaynaklı virülensi bloke ettiği de bulunmuştur (50,51).

QS sistemini inhibe eden bileşiklerin bazı özelliklerinin olması önemlidir. QS' i engelleyen ideal bir bileşiğin, virülans genlerinin ekspresyonunda önemli düşüşe neden olan ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküller olması gerekir. Bu inhibitörlerin hem ökaryotik konaklarda hem de bakterilerde toksik yan etkilerinin olmaması gerekir. Ayrıca QS inhibitörlerinin yüksek organizasyonlu konaklara dayanıklı ve kimyasal olarak da kararlı olmalıdır. Bu konuda yapılan araştırmaların başlıca amacı, sinyal molekülünün sentezini inhibe ederek konsantrasyonunu düşürmek veya sinyal molekülünün hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmesini önlemek olarak sayılabilir. Makrolid grubunda yer alan azitromisin QS inhibitörü olduğu belirlenmiştir (52).

Bu ajan, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak polipeptid uzamasını bloke eder ve bunun sonucunda protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir. Azitromisin özellikle *Mycoplasma*, *Legionella* ve *Chlamydia* türleri ile meydana gelen pulmoner enfeksiyonların tedavisinde ya da penisiline alerjisi olan hastalarda Gram pozitif bakteriler ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olup, bu antibiyotiğin antipseudomonal tedavideki yeri yok denecek kadar azdır. Ancak deneysel çalışmalar, uzun süreli azitromisin tedavisinin kistik fibrozisli hastalarda yararı olabileceği yönündedir. Yapılan in-vitro çalışmalar azitromisinin, *P.Aeruginosa*'da elastaz ve rhamnolipid sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (53). Ayrıca azitromisin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu %80 oranında düşürmekte, bunun sonucunda sinyal moleküllerinin sentezi yaklaşık %90 oranında inhibe olmaktadır. Dolayısıyla makrolid kullanımının, sinyal molekül sentezini inhibe ederek kısmen de olsa doku hasarını önleyebileceği düşünülmektedir (53). Bu bulguyu desteklemek amacıyla yapılan çok merkezli bir klinik çalışmada,

altı yaş üzerinde ve bir seneden daha uzun süre *P. Aeruginosa* ile kolonize olan kistik fibrozis'li hastalarda haftada üç gün altı ay boyunca uygulanan azitromisin tedavisinden sonra plasebo grubuna göre hasta grubunda enfeksiyonun şiddetinin azaldığı, pulmoner fonksiyonların iyileştiği ve kilo alımının belirgin ölçüde arttığı saptanmıştır (54).

Üzerinde çalışılan diğer bir QS inhibitörü, deniz otundan elde edilen bir bileşiktir. Deniz otunun biyolojik olarak aktif halojenize furanon ürettiği ve bu furanonun bitki yüzeyinde yer aldığı zaman gerek prokaryotların gerekse ökaryotların bitki yüzeyinde kolonize olamadıkları gözlemlenmiştir. Bu bileşenlerin Gram Negatif bakterilerde AHL kaynaklı çevreyi algılamayı engellediği bulunmuştur. Örneğin; Şekil 7' de A ve B ile gösterilen bileşenlerin, *S. liquefaciens*' te kayma hareketini engellediği Ni ve ark. tarafından bildirilmiştir (55).



Şekil 7. Halojenize furanon bileşikleri

Dacheng Ren ve ark. *E. Coli*' de doğal furanon olan 4-bromo-5-(bromometilen)-3-butil-2' nin, kayma ve biyofilm formasyonu üzerine etkilerini çalışmışlardır. Kayma hareketi ve biyofilm formasyonunun engellenmesinin moleküler temelini göstermek için *V. fischerfnin* mutant suşlarında, furanonların otouyarıcı I ve otouyarıcı II üzerine inhibitör etkisini test etmişlerdir. Bu doğal furanonların belirli miktarlarının *V. fischeri* ve *E. coli*'de otouyarıcı I ve otouyarıcı II yoluyla QS' i engellediğini bulmuşlardır (56).

Manefield ve ark. *E. carotovora*'da yaptıkları çalışmada selüloz, proteaz ve karbapenem üretimi üzerine deniz algi olan *D. pulchra*'dan elde edilmiş olan halojenlenmiş furanonların etkilerini test etmişlerdir. Karbapenem ve ekzoenzim üretiminin düzenlenme mekanizmalarındaki farklılıklara rağmen alga ait metabolitler tarafından engellendiğini bulmuşlardır. Karbapenem üretiminin furanona bağlı engellenmesi, carABCDEFHG operonun, 3-oxo-C6-HSL'ye bağlı ifadesindeki kesintiler sonucu olduğunu göstermiştir (57).

Smith ve ark. *P. Aeruginosa*'da transkripsiyon aktivatör proteini olan LasR'yi etkinleştirme yeteneğine sahip, yeni bir agonist olan 3-oxo-C12-(2-aminosikloheksanol)'yi keşfetmişlerdir. QS aktivatör proteinleri olan LasR ve RhIR'ı tekrar araştırmışlar ve her iki proteinin homoserin laktone bağlanma yerlerinin aynı olduğunu bulmuşlardır. Fakat bu proteinlerin farklı yapısal motiflere sahip olduklarını bulmuşlardır. Bu antagonistlerin virülens faktörleri ve biyofilm oluşumunu azalttığını yani QS'i inhibe ettiğini göstermişlerdir (58).

Juhas ve ark. virülensi ve QS'i düzenleyen dördüncü bir luxI homoloğu dizayn ettiklerini rapor etmişlerdir. AHL sinyal molekülünün üretimini engelleyen VqsR geninin inaktivasyonu, virülens faktörlerin üretimini ve bir nematodun enfeksiyon modelinde *P. Aeruginosa*'nın patojenitesini azalttığını göstermiştir. VqsR'nin *C. elegans* üzerinde virülens etkisine sahip olduğu bulunmuştur (59).

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerin hemen hepsinin fayda sağlamadığı bilinmektedir. C-30'un biyofilm üzerine etkisini araştırmak üzere, *P. Aeruginosa* ile oluşturulan biyofilme C-30 uygulandığında biyofilmin sağlam yapısının bozulduğu belirlenmiştir (60). Kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla kullanılan tobramisin C-30 furanonu ile birlikte biyofilm üzerine olan etkileşimi araştırılmış ve C-30 ile tobramisin birlikte kullanılmasıyla tobramisin biyofilm içine rahatlıkla girebildiği ve bakterilerin %5-10'unu canlı bırakacak şekilde biyofilm oluşturan bakteriler üzerine inhibisyon yaptığı saptanmıştır (60). C-30 ile muamele edilmemiş biyofilme tobramisin uygulandığında ise, tobramisin sadece biyofilmin yüzeyinde yer alan hücreler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan in-vitro deneylerden sonra C-30'un etkinliği in-vivo koşullarda çalışılmıştır. *P. Aeruginosa*

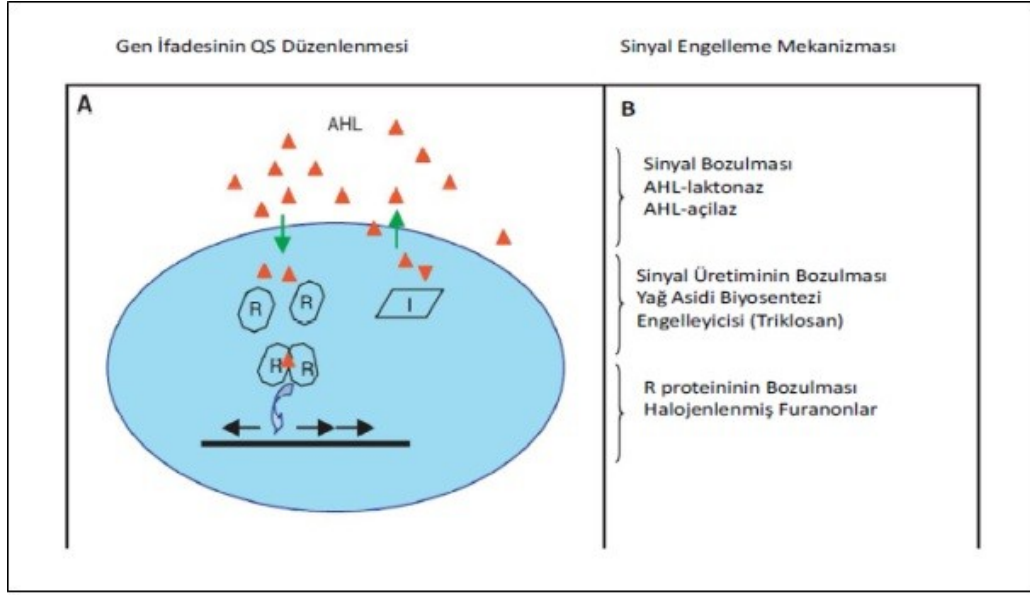
ile nazal yoldan enfekte edilen farelere intravenöz yolla C-30 furanonu verildiğinde, C-30'un kan akımı ile akciğer dokularına penetre olabildiği, bakteri içine girebildiği ve QS sistemi tarafından kontrol edilen virülans genlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Sentetik halojenize furanon olan C-30'un özellikleri özetle, QS sisteminin ekspresyonunu inhibe etmek, antibiyotiklere dirençli biyofilm oluşumunu engellemek ve fare modelinde akciğerlerde enfektif bakterinin persistansına engel olmaktır (60). Ayrıca sentetik bir furanon olan C-30'un *P. Aeruginosa*'daki QS' i AHL sinyali ile yarışa girerek inhibe ettiği fare modelinde akciğerlerde bakterinin persistansına engel olduğu gösterilmiştir (61).

QS inhibitörleri, bitki ve mantar gibi kaynaklardan izole edilebilir. Mantar ve bitkilerin, QS' i inhibe eden bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür (50,51). Choo ve ark. vanilya özütüyle yaptıkları çalışma ile *C. violaceum*'da pigment üretimini engellediğini bulmuşlardır. Genelde vanilya olarak bilinen *Vanilla planifolia Andrews* baharat ve çesni olarak kullanılır. Bu çalışmada vanilya ekstraktının bazı asitler, esterler, fenoller ve hidrokarbonlar içerdiği belirlenmiştir. Ana bileşenlerinin hiçbirisinin furanon türevleri ve doğal uyarıcılarla yapısal benzerliği olmadığı saptanmıştır. İzole edilen bileşikler toksik furanon bileşiklerinden farklı olduğu için güvenle kullanılabilceği insanlar için büyük bir avantaj sağlamıştır. Sarımsak ekstraktını kullanarak *P. Aeruginosa*'da QS sistemini engelleyen bir grup araştırmacı, vanilya ekstraktının da bu bakterideki QS sistemini engelleyici aktivitesiyle ilgili çalışmaktadır. Başka çalışmalarla da *C. violaceum* CV026'da *Lotus corniculatu* (gazalboynuzu) bitkisinin QS sistemini engelleyici aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (62,63).

2.4.3. QS İnhibitörlerinin tedavideki yeri

Araştırmacılar tarafından, bakterileri antibiyotik kullanarak öldürmek yerine, onlar arasındaki haberleşme sistemini hedef alarak antibiyotik direncine bir çözüm geliştirilebileceği önerilmiştir (61). Bu yüzden ilaç firmaları bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altında tutmak için antibiyotikler haricinde başka yeni tedavi yolları bulmaya odaklanmışlardır. QS sistemine ait sinyal moleküllerinin,

mikroorganizmaların virülens faktörlerini uyarması ve biyofilm oluşumunda görev alması yeni ilaçların geliştirilmesi için bu sinyal moleküllerini önemli bir hedef haline getirmiştir. QS inhibitörleri ile ilgili araştırmalar henüz deneme aşamasında olup çalışmalar bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. QS moleküllerinin inhibisyonu üç mekanizma üzerinden sağlanmaktadır (Şekil 8) (50,51).



Şekil 8. QS modelleri ve sinyal engelleme mekanizmaları

QS sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla sinyal reseptör proteinlerinin ya da AHL analogları aracılığı ile reseptöre bağlanmanın azaltılması denenmektedir. Bir kırmızı makro alg olan *D. pulchra*'nın ürettiği ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşikleri yapısal olarak AHL sinyal analogu olup LuxR proteinine bağlanarak AHL'nin ayrılmasına neden olduğu ve böylece *V. fisherfnin* tedavisinde bakteriyel QS' i inhibe ettiği bildirilmektedir (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi HADYEK Etik Kurulundan 13 Mart 2012 tarih ve 1 numaralı karar ile onay almıştır. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde BALB/c farelerle yapıldı. Hayvanların bakım ve izlemi HÜDAL bölümünde gerçekleştirildi.

3.1. Hayvanlar ve Gruplar

Çalışmada Kobay Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, 45 adet BALB/c cinsi 10-12 hafta/15-20 gr dişi fareler kullanıldı. Fareler deney hayvanları merkezinden alınarak sıcaklığı 22,4 °C ve 12 saat karanlık/aydınlık olacak şekilde ışığı ayarlanmış odada 8 tanesi bir kafeste olacak şekilde tutuldu (Resim 1). Ad libitum beslenme uygulandı ve su kısıtlamasına gidilmedi. Her bir fareye 1-45 arasında numara verildi ve bu numaralar sabit boyalı kalem ile kuyruklarına yazıldı. Daha sonra kırk beş adet fare hazır bilgisayar programı yardımıyla, randomize yöntemle rastgele birinci grupta beş diğer dört grupta on adet olacak şekilde 5 gruba randomize edildi:

I. Grup: Kontrol (n:5)

II. Grup: *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) verilen (n:10)

III. Grup: PAO1 + Furanone C-30 (n:10)

IV. Grup: PAO1 + Azitromisin (n:10)

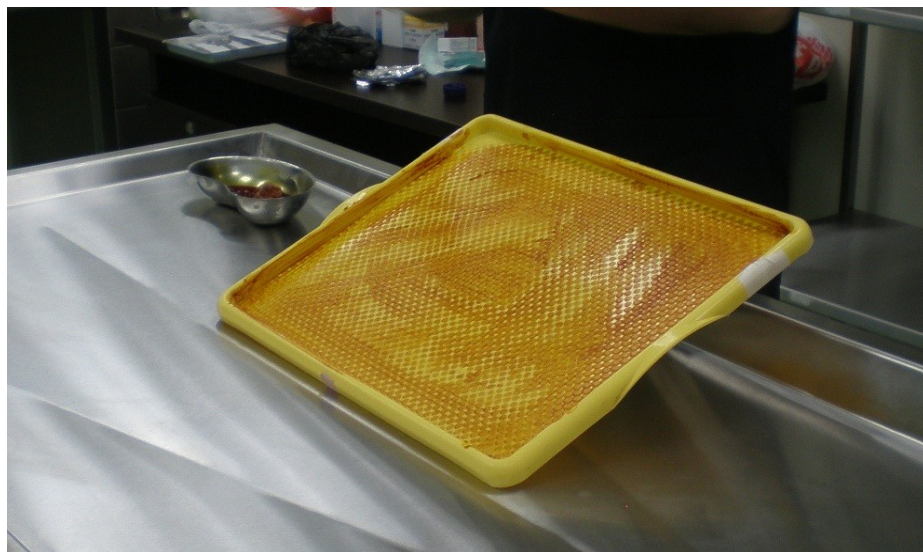
V. Grup: PAO1 + Furanone C-30 + Azitromisin (n:10)



Resim 1. Farelerin laboratuvar ortamındaki görüntüleri

3.2. Deney Protokolü ve Pnömoni Modelinin Oluşturulması:

Deneyin başlangıcında sıfır günü tüm farelerin vücut ağırlıkları hassas tartı ile ölçüldü ve kaydedildi. Sıfır gününde grup 1'deki fareler hariç, grup 2, 3, 4, 5'deki farelerde anestezi sağlamak amacıyla; intraperitoneal olarak 10 mg/kg xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ve 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Fareler 45° tradelenburg pozisyonunda yerleştirildi (Resim 2).



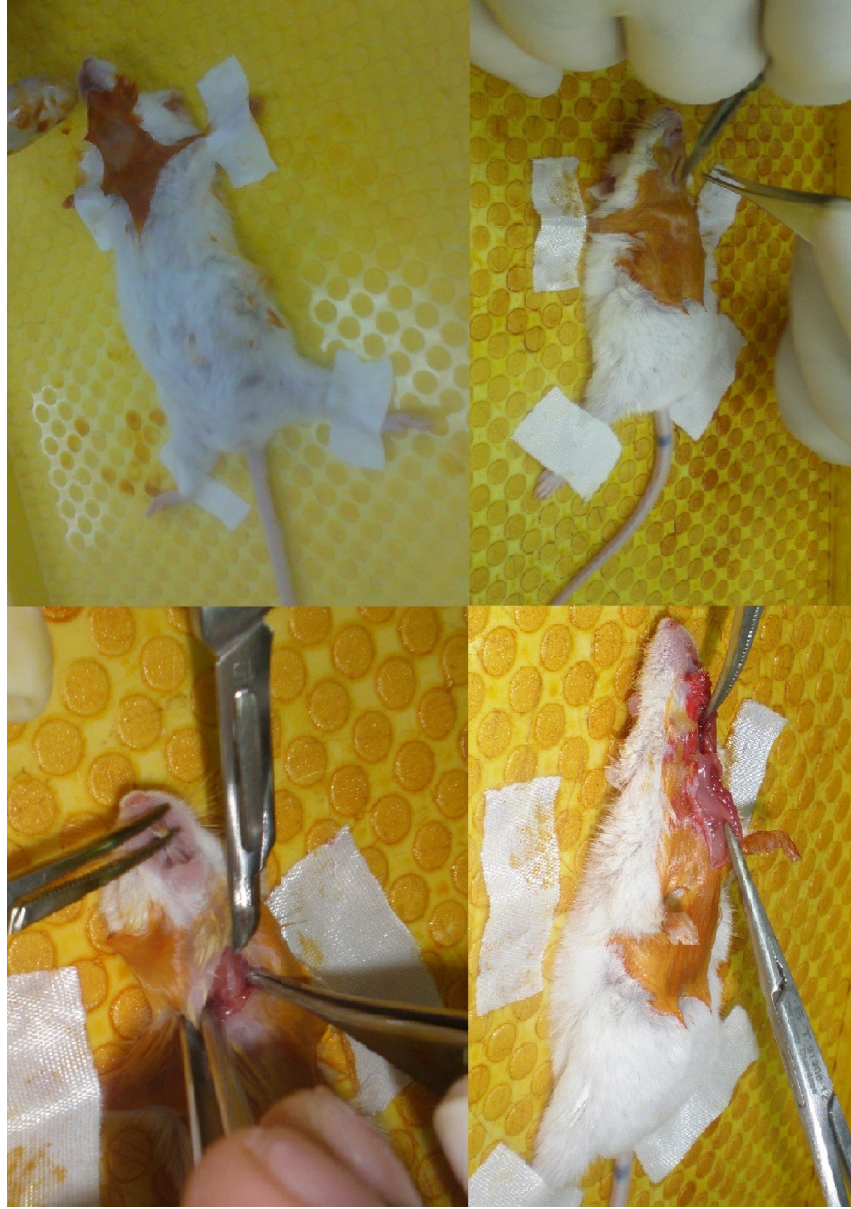
Resim 2. Fareleri 45° eğimli pozisyonunda yerleştirdiğimiz mekanizma

Cerrahi bölge hem ameliyat öncesi hem de sonrasında %10'luk povidone iodine (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) solüsyonu ile temizlendi (Resim 3).



Resim 3. Farelerin cerrahiye hazırlanması

Boyunda orta hatta trakea üstünde 3 mm boyutunda vertikal bir kesi atılarak trakea ortaya çıkarıldı (Resim 4).



Resim 4. İntratrakeal instilasyon için trakeanın cerrahi olarak hazırlanma aşamaları.

Daha sonra 25-30 gauge bir iğne ile trakeadan içeriye girildi. 25-30 μ l (1×10^7 CFU olarak sıvı besiyeri içinde) *P. Aeruginosa* PAO-1 (Pseudomonas Genetik Stok Merkezi (<http://www.pseudomonas.med.ecu.edu>)) süspansiyonu trakeadan içeri verildi. İşlem bittikten sonra kesi yerleri 6/0 vicril ile sütüre edilerek kapatıldı (Resim 5).



Resim 5. Trakeanın anatomik planda kapatılması

3.3. Z-4-Bromo-5-2(5h)Furanone Enjeksiyonu

Sıfırncı gün inkübasyondan hemen sonra Z-4-Bromo-5- 2(5h)Furanone (sigma-Aldich) 0.75 µg/g subcutan (SC) olarak III. gruba 3 gün ve günde 3 defa olarak V. gruba 4 gün ve günde 3 defa 0.9% serum fizyolojik içinde çözdürülerek enjekte edildi (Resim 6).

Enjeksiyonda 1 ml'lik insülin enjektörleri kullanıldı. İğne cilt altından çıkarılmadan önce tüm solüsyonun doku içine zerk edildiğinden emin olundu. Enjeksiyon işlemini takiben iğnenin çıkarıldığı alana kısa bir süre zerk edilen ilacın doku dışına çıkmayacağından emin olunana kadar hafifçe bastırıldı.

3.4. Azitromisin'in Hazırlanması ve Enjeksiyonu

Azitromisin (Fluka) birinci gün (inkübasyondan 24 saat sonra) steril fosfat tamponu ile çözdürülmüş ve 0.02mg/g dozunda (SC) IV. ve V. gruba, 3 gün boyunca SC olarak enjekte edilmiştir (Resim 6).



Resim 6. Furanon ve azitromisin

Tüm enjeksiyonlarda 26GX1/2 lik (1cc=100 ünite, HAYAT) insülin enjektörü kullanıldı. İğne cilt altından çıkarılmadan önce tüm solüsyonun doku içine zerk edildiğinden emin olundu. Enjeksiyon işlemini takiben iğnenin çıkarıldığı alana kısa bir süre zerk edilen ilacın doku dışına çıkmayacağından emin olunana kadar hafifçe bastırıldı.

3.5. BAL Alınması

Ketaminle sedatize edilip servikal dislokasyon uygulanan farelere boyun altından vertikal insizyon yapıldı. Trakea açığa çıkarılıp orta hatta sabitlendi. 24 G kateter ile trakeaya steril olarak girildi. 0.3 ml PBS ile 5 kez bronkoalveolar lavaj yapıldı. Alınan BAL sıvısı 4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatanı ayrıldı. Süpernatan ise IL-4, IL-8, IL-10 ve IL-12 ve IL-19 analizi için -800 C de saklandı.

3.6. Akciğer, Böbrek, Karaciğer Dokusu Alınması

Göğüs duvarı açıldıktan sonra aorta kesildi ve akciğerler sağ ventrikül yoluyla kansız berrak sıvı gelene kadar PBS ile perfüze edildi (Resim 7).



Resim 7. Farede organ eksizyonu.

Akciğerlerin 25 cmH₂O basınçla 15 dakika %10 formalin fosfatlı tamponla 24 G intratrakeal kateter kullanılarak inflasyonu sağlandı. Alınan akciğer, karaciğer, böbrek dokuları %10 formol içine konuldu ve 48 saat süreyle fiksasyon uygulanarak parafine gömüldü. Morfolojik ve histolojik analiz için seri mid sagittal kesitler alındı. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusundan elde edilen preparatlar hematoksilin eozin boyasıyla boyandı. Patolojik incelemeler bu preparatlar üzerinden yapıldı.

3.6.1. Histopatolojik Takip, Boyama ve Değerlendirme

Dokular tamponlanmış %4'lük paraformaldehit (Merck) içine alındı. Fikse olmaları için 24-48 saat beklendikten sonra doku takip işlemine başlandı. Öncelikle bir gece boyunca akarsuda yıkama yapıldı. Fiksatiften arındırılan dokular yükselen derecelerdeki alkollerden (Merck) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol (Merck) içerisinde bekletildi. Gömme işlemi için 65 °C'lik etüvde, 1:1 oranında ksilol-parafin ve parafin içerisinde bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü.

Takip sırasında kullanılan kimyasallar ve süreleri şu şekildedir:

Kullanılan kimyasal	Süre
Çeşme suyunda yıkama	1 gece

%50'lik etil alkol	2 saat
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilol	1-10 dk
Ksilol-Parafin	1-10 dk
Parafin	3 saat

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histopatolojik incelemeler için normal lamlara alındı. Rutin histolojik incelemeler için dokular Hematoksilen-Eosin boyaları ile boyandı. Dokular kuruduktan sonra ışık mikroskopunda inceleme için saklandı. Dokular iki patolog tarafından hangi dokunun hangi gruba ait olduğu bilinmeden kör olarak değerlendirildi. Dokulardaki akciğer histopatolojisi kesitlerde saptanan pnömonik konsolidasyon, konjesyon, inflamatuvar inflamasyon ve hemoraji'ye göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantitatif olarak skorlandı.

Skorlama sistemi:

- 1: Değişiklik yok
- 2: Fokal, hafif değişiklikler
- 3: Multifokal belirgin değişiklikler
- 4: Yaygın belirgin değişiklikler

Skorlama sonunda tüm parameterelerin skorları toplanarak akciğer hasar skoru tespit edildi. Dokulardaki peribronşial, perivasküler, intraalveoler nötrofil ve

monositler sayıldı ve oranlandı. Histopatolojik değerlendirmede çetelemede kullanılan parametreler tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Histopatolojik çeteleme tablosu

GRUP	PNÖMO KONSALİDA	KONJESYO	HEMORAJI	İNFLAMATUAR İNFLAMASYON	PERİBO NÖTR	PERİBO MONO	PERİVS NÖTR	PERİVS MONO	İNTALV NÖTR	İNTALV MONO	AKC HASAR SKOR
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											

Skorlama sistemi:

- 1: Değişiklik yok
- 2: Fokal, hafif değişiklikler
- 3: Multifokal belirgin değişiklikler
- 4: Yaygın belirgin değişiklikler

3.7. Fare Bal Sıvısında IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 ve IL-19 ELISA Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Farelerden alınan BAL sıvısı ELISA yöntemi ile çalışılmadan önce -80C de saklandı. Oda ısısında eritilen BAL sıvısı IL-4 (Mouse IL-4 Platinum ELISA, E-BIOSCIENCE, Avusturya), IL-8 (Mouse interleukin 8, IL-8 ELISA, CUSABIO, Çin) IL-10 (Mouse IL-10 Platinum ELISA, E-BIOSCIENCE, Avusturya), IL-12 (Mouse IL-12 (p70) Platinum ELISA, E-BIOSCIENCE, Avusturya) ve IL-19 (Mouse interleukin 19, IL-19 ELISA, CUSABIO, Çin) hazır kitleri kullanılarak ELISA Plate Reader (Medispec ESR 200) aletinde çalışıldı. Yıkama işleminde ELISA Plate Washer (Medispec ESW 300) kullanıldı.

IL4, IL10, IL12 İçin ELISA Basamakları;

1. Çalışma öncesi yıkama solusyonu, Assay Buffer, Fare IL4, IL10, IL-12 Standart solusyonu kitler için belirtilen talimatlara uygun olarak

hazırlandı. Çalışmada 96 kuyucuklu IL4, IL8, IL10, IL-12, IL19 için ayrı ayrı monoklonal antikorla kaplı düz zemin plak kullanıldı.

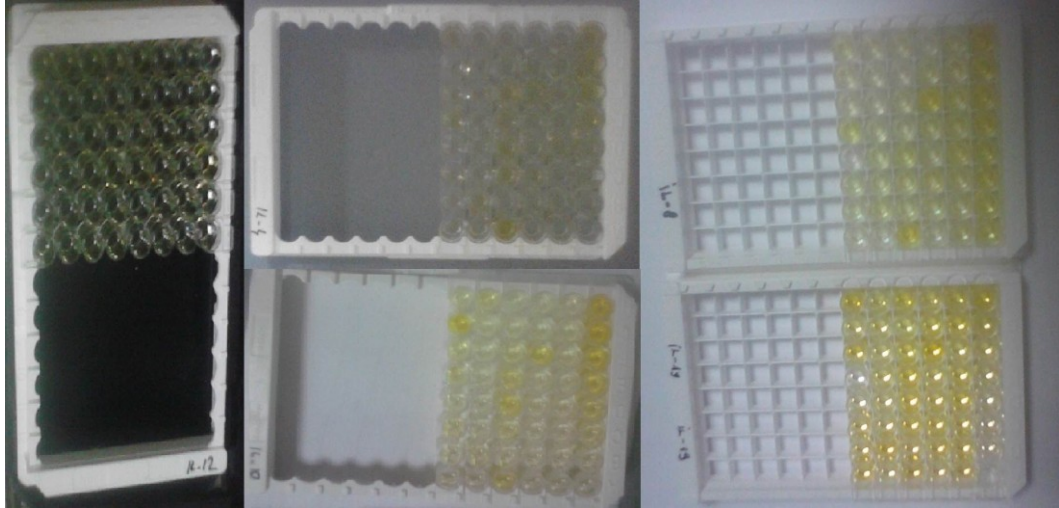
2. Kuyucuklar yaklaşık 400 µl yıkama solusyonu (Wash Buffer) ile 2 kez yıkandı. Son yıkama sonrasında kuyucuklardaki solusyon boşaltıldı. Ancak kuyucuklar kurumadan çalışılmasına özen gösterildi.
3. Kuyucuklar plak üzerinde 8 adet tek kolon olacak şekilde dizildi. Kuyucuklar A1, B1, C1, D1, E1, G1, H1 olarak adlandırıldı. Her kuyucuğa 100 µl örnek solusyondan (Sample Diluent) pipetlendi. Son kuyucuk, H1 kör kuyucuk olarak değerlendirildi. Hazırlanmış Standart solusyon A1 adı verilen kuyucuğa pipetlendi. A1 den 100 µl alınıp B1 kuyucuğuna kondu. Bu işlem yedi kez tekrarlandı. En son kuyucuklar olan G1 den 100 µl alınıp dışarı atıldı.
4. Kör kuyucuklara 100 µl örnek solüsyondan konuldu.
5. BAL sıvısının konacağı kuyucuklara 50 µl örnek solüsyon konuldu.
6. Örnek kuyucuklara 50 µl BAL sıvısı kondu. (Bu aşamadan sonra 14. aşamaya kadar "a" şıkkı IL4, IL12 basamaklarını "b" şıkkı ise IL10 basamaklarını içermektedir)
7. a) Biotin Konjugat solüsyonu hazırlandı
b) Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25⁰ C) 100 rpm hızda sallayıcı içinde 2 saat inkübe edildi.
8. a) Tüm kuyucuklara IL4 ve IL12 için 50 µl, Biotin Konjugat pipetlendi.
b) Biotin Konjugat solüsyonu hazırlandı.
9. a) Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25⁰ C) 200 rpm hızda sallayıcı içinde 2 saat inkübe edildi.
b) Tüm kuyucuklara IL10 için 100 µl Biotin Konjugat pipetlendi. Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25⁰ C) 100 rpm hızda sallayıcı içinde 1 saat inkübe edildi.
10. Streptavidin-HRP solüsyonu hazırlandı.
11. a) Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.

- b) Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 4 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.
12. Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP solusyonu konuldu.
13. a) Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25⁰ C) 200 rpm hızda sallayıcı içinde 1 saat inkübe edildi.
- b) Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25⁰ C) 100 rpm hızda sallayıcı içinde 1 saat inkübe edildi.
14. a) Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.
- b) Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 4 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.
15. Tüm kuyucuklara Tetrametil-Benzidin Substrat solusyonundan 100 µl pipetlendi.
16. Kuyucuklar oda ısısında (18-25⁰ C) 10 dakika inkübe edildi. Direkt yoğun ışığa maruz kalmamasına özen gösterildi.
17. Plak üzerindeki renk değişimi dikkatle takip edildi. En yüksek konsantrasyondaki standart (A1, A2) koyu mavi rengi aldığı anda 100 µl Stop solusyonu kondu. Stop solusyonunun tüm kuyucuklarda eşit dağıldığı ve üniform olduğu görüldü.
18. Sonuçlar Stop solusyonu konduktan hemen sonra okundu (Resim 8).
19. Renk reaksiyonu primer dalga boyun 450 nm olan filtre ile okundu.
20. Standartların verdiği optik dansiteye göre absorban- pg/ml grafiğinde eğri çizildi. Örneklerin verdiği optik dansite bu eğri üzerinden pg/ml cinsinden hesaplandı.

IL8, IL19 İçin Eliza Basamakları;

1. Çalışma öncesi yıkama solusyonu, Assay Buffer, Fare IL8, IL19 Standart solusyonu kitler için belirtilen talimatlara uygun olarak hazırlandı. Çalışmada 96 kuyucuklu IL8, IL19 için ayrı ayrı monoklonal antikörle kaplı düz zemin plak kullanıldı.

2. Kuyucuklar plak üzerinde 8 adet tek kolon olacak şekilde dizildi. Kuyucuklar A1, B1, C1, D1, E1, G1, H1 olarak adlandırıldı. Her kuyucuğa 100 µl örnek ve standart pipetlendi. Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp 37⁰ C 2 saat inkübe edildi.
3. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Ancak hiçbir şekilde yıkanmadı.
4. Biotin Antibody solüsyonu hazırlandı.
5. Tüm kuyucuklara 100 µl, Biotin Antibody pipetlendi.
6. Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp 1 saat 37⁰ C inkübe edildi.
7. Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar iyice boşaltıldı.
8. HRP-avidin solüsyonu hazırlandı.
9. Tüm kuyucuklara 100 µl HRP-avidin solüsyonu konuldu.
10. Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp 37⁰ C de 1 saat inkübe edildi.
11. Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 5 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklar iyice boşaltıldı.
12. Tüm kuyucuklara Tetrametil-Benzidin Substrat solüsyonundan 90 µl pipetlendi.
13. Kuyucuklar 37⁰ C de 15-30 dakika inkübe edildi. Direkt yoğun ışığa maruz kalmamasına özen gösterildi.
14. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop solüsyonu kondu. Stop solüsyonunun tüm kuyucuklarda eşit dağıldığı ve üniform olduğu görüldü.
15. Sonuçlar Stop solüsyonu konduktan hemen sonra okundu (Resim 8).
16. Renk reaksiyonu primer dalga boyun 450 nm olan filtre ile okundu.
17. Standartların verdiği optik dansiteye göre absorban- pg/ml grafiğinde eğri çizildi. Örneklerin verdiği optik dansite bu eğri üzerinden pg/ml cinsinden hesaplandı.



Resim 8. Platelerin stop solüsyonu konulduktan sonraki görüntüleri.

3.8. İstatistiki Analiz

Veriler SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences for Windows) İstatistik Paket Programı ile analiz edildi. Verilerin merkezi eğilim ve dağılım ölçütleri değerlendirildi. Değerler ortalama \pm SD olarak verildi. Verilerin normallik ve homojenliği Kolmogorov Smirnov Testi ve One-Way ANOVA (Homogeneity of variance) Testi ile analiz edildi. Normal dağılıma uyum göstermeyen değişkenler için Kruskal Wallis testi kullanıldı, farklılık saptandığında farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu saptamada Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U Testi kullanıldı. Normal dağılıma uyum gösteren değişkenlerin gruplar arasında farklılığını karşılaştırmada ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı, gruplar arasında önemli farklılık saptandığında farkın kaynağı Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile incelendi. Bağımlı iki grup karşılaştırmalarında Wilcoxon T Testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. $P < 0.05$ degeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

01 Ağustos 2012 – 15 Ağustos 2012 tarihleri arasında randomize, kontrollü, prospektif olarak yapılan çalışmada 45 adet BALB/c fare cinsi farede *P. Aeruginosa* PAO-1 ile deneysel pnömoni modeli oluşturuldu. Farelerde pnömoni gelişim durumu, Azitromisin ve Furanon'un pnömoni üzerine etkileri, metrik sistem ile ağırlık ölçümü yapılarak, histopatolojik olarak ve serolojik olarak değerlendirildi. Grup I ve II'deki farelerde herhangi bir ölüm gözlemlenmedi ve tüm fareler deneyi tamamladı. Grup III' de 6 fare, Grup IV' de 5 fare ve Grup V' de 9 fare deneyi tamamlayamadan ex oldular.

Tüm hayvanların deney başlangıcındaki (sıfıncı gün) vücut ağırlıkları ortalamaları $15,8 \pm 1,36$ (13,2-19,1) g idi. Gruplara göre ağırlık dağılımları normal dağılıma uymakta idi ve veriler homojendi. Gruplara göre sıfıncı gündeki ortalama ağırlık verileri tablo 2'de özetlendi. Gruplar arasında sıfıncı gün ağırlıkları bakımından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,404$).

Tablo 2. Grupların sıfıncı gün vücut ağırlığı değerleri (Ortalama \pm Standart sapma) ve dağılımlarının normallik ve homojenlik anlamlılık düzeyi

	Ortalama ağırlık \pm SD	P
Grup 1 (n:5)	15,9 \pm 0,94	>0,05
Grup 2 (n:10)	16,1 \pm 0,84	
Grup 3 (n:10)	16,1 \pm 0,68	
Grup 4 (n:10)	16,3 \pm 1,48	
Grup 5 (n:10)	15,6 \pm 1,47	
P: normal dağılım (<i>Kolmogorov Smirnov Testi</i>), P: homojenlik (<i>One-Way ANOVA-Homogeneity of variance</i>).		

4.1. BAL Sıvısında Sitokin Değerleri

Tüm grupların deney sonundaki (yedinci gündeki) BAL sıvılarındaki IL 4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL 19 değerlerinin ortalamaları tablo 3'de özetlendi.

Tablo 3. Tüm grupların BAL sıvısındaki IL 4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL 19 ortalama değerleri (Ortalama ± Standart sapma)

	IL 4	IL 8	IL 10	IL 12	IL 19
Grup 1 (n:5)	0,065±0,05	0,381±0,44	0,128±0,01	0,049±0,02	0,932±0,18
Grup 2 (n:10)	0,040±0,03	0,308±0,08	0,131±0,02	0,052±0,02	0,764±0,18
Grup 3 (n:10)	0,171±0,16	0,444±0,32	0,284±0,17	0,069±0,05	1,095±0,56
Grup 4 (n:10)	0,073±0,06	0,221±0,09	0,132±0,03	0,025±0,02	0,702±0,46
Grup 5 (n:10)	0,093±0,07	0,322±0,14	0,355±0,35	0,056±0,05	0,940±0,63

BAL sıvısındaki IL 4 düzeyleri değerlendirildiğinde; Kontrol grubuna (Grup I) göre pnömoni grubunda (Grup II) IL 4 düzeyi düşük iken, tedavi gruplarında (Grup III, IV, IV) yüksek gibi gözükmekte idi. Ancak tüm grupların BAL sıvısındaki IL 4 düzeyi istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında IL 4 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. ($p>0,05$).

Tüm grupların BAL sıvısındaki IL 8 düzeyi istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında IL 8 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Özellikle grup 1-2, 1-4, 2-4, 3-4, 4-5 arasında fark tespit edildi ve sırası ile p değerleri (0,04 – 0,01 – 0,04 – 0,01 – 0,049) şeklinde tespit edildi. Sonuç olarak farkın Grup 4 den kaynaklandığı tespit edildi. Dolayısı ile azitromisinin IL 8 düzeyini düşürdüğü tespit edildi.

Tüm grupların BAL sıvısındaki IL 10 düzeyi istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında IL 10 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Özellikle grup 1-5, 2-3, 2-5, 3-4, 4-5 arasında fark tespit edildi ve sırası ile p değerleri (0,00 – 0,04– 0,00 – 0,00– 0,00) şeklinde tespit edildi. Sonuç olarak farkın esas olarak Grup 5 den kaynaklandığı ancak bu durumdan da asıl sorumlunun Furanon tedavi komponenti olabileceği yani Furanon tedavisinin IL 10 düzeyinin yükselmesinde asıl etken olabileceği düşünülmektedir.

BAL sıvısındaki IL 12 düzeyleri değerlendirildiğinde; Pnömoni grubuna (Grup II) göre Furanon (Grup III) ve Furanon + Azitromisin (Grup V) gruplarında IL 12 düzeyi yüksek iken, Azitromisin (Grup IV) grubunda düşük gibi gözükmekte idi. Ancak tüm grupların BAL sıvısındaki IL 12 düzeyi istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında IL 12 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. ($p>0,05$). Grup I (kontrol) değerlendirme dışı

tutulup diğer 4 grup yani pnömoni oluşturulan gruplar değerlendirildiğinde gruplar arasında IL 12 düzeyi açısından anlamlı fark çıkmakta idi. Azitromisin (Grup IV) grubu yapılan karşılaştırmalarda kombine tedavinin uygulandığı Grup 5 dışındaki tüm gruplara göre IL 12 düzeyini istatistiki olarak anlamlı bir düzeyde düşürmekte idi ($p < 0,05$ Tablo 4).

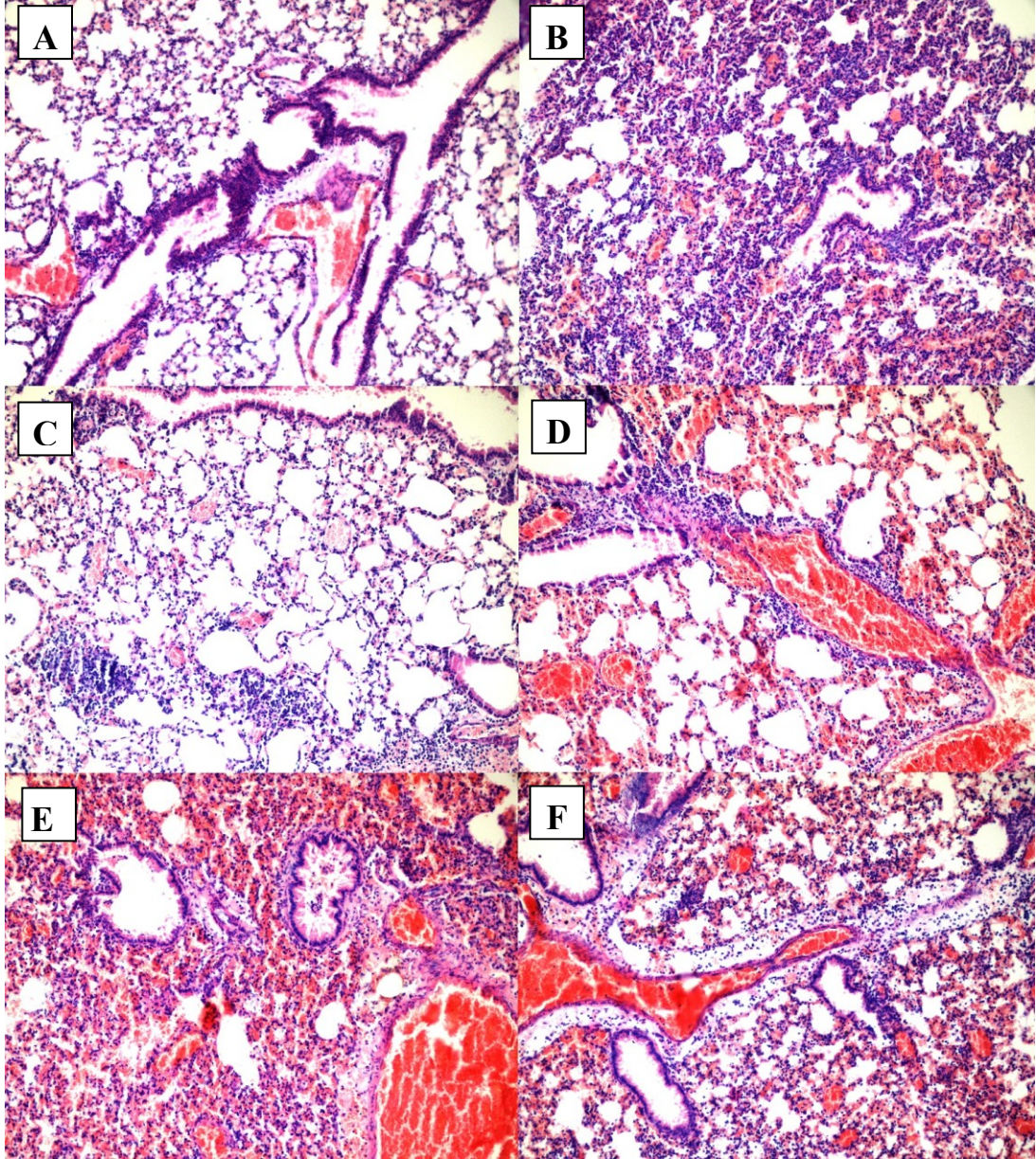
Tablo 4. Grup IV' ün IL 12 değerlerinin diğer gruplar ile karşılaştırılması ve gruplar arasındaki anlamlılık düzeyi

IL 12	p
Grup 1-4	0,043
Grup 2-4	0,007
Grup 3-4	0,010
Grup 4-5	>0,05

BAL sıvısındaki IL 19 düzeyleri değerlendirildiğinde; Pnömoni grubuna (Grup II) göre Furanon (Grup III) ve Furanon + Azitromisin (Grup V) gruplarında IL 19 düzeyi yüksek iken, Azitromisin (Grup IV) grubunda düşükdü. Ancak tüm grupların BAL sıvısındaki IL 19 düzeyi istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında IL 19 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. ($p > 0,05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Farelerin akciğer dokusu histopatolojik olarak değerlendirildi. Grupların histopatolojik görüntüleri Resim 9'da özetlendi.



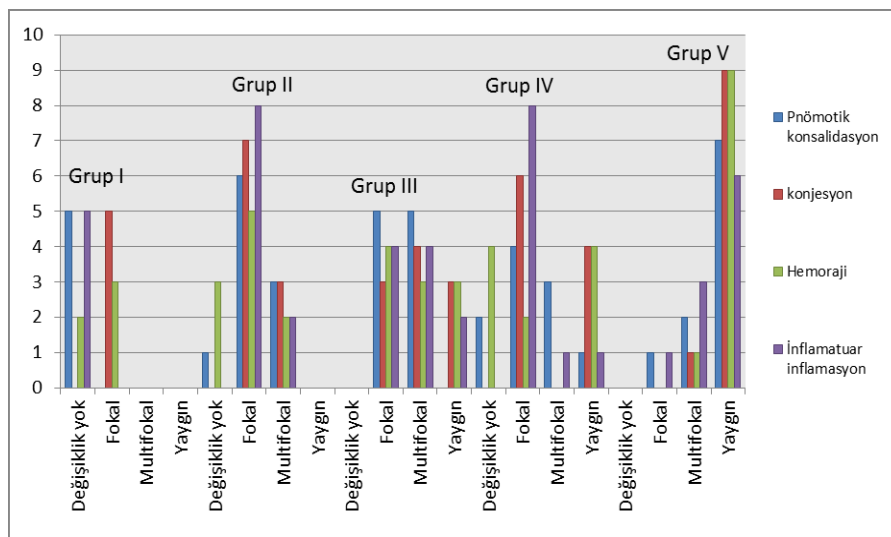
Resim 9. Fare akciğer dokusunun gruplara göre histopatolojik kesitleri. Resimler; Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C-D), Grup 4 (E) ve Grup 5 (F). (H-E, 200X).

Histopatolojik değerlendirme tablosuna göre pnömotik konsolidasyonun gruplara göre dağılımı Tablo 5 ve Şekil 9'de özetlenmiştir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda pnömotik konsolidasyon bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi. Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını test etmek için elle her bir satırın X2 değeri hesaplandı. Satır X2 değerleri toplanarak toplam X2 değeri bulundu. Elde edilen değer, serbestlik derecesi de hesaplanarak anlamlı olup olmadığı değerlendirildi ve fark anlamlı çıkmayana kadar en yüksek X2 değerine sahip satır tablodan çıkarılarak analiz tekrarlandı. Sonuç olarak Farkın Grup

1 ve Grup 5 den kaynaklandığı tespit edildi. Yani Grup I (Kontrol)'de pnömotik konsolidasyon gözlenmez iken kombine ilaç tedavisinin uygulandığı Grup 5 de yaygın pnömotik konsolidasyon gözlenmekte idi.

Değerlendirme tablosuna göre konjesyon ve hemorajinin gruplara göre dağılımı Tablo 5 ve Şekil 9'de özetlenmiştir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda konjesyon ve hemoraji bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. İstatistiki olarak farkın Grup 5 den kaynaklandığı tespit edildi. Yani kombine ilaç tedavisinin uygulandığı Grup 5 de yaygın konjesyon ve hemoraji gözlenmekte idi. Her ne kadar istatistiki anlamlılığa ulaşmasa da Grup 3'de (Furanon) diğer gruplara göre daha fazla şiddette konjesyon ve hemoraji gözlemlendiği dikkat çekmektedir.

Yapılan istatistiki analiz sonucunda inflamatuvar inflamasyon bakımından gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. İnflamasyon açısından istatistiki olarak bu farkın Grup 1 den kaynaklandığı tespit edildi. Yani normal Balb/c farelerin bulunduğu Grup 1 de (Kontrol) inflamatuvar inflamasyon gözlenmemekte idi. Her ne kadar istatistiki anlamlılığa ulaşmasa da Grup 5'de (Furanon + Azitromisin) diğer gruplara göre daha fazla şiddette inflamatuvar inflamasyon gözlemlendiği dikkat çekmektedir.



Şekil 9. Gruplara göre histopatolojik veriler grafiği.

Tablo 5. Farelerin akciğer dokusu histopatolojik değerlendirme özetleri

		Değişiklik yok	Fokal	Multifokal	Yaygın
Grup 1	Pnömotik konsolidasyon	5 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	Konjesyon	-	5 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	Hemoraji	2 (%40)	3 (%60)	0 (%0)	0 (%0)
	İnflamatuar inflamasyon	5 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Grup 2	Pnömotik konsolidasyon	1 (%10)	6 (%60)	3 (%30)	0 (%0)
	Konjesyon	-	7 (%70)	3 (%30)	0 (%0)
	Hemoraji	3 (%30)	5 (%50)	2 (%20)	0 (%0)
	İnflamatuar inflamasyon	0 (%0)	8 (%80)	2 (%20)	0 (%0)
Grup 3	Pnömotik konsolidasyon	0 (%0)	5 (%50)	5 (%50)	0 (%0)
	Konjesyon	-	3 (%30)	4 (%40)	3 (%30)
	Hemoraji	0 (%0)	4 (%40)	3 (%30)	3 (%30)
	İnflamatuar inflamasyon	0 (%0)	4 (%40)	4 (%40)	2 (%20)
Grup 4	Pnömotik konsolidasyon	2 (%20)	4 (%40)	3 (%30)	1 (%10)
	Konjesyon	-	6 (%60)	0 (%0)	4 (%40)
	Hemoraji	4 (%40)	2 (%20)	0 (%0)	4 (%40)
	İnflamatuar inflamasyon	0 (%0)	8 (%80)	1 (%10)	1 (%10)
Grup 5	Pnömotik konsolidasyon	0 (%0)	1 (%10)	2 (%20)	7 (%70)
	Konjesyon	-	0 (%0)	1 (%10)	9 (%90)
	Hemoraji	0 (%0)	0 (%0)	1 (%10)	9 (%90)
	İnflamatuar inflamasyon	0 (%0)	1 (%10)	3 (%30)	6 (%60)

Histopatolojik değerlendirme tablosundaki pnömotik konsolidasyon, konjesyon, hemoraji ve inflamatuvar inflamasyon değerleri toplanarak akciğer hasar skoru elde edildi. Tüm grupların akciğer hasar skoru istatistiki olarak karşılaştırıldığında gruplar akciğer hasar skoru bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0,05$ Tablo 6). Yapılan analizler sonucunda kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiki olarak anlamlı düzeyde akciğer hasarı oluşmuş idi. Kombine ilaç tedavisinin verildiği Grup 5 de ise diğer tüm gruplardan istatistiki olarak anlamlı düzeyde daha fazla akciğer hasarı oluşmuş idi.

Tablo 6. Grupların Akciğer hasar skoru değerleri ve gruplar arasındaki anlamlılık durumu

	Akciğer Hasar skoru	P
Grup 1 (n:5)	5,60±0,55	0,000
Grup 2 (n:10)	8,60±1,71	
Grup 3 (n:10)	11,20±2,57	
Grup 4 (n:10)	9,80±3,74	
Grup 5 (n:10)	14,90±1,52	

Histopatolojik olarak peribronşial nötrofil ve monosit oranları değerlendirildiğinde: Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($P < 0,05$). Kontrol grubundaki peribronşial nötrofil ve monosit sayısı “0” olduğu ve tüm gruplardan farklı olduğu için değerlendirme dışı tutuldu. Pnömoni oluşturulan ve pnömoni oluşturulup tedavi verilen gruplar kendi aralarında değerlendirildi. Kombine tedavinin uygulandığı Grup 5, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en fazla peribronşial nötrofil ve en az monosit sayısına sahip

gruptu ve bu durum istatistiki olarak anlamlı idi ($p<0,0125$). Grup 3 (Furanon) deki peribronşial nötrofil sayısı Grup 2 dekine göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek, monosit sayısı ise düşük idi ($p=0,01$). Ancak Grup 3 ile 4 arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değil idi ($p=0,221$). Grup 2 ile 4 arasındaki fark da istatistiki olarak anlamlı değil idi ($p=0,137$).

Gruplardaki fareler peribronşial monosit ve nötrofil oranlarına göre kendi içlerinde değerlendirildi (Tablo 7). Grup 5 de peribronşial bölgede nötrofiller baskın iken ($p<0,05$), Grup 2, 3 ve 4 de peribronşial bölgede monositler baskın idi ($p<0,05$).

Tablo 7. Grup 2, 3, 4 ve 5'in peribronşial nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi

	Peribronşial		p
	Nötrofil	Monosit	
Grup 2	16,50±26,3	83,50±26,3	0,013
Grup 3	33,50±20,6	66,50±20,6	0,041
Grup 4	25,00±23,2	75,00±23,2	0,017
Grup 5	72,00±15,3	28,00±15,3	0,009

P: Wilcoxon işaretli sıralar testi

Histopatolojik olarak perivasküler nötrofil ve monosit oranları değerlendirildiğinde: Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($P<0,05$). Kontrol grubundaki perivasküler nötrofil ve monosit sayısı “0” olduğu ve tüm gruplardan farklı olduğu için değerlendirme dışı tutuldu. Pnömoni oluşturulan ve pnömoni oluşturulup tedavi verilen gruplar kendi aralarında değerlendirildi. Kombine tedavinin uygulandığı Grup 5, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en fazla perivasküler nötrofil ve en az monosit sayısına sahip gruptu ve bu durum istatistiki olarak anlamlı idi ($p<0,0125$). Grup 3 (Furanon) deki perivasküler nötrofil sayısı Grup 2 dekine göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek gibi ($p=0,026$) gözükmesine rağmen “Bonferroni düzeltmesi” uygulandığı için istatistiki anlamlılığa ulaşmamakta idi. Ancak Grup 3 ile 4 arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değil idi ($p=0,114$). Grup 2 ile 4 arasındaki fark da istatistiki olarak anlamlı değil idi ($p=0,392$). Grup 4 (Azitromisin) deki perivasküler monosit sayısı Grup 2 ve 3 e göre tabloda yüksek gibi gözükmesine rağmen bu durum istatistiki anlamlılığa ulaşmamakta idi ($p>0,05$).

Gruplardaki fareler perivasküler monosit ve nötrofil oranlarına göre kendi içlerinde değerlendirildi (Tablo 8). Grup 5 de perivasküler bölgede nötrofiller baskın iken ($p<0,05$), Grup 2, 3 ve 4 de perivasküler bölgede monositler baskın idi ($p<0,05$).

Tablo 8. Grup 2, 3, 4 ve 5 in perivasküler nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi

	Perivasküler		
	Nötrofil	Monosit	p
Grup 2	17,50±28,0	72,50±37,4	0,041
Grup 3	32,00±21,5	68,00±21,5	0,033
Grup 4	20,00±20,0	80,00±20,0	0,010
Grup 5	69,00±15,1	31,00±15,1	0,013

P: Wilcoxon işaretli sıralar testi

Histopatolojik olarak intraalveolar nötrofil ve monosit oranları değerlendirildiğinde: Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($P<0,05$). Kontrol grubundaki intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı “0” olduğu ve tüm gruplardan farklı olduğu için değerlendirme dışı tutuldu. Kombine tedavinin uygulandığı Grup 5, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en fazla intraalveolar nötrofil ve en az monosit sayısına sahip gruptu ve bu durum istatistiki olarak anlamlı idi ($p<0,0125$). Grup 2-3 arasında istatistiki olarak anlamlı fark yok idi ($p=0,206$). Grup 2-4 arasında istatistiki olarak anlamlı fark yok idi ($p=0,701$). Grup 3-4 arasında istatistiki olarak anlamlı fark yok idi ($p=0,340$).

Gruplardaki fareler intraalveolar monosit ve nötrofil oranlarına göre kendi içlerinde değerlendirildi (Tablo 9). Grup 5 ve Grup 4 de intraalveolar bölgede nötrofiller baskın iken ($p<0,05$), Grup 2 ve 3 de intraalveolar bölgede nötrofil ve monosit dağılımı açısından fark yok idi ($p>0,05$).

Tablo 9. Grup 2, 3, 4 ve 5 in perivasküler nötrofil ve monosit ortalamaları ve grupların kendi içlerindeki anlamlılık düzeyi

	İntraalveolar		
	Nötrofil	Monosit	p
Grup 2	65,50±34,4	24,50±26,9	0,085
Grup 3	59,00±17,3	41,00±17,3	0,135
Grup 4	61,50±35,3	18,50±17,0	0,018
Grup 5	89,50±6,9	10,50±6,9	0,005

±: standart sapma,
P: Wilcoxon işaretli sıralar testi

5. TARTIŞMA

Akciğer parankiminde mikrobiyal enfeksiyonlar sonucu oluşan akut inflamasyon olarak tanımlayabileceğimiz pnömoni, alt solunum yolu enfeksiyonlarının en önemlisidir. Alt solunum yolu enfeksiyonları 2004 yılı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre tüm dünyada ölüm nedenleri arasında 3. sırada yer almaktadır. Yine bu raporun 2008 yılında yapılan güncellemesinde 2030 yılındaki ölüm nedenleri arasında ilk sıralar içerisinde alt solunum yolu enfeksiyonlarının (özellikle pnömonin) yer alacağı öngörülmektedir. Tanı metotları ve tedavideki ilerlemelere rağmen bu hastalık grubunun öneminin devam etmesi, pnömoni ile ilgili çalışmaların artarak devam etmesine yol açmaktadır. Bu çalışmalar insanlar ve in vitro çalışmalarla birlikte oldukça önemli sayıda deneysel olarak da yürütülmektedir. Özellikle hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması, tedavide kullanılan ilaçların etkinlikleri-yan etkileri ve yeni aşıların geliştirilmesi için deneysel hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. En çok kullanılan deney hayvanları tam olarak insan fizyolojisi ile benzerlik göstermeselerde sıçan, fare ve tavşandır (65-68). Solunum yolu enfeksiyonları özellikle de pnömoni geçmişte olduğu gibi önümüzdeki yıllarda da önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkacaktır (69). Bizde pnömoninin, özellikle *P aeruginosa* pnömonisinin halen hem toplumda, hem çocuklarda hemde kistik fibrozis gibi kronik hastalıklarda önemini koruması ve altta yatan patolojinin ve bakterinin virülans faktörleri tam anlaşılmadığı için *P aeruginosa* üzerinde çalışmaya ve deneysel pnömoni modeli oluşturarak etyopatogenezi ortaya koymayı ve yeni tedavi modalitelerine kaynak olmayı hedefledik.

Pnömoni ile ilgili çalışmalarda değişik hayvan türleri kullanılmıştır. Ancak insanlardaki pnömoniye birebir benzer ideal bir modelden tam olarak bahsetmek doğru olmaz. Bunun yerine amaçlanan şeye uygun modellerde çalışmak daha doğru olacaktır. İnsanlarda gelişen pnömoni ile ilgili çalışmalarda kullanılan asıl canlılar memelilerdir. Primatlar filogenetik açıdan insana en yakın canlı olmakla birlikte büyük olmaları, üretimlerinin zorluğu ve maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle az sayıdaki çalışmalarda kullanılmaktadır. Benzer zorluklar köpek, koyun gibi memeliler içinde geçerlidir. Yukarıda sayılan zorlukların aksine, fareler; üretimlerinin hızlı olması, küçük olmaları ve maliyetlerinin düşüklükleri sayesinde

günümüzde bu tür çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fareleri cazip hale getiren bir başka neden ise genetik olarak kök hücrelerinde oynanarak değişik çalışma şekillerine uygun türlerin elde edilmiş olmasıdır. Kullanılacak deney hayvanı immunolojik olarak sağlıklı olabileceği gibi immünsüpresif de olabilir. Deney hayvanlarında immunsüpresyon geliştirmek için çeşitli metodlar kullanılır. Bunlardan bazıları alkol, kortkosteroid verilmesi, CD4 T hücrelerinin azaltılması, radyasyon uygulanmasıdır. Ayrıca yine bu amaçla genetiği değiştirilmiş çeşitli fareler kullanılabilir. Bunlar içerisinde ise en sık SCID (severe combined immune-deficient) fareler, konjenital atimik fareler veya IFN- γ knockout fareler sayılabilir (70). Bizde bu veriler ışığında palandığımız çalışmaya en uygun tiplerden biri olan immün yetmezlikli bir fare tipi olan BALB/c fareyi kullandık.

Deney hayvanı akciğerinde pnömoni oluşturulabilmesi için çalışılan mikroorganizmanın akciğerlere ulaştırılması gerekir. Bunun için değişik metodlar tanımlanmıştır. Bunlar enfekte hayvanla temas yöntemi, aerosol yöntemi, intranasal yöntem, entübasyon yöntemi ve transtrakeal yöntemdir. Transtrakeal yöntem basit, biyokontaminasyon oluşturma bakımından güvenli, organizmanın alt solunum yollarına ulaştığından kesin olarak emin olunabilen ve orofaringeal aspirasyona benzediği için bizde çalışmamızda pnömoni oluşturur iken transtrakeal yöntemi tercih ettik.

Deney hayvanlarından oluşturulan pnömoni modelinde pnömoni ile ilgili değişik parametreler değerlendirilebilir. Ağır pnömoni gelişen hayvanlarda genellikle uyuşukluk, isteksizlik, aktivite azalması, uykuya meyil gibi genel bulgular izlenebilir. İstenirse radyolojik olarak da inflamasyonun varlığı gösterilebilirse de bu yöntem ekipman istediğinden nadiren kullanılır. Radyolojik incelemedeki en büyük problemlerden biri, farelerin oldukça küçük canlılar olması ve bu yüzden iyi görüntü elde edilememesidir. Bu nedenle bazı çalışmalarda daha ileri görüntüleme teknikleri (MR, PET gibi) kullanılmıştır.

Enfeksiyonun göstergesi ve tedavinin etkinliğini takip etmede önemli bir parametre de kilo kaybı ve ateşin izlenmesidir. Solunum sıkıntısının göstergesi olarak farelerde solunum frekansı azalır. Göğüs kafesinin genişlemesi kısıtlanmıştır.

Bu insanlarda izlenen tersine bir bulgudur. İnsanlarda hızlı ve yüzeysel bir solunum izlenir. Ayrıca yapılan çalışmalarda farelerde tidal volümün çok fazla değişmediği gösterilmiştir. Akciğer enfeksiyonu ilerledikçe hayvanlarda plörit, perikardit, sepsis ve bazen konjunktivit gibi komplikasyonların geliştiği izlenebilir. Enfeksiyonun ilerlemesi ile lökosit ve komplemen fonksiyonlarının bozulması sepsis ve ölüm gelişmesine neden olur. Bunun dışında akciğerlerde oluşabilecek komplikasyonlar biraz da çalışılan veya başka bir deyişle hayvana enjekte edilen mikroorganizmanın türüne bağlıdır. Sakrafiye edilen hayvanlardan doku ve kan kültürü ile mikroorganizma miktarı saptanabilir. Oluşan inflamatuvar yanıtın gösterilmesinde bronkoalveolar lavaj (BAL) yöntemi kullanılır. BAL alınarak alveolar hücre popülasyonu ve antikorlar, sitokinler gibi çeşitli antiinflamatuvar veya proinflamatuvar maddeler hakkında bilgi elde edilebilir. İnflamatuvar hücreler içerisinde nötrof iller oldukça önemlidir. Bilindiği gibi enfekte olmamış bir hayvanda alveolar boşlukta bu hücreler bulunmaz, enflamasyonun gelişmesi ile ise alveolar boşluklara geçerler. Nötrofil ve diğer inflamatuvar hücreleri göstermede kullanılan yöntemlerden biri morfolojik incelemedir. Bu yöntem çıkarılan dokunun makroskopik ve mikroskopik incelemesini kapsar. Bu çalışmada da *P. Aeruginosa* kullanarak oluşturduğumuz pnömoni modelinde BAL sıvısında interlökin düzeyleri araştırıldı ve farelerin sakrafikasyonu sonrası elde edilen akciğer dokusunda histopatolojik incelemeler yapıldı.

Moser ve ark. aynı hastanın 1988, 1997 ve 2003 yıllarına ait üç çift non-mucoid ve mucoid isolatını kullanarak farelerde *P. Aeruginosa* akciğer enfeksiyonu modeli geliştirdiler (71). Histopatolojik incelemede inflamasyon görülen alanda > %90'ın üzerinde polimorfonükleer lökosit görülmesini akut, > %90'ın üzerinde mononükleer hücre görülmesini kronik enfeksiyon olarak değerlendirdiler. İnflamasyon durumunu ise 0 ile 3 arasında skorladılar. 0; inflamasyon yok, 1; fokal, 2; orta ağır fokal inflamasyon, 3; nekroza giden ağır inflamasyon olarak değerlendirdiler ve pnömoni gelişim durumuna karar verdiler. Yapılan çalışmalarda akut pnömonide polimorfonükleer lökositlerin bronşial bölgede ve alveolar bölgede yoğun olarak gözlemlendiği ve bunların sayısının yedinci günden itibaren yavaş yavaş azalmaya başladığı gösterilmiştir (72,73).

Hope ve ark. yaptıkları bir çalışmada *P. Aeruginosa* 'nın pili yapısının akut akciğer enfeksiyonundaki rolünü tespit etmeye çalışmışlardır (74). Çalışmada BALB/cByJ fareler Pil+ ve Pil- *P. Aeruginosa* PA1244, PAO1 ve PAK mutantları ile intranazal instilasyon yöntemi ile enfekte edilmiştir. Pnömoni varlığını histopatolojik olarak gram negatif çomak, lökosit infiltrasyonu, fibrin depozitlerinin oluşturduğu konsolidasyon, bronş ve alveollerin içerisinde hemoraji olup olmaması durumuna göre değerlendirmişlerdir. Yaygın lökosit infiltrasyonu ve fibrin depozitlerinin yaygın konsolidasyon ve hemoraji ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Süpüratif bronkopnömoninin karakteristik göstergesi olan bronşiyol içerisindeki polimorfonükleer lökosit varlığını tespit etmişlerdir. Hope ve ark. bu bulgularını literatürde yapılmış olan diğer çalışmalarda desteklemektedir (75,76). Ayrıca akciğer parankiminde gram negatif çomakları fagosite etmiş makrofajlar olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarındaki tüm fare ölümleri ilk 24 saat içerisinde gerçekleşmiş ve bu hayvanların ölüm nedeninin sepsis olduğunu akciğer ve dalak kültürü ile tespit etmişlerdir. Yaşayan hayvanların akciğerlerinin ise 48 saat içerisinde enfeksiyondan temizlendiğini ve 96 saatte steril hale geldiğini gözlemlemişlerdir. Yaşayan hayvanlarda pnömoninin lokal olduğunu, normal akciğer histopatolojisi ile birlikte 10X büyütmede fokal konsolidasyon odakları olduğunu bildirmişlerdir. Ölen hayvanlarda ise yaygın hemoraji, fibrin depozitleri ve yaygın konsolidasyon tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada histopatolojik bulguları değerlendirmek için histopatolojik skorlama sistemi kullandık. Yapılan incelemede akciğer dokusunda pnömoni gelişim durumunda gözlemlenen pnömonik konsolidasyon, konjesyon, inflamatuvar inflamasyon ve hemoraji değerlendirildi. Yukarıda verdiğimiz literatürlerde de pnömoninin histopatolojik değerlendirmesi için bu parametreler kullanılmıştır. Ayrıca pnömoninin olmazsa olmaz bulgusu nötrofiller, peribronşial, perivasküler ve intraalveoler bölgelerde bulunma durumlarına göre değerlendirildi. Grup I'de yani *P. Aeruginosa* ile enfekte etmediğimiz kontrol grubunda hiç bir farede pnömotik konsolidasyon gözlenmedi. Ancak Grup II'de yani *P. Aeruginosa* ile enfekte ettiğimiz ve hiçbir tedavi uygulamadığımız grupta 9 farede pnömotik konsolidasyon gözlemlendi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı idi. Grup I ve

II'deki fareler akciğer dokularındaki inflamatuvar inflamasyon yönünden değerlendirildiğinde; Grup I'de hiçbir farede inflamatuvar inflamasyon gözlemlenmez iken, Grup II'de tüm farelerde değişik derecede inflamatuvar inflamasyon gözlemlendi. Bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm histolojik parametrelerin toplanması ile elde edilen akciğer hasar skoru değerlendirildi. Grup I'in akciğer hasar skoru ortalaması 5,6 idi. Grup II'nin akciğer hasar skoru ortalaması 8,6 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup akciğer dokularındaki nötrofil sayıları yönünden değerlendirildi. Grup I'de peribronşial nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Grup II'de peribronşial nötrofil ve monosit sayısı sırası ile 16,5 - 83,5 idi. Grup I'de perivasküler nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Grup II'de perivasküler nötrofil ve monosit sayısı sırası ile 17,5 - 72,5 idi. Grup I'de intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Grup II'de intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı sırası ile 65,5 - 24,5 idi. Tüm nötrofil verileri bakımından Grup I ve II arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Tüm veriler değerlendirildiğinde bize BALB/c farelerde başarılı bir *P. Aeruginosa* pnömoni modeli oluşturduğumuzu ispatlamaktadır. Özetle 25-30 µl (1x10⁷ CFU olarak sıvı besiyeri içinde) *P. Aeruginosa* PAO-1'in BALB/c farelere intratrakeal yöntemle uygulanması ile başarılı bir şekilde *P. Aeruginosa* pnömoni modeli oluşturulabilmektedir.

Boyd ve ark. yaptıkları bir çalışmada oral simvastatin tedavisinin pnömokokal pnömoni deki akut akciğer hasarı üzerine etkisini değerlendirmişlerdir (77). Çalışmalarında 12-16 haftalık dişi BALB/c fareleri kullandılar. Fareleri 3 gruba ayırdılar. Birinci grup sadece kemirgen besini alan kontrol grubu, ikinci grup düşük doz simvastatin verilen grup ve üçüncü grup yüksek doz simvastatin verilen grup idi. Farelerin akciğerlerinde histopatolojik inceleme, BAL sıvılarında albümin ve sitokin analizi ve akciğerde ICAM-1 seviyesi değerlendirmesi yaptılar. Farelerin akciğerlerindeki pnömokok titrelerinde, bakteri verildikten 24 saat sonra yapılan analizlerde bakteri titreleri bakımından gruplar arasında fark tespit etmediler. 42 saat sonra ise kontrol grubundaki bakteri yoğunluğu düşük doz simvastatin alanlardan 50 kat yüksek doz simvastatin alanlardan ise 100 kat fazla olduğunu tespit ettiler. Bu bulgular ile uyumlu bir şekilde histopatolojik analizlerde yüksek doz simvastatin alan grupta akciğerlerde konsolidasyon, ödem ve hemorajinin diğer gruplara göre daha az

gözlemlendiğini tespit ettiler. BAL sıvısında 24. saatte yaptıkları değerlendirmede düşük doz simvastatin alan grup ile kontrol grubu arasında TNF- α , IL 6, IL 10, IL 12, MCP 1 ve IFN γ bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Yüksek doz simvastatin alan grupta da fark tespit etmemişlerdir. Yapılan insan çalışmalarında toplum kaynaklı pnömoniye karşı IL 6 ve TNF- α nın koruyucu olduğunu ancak kendi çalışmalarında böyle bir bulguyu destekleyecek veriye ulaşamadıklarını bildirmişlerdir.

P. Aeruginosa akciğer enfeksiyonuna karşı en bilinen erken konak cevabı pro-inflamatuar sitokin IL 1 β ' nın salınımıdır (78). Pro-IL 1 β , sistin proteaz caspas 1 tarafından aktif formuna çevrilir. In vivo caspas 1 ve takip eden IL 1R sinyalizasyonu enfeksiyon bölgesine hızlı nötrofil toplanması için gereklidir (78). IL 1R sinyal yokluğunda ölçülebilir şekilde akciğerlerden erken *P. Aeruginosa* temizlenmesi azalmaktadır (78). *P. Aeruginosa* tarafından oluşturulan akciğer enfeksiyonunda enfekte hava yollarında yaygın nötrofil toplanması olmaktadır. Nötrofiller akut pulmoner enfeksiyonda *P. Aeruginosa* nın temizlenmesinde primer rol oynamaktadırlar. Akciğerlerde *P. Aeruginosa* yı ilk karşılayan immün hücreler alveolar makrofajlardır. Makrofajlar bakterileri çevreleyerek öldürürler ancak *P. Aeruginosa* enfeksiyonlarında patojen algılama rolleri birincil öneme sahiptir. Murin alveolar makrofajları *P. Aeruginosa* lipopolisakkarit ve flajeline karşı kemokinler ve sitokinler (TNF- α ve IL6) salgılamaktadırlar. Yani makrofajların nötrofil toplayıcı kemokinleri üretme kapasitesi vardır (79).

Skerrett ve ark. yaptıkları bir çalışmada TNFR1/TNFR 2 (TNF- α veya onun reseptöründe genetik eksiklik) rodentlerde *P. Aeruginosa* T3SS pozitif PAK suşu ile akciğer enfeksiyonu oluşturmuşlardır (80). Genetik defektli rodentlerin vahşi tip kontrollere göre daha hızlı bu suşu akciğerlerinden temizlediklerini ve nötrofil sayılarının genetik defektlilerde 2 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu veriler Lee ve ark. bildirdiği veriler ile çelişmektedir (81). Onlar TNF- α defektli farelerin genetik defeksizlere göre nötrofil toplanmasında yetersiz kaldıklarını ve genetik defektli olanların akciğerinde 5-log *P. Aeruginosa* yükü olduğunu bildirmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, TNF- α sinyallerinin akciğerden bakteriyel temizlemede etkin olduğunu Lee'nin çalışması

hariç göstermektedir (82-85). TNF- α 'nın sadece pro-inflamatuar etkisi olamayabilir, aynı zamanda Muc 1 ve IL 10 gibi antiinflamatuar moleküllerin ekspresyonunu da uyarmaktadır (86,87).

IL 10 antiinflamatuar bir sitokindir ve *P. Aeruginosa* enfeksiyonundan 24 saat sonra pro-inflamatuar sitokin ve kemokin seviyeleri azalmaya başladığı zaman üretimi pik yapar (88). IL 10'un akciğer enfeksiyonlarındaki rolü kompleks bir süreçtir ve postsepsis immünsüpresyon modellerinde olduğu gibi molekülde artış gözlemlenir veya transgenik farelerin akciğerlerinde IL 10 aşırı üretimi *P. Aeruginosa* akciğer enfeksiyonuna cevap olarak oluşan koruyucu pro-inflamatuar cevabı azaltabilir (89-91). Diğer taraftan IL 10 eksikliğinde endotoksin ve enfekte edici patojenlere karşı pro-inflamatuar cevapta artış beklenilebilir (92). Aslında IL 10 defektli fareler, T3SS ekzotoksini eksprese etmeyen veya Flajel gibi pro-inflamatuar yüzey yapısına sahip olmayan M5715 *P. Aeruginosa* mukoid suşu ile enfekte edildiklerinde, kontrol grubuna göre uzamış ve hafif derece yüksek pro-inflamatuar yanıt oluşturdukları gözlemlenmiştir (93). Ama, bu modelde hem kontrol hemde IL 10 defektli olan fareler 6. günde *P. Aeruginosa*'dan temizlenmişlerdir. Bu sonuçlar Sawa ve arkadaşlarının *P. Aeruginosa* enfeksiyon oluşumundan 1 saat önce ve 8 saat sonra rekombinant IL 10 uygulamalarının surveyde ve murin ölümünde parsiyel bir düzelme sağladığı sonucuna ulaştıkları çalışmaları ile çelişki oluşturmaktadır (94). Ancak yazarlar IL 10 uygulamasının inflammatuar yanıt üzerindeki etkisini bildirmemişlerdir. Belkide surveyde gözlenen düzelme nötrofil yanıtı ile ilişkili olan doku hasarındaki azalmaya bağlı olabilir. Özetle tüm bu çalışmalar akciğerlerden *P. Aeruginosa*'nın temizlenmesinde nötrofillerin toplanması gerektiği ve pro-inflamatuar sitokinlere karşı IL 10 artışının bu patojenin kontrolü ve temizlenmesini azalttığı konusunda görüş birliği içerisinde dirler.

TNF- α , IL 1 β ve IL 6'nın değişik inflammatuar yanıt kaskatını başlattıkları bilinmektedir. Aynı zamanda bu sitokinler kilo kaybı, protein katobolizması, anoreksi ve ateş de rol almaktadırlar (95-97). *P. Aeruginosa* enfeksiyonunun erken evrelerinde dolaşımda ki IL 6 düzeyleri artmaktadır. Kistik fibrozisli hastalarda dolaşımda IL 6 tespit edilebilmektedir ve bu sitokinin konsantrasyon ölçümleri akciğer yayılımı ile ilişkili bulunmuştur. Nixon ve ark. sistemik antibiotik tedavisi

sonrası bu sitokinin kan konsantrasyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir, dolayısı ile dolaşımdaki IL 6 seviyesi akciğer enfeksiyonu ve enflamasyonla ilişkilidir (98). IL 6 kaşeksi ve akut faz yanıtını yöneten bir pro-inflamatuar bir mediatör olarak değerlendirilmektedir (99). Aynı zamanda IL 6, TNF- α ve IL 1 β gibi pro-inflamatuar mediatörleri düzenlediğinden dolayı anti inflamatuar yapıya sahiptir (100).

Özetle yapılan çalışmalarda TNF- α , IL 1 β ve IL6'nın pro-inflamatuar yapıya IL 10 ve IFN- γ 'nın antiinflamatuvar yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* veya *Streptococcus pneumoniae* ile oluşturulan pnömoni modellerinde savunmanın başlamasında proinflamatuvar sitokinler anahtar mediatörlerdir (101). Ancak birçok çalışmada *P. Aeruginosa* pnömonisinde bu mediatörlerden bazılarının bakteriyel temizlenmeyi inhibe ettiklerinden dolayı konak savunmasında zararlı bir rol oynadıkları ortaya konulmuştur. Aslında enfeksiyona karşı azalmış duyarlılık IFN-8 reseptör, TNF tip 1 reseptör veya IL 18 defektli farelerde tespit edilmiş ve IL 10'un koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur (80, 94, 101-103).

İnbred farelerin C57BL/6 ve C3H/HeN gibi bazı türleri *P. Aeruginosa* ile enfeksiyon durumunda predominant olarak T hücrelerinden interferon gama salınımı ile karakterize T helper 1 (TH1) tipi immün yanıtı eğilim gösterirken, BALB/c gibi diğer türler predominant olarak T hücrelerinden IL4 ve IL 10 salınımı ile karakterize TH2 tipi immün yanıtı eğilim gösterirler (104-107). Kistik fibrozis hastalarında *P. Aeruginosa* enfeksiyonuna bağlı uyarılmış konak yanıtı nötrofillerin toplanması ve baskın TH2 yanıtı ve IL 4 üretimi ile karakterizedir (108, 109). IL 4 primer olarak TH2 hücreleri ve mast hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. IL 4 işlenmemiş CD4+ T hücrelerin TH2 alt tiplerine farklılaşmasını uyarır ve TH1 hücrelerin diferansiasyonunu inhibe eder fakat aynı zamanda birçok inflamatuvar hücrenin diferansiasyonunu, proliferasyonunu ve aktivasyonunu artırır. IL 4 varlığında antijen sunumu immünglobulin E antikorlarının formasyonuna yol açar, eozinofillerin ve mast hücrelerinin enfeksiyon veya inflamasyon alanına migrasyonunu artırır (110). *P. Aeruginosa* enfeksiyonu ile ilişkili akciğer hasarı, akciğer parankimindeki organizmanın yıkıcı etkileri ile ilişkilidir ve nötrofil ve diğer

inflatuar mediatörlerin aktivasyonu ile şiddetlenebilir (111). Daha öncede belirttiğimiz gibi *P. Aeruginosa*'nın sebep olduğu akciğer enfeksiyonlarında IL1, IL 6, IL8 ve TNF α gibi değişik sitokinlerin üretimi artar. Solunum sisteminin *P. Aeruginosa*'dan temizlenmesinde değişik faktörler rol oynar. IL 4 hem akut hemde kronik akciğer etkilenmelerinde *P. Aeruginosa*'dan temizlenmeyi arttırır. IL 4 ün akciğerleri koruma mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. In vitro çalışmalar IL 4 ün lökosit fonksiyonlarının modülatörü olduğunu ortaya koymuştur. IL 4, nötrofil, monosit ve makrofajların yüzeyinde kompleman reseptörlerinin (CR1,CR3, CR4) ekspresyonunu arttırır ve bu hücreler tarafından yapılan kompleman bağımlı fagositozu arttır (112-114). Ayrıca IL 4 makrofajların üzerindeki mannoz reseptör ekspresyonunun potent bir uyarıcısıdır (115). IL 4 nötrofil ve makrofajların maturasyonunu, diferansiasyonunu ve proliferasyonunu destekler (112, 113, 116-119). IL 4 makrofajlarda süper oksit radikallerinin üretimini azaltır (120-122). IL 4 makrofajlardan inflamatuvar sitokinler olan IL 1 β ve TNF α salınımını süprese eder (123). IL 4 ve IL 10 bazı antiinflamatuvar özellikleri paylaşırlar ve IL 4' ün IL 10 sentezini ayarladığı bildirilmiştir (112, 119, 122, 124). Bakterilerin efektif temizlenmesi için gerekli olan inflamasyon akciğerlerin akut ve kronik olarak IL 4'e mazur kalması durumunda artar. Eksojen IL 4 uygulamasının farelerde *P. Aeruginosa* temizlenmesini arttırdığı ve enfeksiyonun tedavisinde yeni bir strateji olabileceği bildirilmiştir (125).

Moser ve ark. yaptıkları çalışmada erken non mukoid veya geç mukoid suşlar ile enfekte ettikleri farelerde yüksek MIP-2 (IL 8 analogu) üretimi tespit etmişlerdir ve bu gözlemlerinin kistik fibrozisli hastalarda IL 8 in nötrofil kemoatraktanı olma durumu ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (71). Azghani ve arkadaşları *Pseudomonas elastazının* (PE) alveolar epitelyal hücrelerde IL-8 üretimi ile mitojen aktive eden protein kinaz (MAP: mitogen activated protein kinase) aktivitesini indükleyip indüklediğini araştırarak, konak havayolu inflamatuvar cevabı kadar bakteriyel ürünlerin de *Pseudomonas* enfeksiyonlarında önemini ortaya koymaya çalışmışlardır. A549 epitelyal hücrelerinde, *Pseudomonas elastazının* MAPK yolağının ekstraselüler sinyal düzenleyici proteinlerinin (ERK 1/2: extracellular signal-regulated proteins) fosforilasyonunu indüklediğini göstermişlerdir.

Pseudomonas elastazınm aynı zamanda IL-8 üretimini arttırdığını bulmuşlardır. PE, MAPK yolağının ERK1/2 kolunu aktive ederek IL-8 artışını indüklemektedir. Bu çalışma ile PE'nin IL-8 ekspresyonunu düzenleyen hücresel sinyal mekanizmaları aracılığıyla pulmoner inflamasyonu arttırabileceği bildirilmiştir (126). IL 8 nötrofil elastazın indüklediği goblet hücre metaplasisinde ve hava yollarının epitelyumunda Muc5ac üretiminde önemli bir role sahiptir (127). Kistik fibrozisli hastaların balgamlarındaki artmış IL 8 seviyeleri, kronik enfeksiyon, nötrofil inflamasyonu ve ilerleyici hava yolu yıkımının sonucudur (128). Respiratuar epitelyal hücreler *P. Aeruginosa* enfeksiyonuna karşı gelişen immün yanıtta kritik role sahiptir (129). *P. Aeruginosa*'ya maruz kalan epitel hücreleri vasküler alandan hava yollarına nötrofil ekstravazasyonundan asıl sorumlu kemokin olan IL 8'i üretirler (130). IL8 ve nötrofiller *P. Aeruginosa* ile enfekte hastaların akciğerlerinde artmış miktarlarda bulunurlar (131). *P. Aeruginosa*'nın Flajel ve pili gibi yapıları IL 8 üretimini uyarmaktadır (132,133).

IL 12, interferon gama üretimini sitümile eder ve bu durum IL 18 tarafından arttırılır ve hücresel immünite gelişir (134,135). IL 18 in direkt pro-inflamatuar etkileri nükleer faktör kB aktivasyonunu ve TNF- α , IL 1 β , IL 6 ve IL 8 gibi sitokinlerin uyarılmasını ve nötrofillerin aktivasyonunu içerir (136-138). Gram negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaritler güçlü bir immün yanıtı neden olan endotoksinlerdir. İn vitro olarak lipopolisakkaritlerin sitümüle ettiği lökositler TNF- α ve IL 12 gibi bakteriyi öldüren fakat aynı zamanda konakta ağır doku hasarınada neden olan pro-inflamatuar sitokinlerin sekresyonunu uyarır. Dolayısı ile bu savunma sisteminin over aktivasyonunun düzenlenmesi çok önemlidir. IL 12'nin kritik rolü sadece TH1 immün cevap ve hücre içi mikroorganizmalara karşı konak savunması için tanımlanmamış aynı zamanda hücre dışı mikroorganizmalarla mücadelede de tanımlanmıştır (139,140). Yamamoto ve ark. IL 12'nin bakteriyel pnömoninin erken fazında enfekte akciğer dokusuna nötrofil toplanmasını arttırdığını gösterdiler (141). Enfekte akciğer dokusunda TNF- α üretimi IL 12'ye bağımlıdır. IL 12 hem nötrofiller hemde NK hücreleri için kemotaktik bir faktördür ve onların vasküler endotelial hücrelere adheransını uyarır (142). Yapılan bir çalışmada anti IL 12 antikor tedavisi verilerek bleomisin

indüklediği pnömopatiden korunmuşlardır ve IL 12'nin akciğer doku hasarı ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (143,144). IL 12 aynı zamanda anjiogenezisle ilişkili olan matriks metalloproteinaz 9 ekspresyonunu da azaltmaktadır (145).

IL 19 biyolojik rolü henüz tam anlaşılamamıştır ve sitokinlerin IL 10 ailesine üyedir. IL 19'un insan sağlığı açısından önemli olduğu düşünülmektedir çünkü mesela astımda artmış IL 19 seviyelerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (146,147). Ayrıca IL 19 psöriazis, derinin otoimmün hastalıkları ve romatoit artrit ile ilişkilidir (148-151). İnsan ve farelerin bronşial epitel hücreleri TH2 sitokinleri ile sitümlasyon sonrası artmış IL19 üretimi olduğu gösterilmiştir (147,152). IL 10 ailesi IL 19, IL 20, IL 22 (IL-TIF), IL 24 (MDA-7) ve IL 26 (AK155) den oluşmaktadır (153). IL 19 bunlardan IL 20 ve 24 ile homolog yapı gösterir ve IL 20 reseptör α (IL-20R α) ve β sub ünit (IL-20R β) hetrodimeri tarafından oluşturulan reseptörü paylaşırlar (154-155). Bunlar IL 19 un bilinen resptörleridir fakat IL 20 ve 24'ün ikinci bir resptör zincirleride (IL22R β /IL-20R β) vardır. IL 19'un reseptörler kompleksine bağlanması sinyal transdüserlerini ve transkripsiyon aktivatör (STAT) yollarını (özellikle STAT 1 ve STAT 3) aktive eder (155). İn vitro çalışmalar lipopolisakkaritlerin insan monositlerini sitümlü ederek IL 19 mRNA ekspresyonunu upregüle edebileceğini ve recombinant IL 19'un fare monositlerini uyararak IL 6, TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ve IL 10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarabilir (156).

Yaptığımız çalışmada BAL sıvısında yukarıda özetlediğimiz literatür çerçevesinde IL4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL19 seviyelerini değerlendirdik. Pro inflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL 1 β ve IL 6 seviyesini ise değerlendirmedik. Çünkü bu sitokinlerin seviyeleri literatürde de bahsedildiği gibi *P. Aeruginosa* uygulamasından 24 saat sonra azalmaya başlamakta idi. Biz ise farelerimizden BAL sıvısını *P. Aeruginosa* uygulamasından 7 gün sonra aldık. Grup I'de BAL sıvısında IL 4 ortalaması 0,065 idi. Grup II'de BAL sıvısında IL 4 ortalaması 0,04 idi ve her iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark yok idi. Grup I'de BAL sıvısında IL 8 ortalaması 0,381 idi. Grup II'de BAL sıvısında IL 8 ortalaması 0,308 idi ve her iki grup arasında istatistiki olarak Bonferroni düzeltmesine göre anlamlı bir fark yok

idi. Grup I'de BAL sıvısında IL 10 ortalaması 0,128 idi. Grup II'de BAL sıvısında IL 10 ortalaması 0,131 idi ve her iki grup arasında istatistiki olarak Bonferroni düzeltmesine göre anlamlı bir fark yok idi. Grup I'de BAL sıvısında IL 12 ortalaması 0,049 idi. Grup II'de BAL sıvısında IL 12 ortalaması 0,052 idi ve her iki grup arasında istatistiki olarak Bonferroni düzeltmesine göre anlamlı bir fark yok idi. Grup I'de BAL sıvısında IL 19 ortalaması 0,932 idi. Grup II'de BAL sıvısında IL 19 ortalaması 0,764 idi ve her iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark yok idi. Özetle yaptığımız çalışmada kontrol grubu (Grup I) ve sadece pnömoni oluşturulan grup (Grup II) arasında IL4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL19 seviyeleri bakımından istatistiki olarak fark tespit etmedik. Bu durum literatür ile çelişiyor gibi gözükmektedir. Ancak unutulmaması gereken nokta literatürdeki çalışmaların standart olmadığıdır. Çalışmalarda kullanılan fare türleri birbirinden farklıdır. Her bir farenin immün yanıt durumuda farklılık arz etmektedir. Aynı zamanda çalışmalarda kullanılan *P. Aeruginosa* suşları da farklılık arz etmektedir. Bazı çalışmalarda direkt hastalardan elde edilmiş izolatlar kullanılmış iken bazılarında klinik izolatlar kullanılmıştır. Deneylerde oluşturulan pnömoni modelleride farklılık arz etmektedir. Bazı çalışmalarda örneğin *P. Aeruginosa* aljinat içene gömülerek verilmiş ve sadece bakterisiz aljinatın bile akciğerde immün sistemi uyardığı bilinmektedir. Ek olarak deneylerde enfeksiyon oluşturmak için kullanılan *P. Aeruginosa* miktarı da standart değildir. BAL sıvısının toplanma metodu ve toplanma zamanında çalışmalarda değişiklik arz etmektedir. Ancak tahminimize göre bu durumu en iyi açıklayan hipotez Chmiel ve ark. çalışması değerlendirildiğinde ortaya çıkmaktadır (93). Bu çalışmada *P. Aeruginosa* ile enfekte edilen fareler 2, 4, 6 ve 8'inci günde sakrafiye edilerek değerlendirilmişlerdir. Sonuç olarak farelerdeki sitokinlerin genel olarak ikinci günde en üst konsantrasyona ulaştıkları daha sonra düşmeye başladıklarını ve 8'inci günde bazal seviyeye yaklaştıklarını bildirmişlerdir. Muhtemel olarak bizim çalışmamızda Grup I ile Grup II sitokin seviyelerinin arasında fark çıkmamasının nedeni de bu olabilir diye düşünmekteyiz. Kesin olarak bildiğimiz, deneyimizde başarılı bir şekilde pnömoni oluşturduğumuzdur ve bunu da zaten histopatolojik olarak yukarıda ispatlamıştık. Özetle 10-12 haftalık dişi BALB/c farelerde 25-30 µl (1x10⁷ CFU olarak sıvı besiyeri içinde) *P. Aeruginosa* PAO-1 ile intratrakeal yöntemle başarılı bir şekilde pnömoni oluşturulmakta ve 7. Günde bu farelerin BAL

sıvısında yapılan incelemede IL4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL19 sitokin seviyelerinde farklılık gözlenmemektedir.

Prokaryotik organizmalarda hücreler arası iletişim, “quorum sensing”, yeter çoğunluğun algılanması olarak adlandırılmaktadır. Ortamda rahatlıkla difüze olabilen küçük sinyal moleküllerinin üretildiği ve bunların bakteri hücreleri tarafından algılanabildiği bu fenomen, bakteri hücrelerinin çok hücreli organizmalarda olduğu gibi “eş güdüm” içinde hareket edebilmesini sağlamaktadır (157). Bakteri hücrelerinin eş güdümünü gerektiren, “quorum sensing” ile regüle edildiği gösterilmiş olan çeşitli fenotipik özellikler arasında ekzopolisakkarid üretimi, biyofilm oluşumu, motilite, antibiyotik sentezi, virülans faktörlerinin sentezi yer almaktadır (158-160). *P. Aeruginosa* 'da QS sisteminin virülansla ilgili genleri regüle ettiği in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Örneğin, Las sistemi elastaz, alkalin proteaz gibi ekzoenzimlerin sentezinden, ekzotoksin A yapımından, biyofilm oluşumundan, sekresyon aparatı, katalaz, hemolizin ve siderofor oluşumundan sorumludur. Rhl sistemi ise ekzoenzimlerden elastaz yapımını, lektin, hidrojen siyanid, rhamnolipid, siderofor ve sekresyon aparatının oluşumunu kontrol etmektedir (161, 162). Birden fazla virülans faktörünün eş zamanlı olarak kaybının *P. Aeruginosa* 'nın farklı bölgelerde kolonizasyon ve çoğalma kabiliyeti üzerine etkisi ise bilinmemektedir. Eğer *P. Aeruginosa* QS sistemleri gibi çoklu virülans faktörlerinin majör bir regülatöründe bir defekt taşıyorsa bu olasılık ortaya çıkabilir. Günümüzde dirençli bakterilerin hızla yayılımı birçok hastalığın tedavisini zorlaştırmakta bazı durumlarda mümkünsüz kılmaktadır. Bu nedenle, her yıl milyonlarca dolar yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için harcanmakta ancak hızla gelişen bakteriyel direnç daha eczane raflarına ulaşmadan önce antibiyotiklerin etkilerini kaybetmeye başlamalarına neden olmaktadır. İşte tamda bu noktada QS sistemi bizler için bu kısır döngüyü kırmada bir umut olmuştur. Özellikle *P. Aeruginosa* gibi sıkıntılı klinik tablolara yol açan, dirençli bakterilere karşı QS sistemi bizlere yeni umutlar vaat edebilir.

Makrolidler, en iyi bilinen antiinfektiflerdendir. Fakat aynı zamanda immunsupresyon ve immünmodülasyon gibi önemli farmakolojik özellikleri vardır. GİS motor stimülasyon aktivitesi, antikanser, antianoreksijenik etkisi gibi çok değişik etkileri bulunmaktadır (163). Eritromisin ve diğer makrolidlerin önemli

immünomodülatör etkileri vardır. Diffüz panbronşiyolitis (DPB) ve kistik fibrozis (KF) gibi hipersekresyon durumlarının tedavisinde faydalı olduğu bulunmuştur (164). Bu etki özellikle eritromisin, klaritromisin ve azitromisin gibi 14-15 üyeli makrolidlerde görülmüştür. Bu makrolidlerin serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısında sitokin ve mukus hipersekresyonunu düşürdükleri bildirilmiştir (165). Saiman ve arkadaşları kistik fibrozis hastalarında *P.Aeruginosa*'ya bağlı kronik enfeksiyonu olan hastalarda azitromisin tedavisini değerlendirmişlerdir. Hastalara randomize olarak azitromisin ve plesebo verilmiş, azitromisin verilenlerde pulmoner fonksiyonlarda ve yaşam kalitesinde iyileşme, pulmoner alevlenmelerde azalma bulunmuştur (54). Makrolid antibiyotiklerin önemli bir anti-pseudomonal aktivitesi bulunmadığı için bu iyileşmenin antimikrobiyal etkiye bağlı olamayacağı düşünülmektedir.

Azitromisin tedavisinin kronik *P. Aeruginosa* enfeksiyonu olan çocuk ve yetişkin kistik fibrozisli hastalarda akciğer fonksiyonlarında düzelme sağladığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (166). Azitromisin bu etkiyi QS sistemini inhibe ederek ve inflamasyonu azaltarak gösterdiği düşünülmektedir, çünkü azitromisin *P. Aeruginosa*'nın büyümesini inhibe etmediği bilinmektedir (52). Bu ajan, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak polipeptid uzamasını bloke eder ve bunun sonucunda protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir. Azitromisin özellikle *Mycoplasma*, *Legionella* ve *Chlamydia* türleri ile meydana gelen pulmoner enfeksiyonların tedavisinde ya da penisiline alerjisi olan hastalarda Gram pozitif bakteriler ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olup, bu antibiyotiğin antipseudomonal tedavideki yeri yok denecek kadar azdır. Ancak deneysel çalışmalar, uzun süreli azitromisin tedavisinin kistik fibrozisli hastalarda yararı olabileceği yönündedir. Yapılan in-vitro çalışmalar 2 mg/ml azitromisin, *P. Aeruginosa*'da elastaz ve rhamnolipid sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (53). Ayrıca azitromisin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu %80 oranında düşürmekte, bunun sonucunda sinyal moleküllerinin sentezi yaklaşık %90 oranında inhibe olmaktadır. Dolayısıyla makrolid kullanımının, sinyal molekül sentezini inhibe ederek kısmen de olsa doku hasarını önleyebileceği düşünülmektedir (53). Bu bulguyu desteklemek amacıyla yapılan çok merkezli bir klinik çalışmada,

altı yaş üzerinde ve bir seneden daha uzun süre *P. Aeruginosa* ile kolonize olan kistik fibrozisli hastalarda haftada üç gün altı ay boyunca uygulanan azitromisin tedavisinden sonra plasebo grubuna göre hasta grubunda enfeksiyonun şiddetinin azaldığı, pulmoner fonksiyonların iyileştiği ve kilo alımının belirgin ölçüde arttığı saptanmıştır (54). Ancak büyük çok merkezli plasebo kontrollü bir çalışma bu hipotezden yola çıkarak, en az bir yıldır kültürde *P. Aeruginosa*'sı negatif olan genç erişkin ve çocuklara gün aşırı kilolarına göre 250 veya 500 mg azitromisin tedavisi uygulamıştır (167). 24 haftalık tedavi sonucunda azitromisin tedavisi alan grupta akciğer fonksiyonlarında düzelme gözlemlenmemiştir. Ancak tedavi alan grup plasebo grubu ile karşılaştırıldığında alevlenmelerde ve öksürükte tedavi alan grupta azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın tedavi alan grupta anlamlı derecede fazla makrolid dirençli *S. Aureus* ve *H. Influenzae* tespit etmişlerdir.

Yapılan in vitro çalışmalar makrolidlerin makrofaj fonksiyonlarını ve bronşial epitel hücrelerinin pro inflamatuvar yanıtını düzenlediğini ortaya koymuştur. Klaritromisin *P. Aeruginosa*'nın Flajel yapısına yanıt olarak normal hava yolu hücrelerinin erken fazda ürettiği IL 8'i baskılamaktadır (168). Azitromisin selektif olarak kistik fibrozislilerin epitel hücrelerinde TNF- α ekspresyonunu azaltmaktadır (169). Azitromisin makrofajlar tarafından apoptotik hücrelerin fagosite edilmesini arttırmaktadır (170). Bu antiinflamatuvar etkilerine ek olarak azitromisin *P. Aeruginosa*'nın QS den sorumlu genlerinin transkripsiyonunu inhibe etmektedir, bunlar biofilm oluşumunu ve virülans faktörlerinin düzenlenmesini kontrol ederler (52). Azitromisin aynı zamanda tip IV pili yapısını inhibe ederek bakterinin biyofilm oluşturması için gerekli olan titreşim hareketini kısıtlar ve bakterinin fagositoza duyarlılığını artırır (171). Kronik olarak *P. Aeruginosa* ile enfekte edilmiş farelerde makrolid tedavisi CD4+/CD8+ oranını ve lenfosit sayısını normalize eder iken IL 1 β , IL 2, IL 4, IL 5, IFN- γ ve TNF- α 'nın akciğer seviyelerini azaltmaktadır (172,173). Azitromisin kistik fibrozisli farelerde spontan olarak veya lipopolisakkarit uyarımı ile oluşan akut inflamasyonu azaltmaktadır (174). Ek olarak *P. Aeruginosa* ile enfekte farelerde QS sistemini inhibe ederek bakteriyel yükü ve nötrofil infiltrasyonunu da azaltmaktadır (175).

Tsai ve ark. yaptıkları çalışmada kistik fibrozisli fareleri mukoid *P. Aeruginosa* ile enfekte etmişlerdir (176). Fareleri bakterinin verilmesinden sonra 3 ve 5'inci günlerde sakrafiye etmişlerdir. Hayvanların yaşam sürelerini, akciğerlerindeki bakteri yükünü, inflamasyonu, sitokin seviyelerini, beşinci gündeki apoptotik hücre sayılarını değerlendirmişlerdir. Yaptıkları değerlendirme sonucunda kistik fibrozisli farelerin akciğerinde 20 mg/kg azitromisin tedavisinin inflamasyonu ve bakteri yükünü anlamlı derecede azalttığını bildirmişlerdir. Bu etkinin akciğerde azalmış IL 1 β , IL 6, IL 17, TNF- α , MCP-1, KC ve artmış IFN- γ sitokin seviyesi ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Yazarlar nötrofilik inflamatuvar cevabın akciğerlerden *P. Aeruginosa*'nın temizlenmesi için gerekli olduğunu, ancak paradoksal olarak azitromisinin hem akciğer inflamasyonunu hemde bakteriyel yükü azalttığını belirtmektedirler. Akciğer enfeksiyonu oluşturmadan önce makrolit tedavisi verdikleri farelerde yüksek mortalite gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Enfeksiyon bir defa gelişimi nötrofillerden salınan elastaz ile doku hasarı artmakta ve daha çok nötrofil ilgili alana toplanmaktadır. Azitromisin tedavisinin akciğerlerde inflamasyonu azaltarak surveyi uzattığını bildirmişlerdir. Azitromisinin akciğerlerde IFN- γ seviyesini arttırdığını IL 10 seviyesini ise azalttığını bildirmişlerdir. Ancak onların çalışmasının aksine Sugiyama ve ark. azitromisinin IL 10'u arttırdığını IFN- γ seviyesini ise azalttığını bildirmişlerdir (177).

Azitromisin grubunda 8 farede pnömotik konsolidasyon gözlemlendi ve bu durum kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı idi. Kontrol ve Azitromisin grubundaki fareler akciğer dokularındaki inflamatuvar inflamasyon yönünden değerlendirildiğinde; Kontrol grubunda hiçbir farede inflamatuvar inflamasyon gözlemlenmez iken, Azitromisin grubunda tüm farelerde değişik derecede inflamatuvar inflamasyon gözlemlendi. Bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm histolojik parametrelerin toplanması ile elde edilen akciğer hasar skoru değerlendirildi. Kontrol grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 5,6 idi. Azitromisin grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 9,8 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup akciğer dokularındaki nötrofil sayıları yönünden değerlendirildi. Kontrol grubunda peribronşial, perivasküler ve intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Azitromisin grubunda ise tüm bu bölgelerde değişik

derecelerde nötrofil ve monosit yoğunluğu vardı ve bu durum kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda her bir parametrede istatistiki olarak anlamlı fark oluşturuyor idi. Azitromisin tedavisi alan grupta peribronşial, perivasküler alanda monosit hakimiyeti gözlenir iken intra alveolar alanda nötrofil hakimiyeti gözlemlenmekte idi ve bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm bu veriler bize azitromisin tedavisi alan grupta pnömoni oluştuğunu ispatlamaktadır.

Azitromisin tedavisinin pnömoni de histopatolojik parameterelerde düzelme veya kötüleşme yapıp yapmadığını değerlendirmek için azitromisin grubunu sadece pnömoni oluşturduğumuz Grup II ile karşılaştırdık. Her iki grup arasında pnömotik konsolidasyon, konjesyon, hemoraji ve inflamatuvar inflamasyon bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit etmedik. Her iki grup arasında akciğer hasar skoru bakımından da istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit etmedik. Her iki grup arasında peribronşial, perivasküler ve intraalveolar nötrofil ve monosit oranları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu veriler bize azitromisin tedavisinin pnömonide histopatolojik parameterelerde her hangi bir düzelme veya kötüleşme oluşturmadığını göstermektedir.

Kontrol grubu ile Azitromisin grubunu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Kontrol grubu ile Azitromisin grubu arasında IL4, IL 10 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Kontrol grubunda IL 8 ortalaması ile Azitromisin grubunda IL 8 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Kontrol grubunda IL 12 ortalaması ile Azitromisin grubunda IL 12 ortalaması arasında istatistiki olarak anlamlı fark var idi. Pnömoni grubu (Grup 2) ile Azitromisin grubunu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Pnömoni grubu ile Azitromisin grubu arasında IL4, IL 10 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Pnömoni grubunda IL 8 ortalaması ile Azitromisin grubunda IL 8 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Pnömoni grubunda IL 12 ortalaması ile Azitromisin grubunda IL 12 ortalaması arasında istatistiki olarak anlamlı fark var idi. Özetle Azitromisin tedavisi *P. Aeruginosa* PAO-1 ile enfekte BALB/c farelerde BAL sıvısında IL 8 ve IL 12 seviyelerini düşürmekte idi.

Üzerinde çalışılan diğer bir QS inhibitörü, deniz otundan elde edilen bir bileşiktir. Deniz otunun biyolojik olarak aktif halojenize furanon ürettiği ve bu furanonun bitki yüzeyinde yer aldığı zaman gerek prokaryotların gerekse ökaryotların bitki yüzeyinde kolonize olamadıkları gözlemlenmiştir (178). Bu bileşiğin *P. Aeruginosa* üzerinde QS inhibitörü etkisinin olup olmadığını araştırmak üzere sentetik bir furanon geliştirilmiş ve bu bileşiğe C-30 adı verilmiştir. *P. Aeruginosa* kültürlerinde 10 µM C-30 furanon varlığında proteaz, piyoverdin ve kitinaz aktivitelerinin tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir (178). Furanonun QS inhibisyonunu hangi mekanizma ile yaptığı tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Fakat Western blot analizi furanonların LuxR protein turn overını arttırdığını, AHL ile etkileşime geçecek protein miktarını azalttığını ve transkripsiyonel bir düzenleyici gibi etki gösterdiğini göstermektedir (179). Hentzer ve ark. lasB bazlı AHL monitör sistemi kullanarak in vitro ortamda biyofilm oluşumunun QS ile düzenlendiğini tespit etmişlerdir (60,61). Furanone C 30'un enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki potansiyel balık modellerinde de gösterilmiştir. *Vibrio anguillarum* enfeksiyonunda 25 ng/ml⁻¹ furanone C 30 tedavisi gökkuşağı alabalıklarında mortaliteyi azalttığı tespit edilmiştir ve balık yetiştiriciliğinde QS inhibitörlerinin antibiotik tedavilerine alternatif olabileceği bildirilmiştir (180).

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerin hemen hepsinin fayda sağlamadığı bilinmektedir. C-30'un biyofilm üzerine etkisini araştırmak üzere, *P. Aeruginosa* ile oluşturulan biyofilme C-30 uygulandığında biyofilmin sağlam yapısının bozulduğu belirlenmiştir (60). Kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla kullanılan tobramisin C-30 furanonu ile birlikte biyofilm üzerine olan etkileşimi araştırılmış ve C-30 ile tobramisin birlikte kullanılmasıyla tobramisin biyofilm içine rahatlıkla girebildiği ve bakterilerin %5-10'unu canlı bırakacak şekilde biyofilm oluşturan bakteriler üzerine inhibisyon yaptığı saptanmıştır (60). C-30 ile muamele edilmemiş biyofilme tobramisin uygulandığında ise, tobramisin sadece biyofilmin yüzeyinde yer alan hücreler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan in-vitro deneylerden sonra C-30'un etkinliği in-vivo koşullarda çalışılmıştır. *P. Aeruginosa* ile nazal yoldan infekte edilen farelere intravenöz yolla C-30 furanonu verildiğinde, C-30'un kan akımı ile akciğer dokularına penetre olabildiği, bakteri içine girebildiği

ve QS sistemi tarafından kontrol edilen virülans genlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Sentetik halojenize furanon olan C-30'un özellikleri özetle, QS sisteminin ekspresyonunu inhibe etmek, antibiyotiklere dirençli biyofilm oluşumunu engellemek ve fare modelinde akciğerlerde enfektif bakterinin persistansına engel olmaktır. Bu bilgiler ışığında çıkarılacak en önemli nokta, bakteriler arası iletişimin engellenerek bakteri virülansının kontrol altına alınabileceğidir.

Wu ve ark. iki farklı sentetik furanon türevinin (C30, C56) farelerde oluşturdukları kronik akciğer enfeksiyonu modelinde, QS sistemini kullanarak bakteriyel virülans üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (181). Yaptıkları histopatolojik değerlendirme sonucunda C30 tedavisi alan grupları değerlendirmişlerdir ve plasebo grubu ile düşük doz furanon (0,25 µg/g) tedavisi alan grupta akciğer absesi ile birlikte anlamlı doku harabiyeti tespit etmişlerdir. Orta (0,50 µg/g) ve yüksek (0,75 µg/g) doz furanon tedavisi alan grupta ise nötrofil infiltrasyonunun bronşial bölgede lokalize olduğunu ve akciğer dokusunda kronik inflamatuvar değişikliklerin baskın olduğunu bildirmişlerdir. Plasebo ve düşük doz furanon tedavisi alan grupta ağır akut inflamasyon göstergesi olan hemoraji ile birlikte anlamlı nötrofil yoğunluğunu hem bronşial hemde akciğer dokusunda tespit etmişlerdir.

Furanon grubunda 10 farede pnömotik konsolidasyon gözlemlendi ve bu durum kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı idi. Furanon grubunda konjesyon ve hemoraji daha şiddetli gözlenmesine rağmen bu durum istatistiki anlamlığa ulaşmadı. Kontrol ve Furanon grubundaki fareler akciğer dokularındaki inflamatuvar inflamasyon yönünden değerlendirildiğinde; Kontrol grubunda hiçbir farede inflamatuvar inflamasyon gözlemlenmez iken, Furanon grubunda tüm farelerde değişik derecede inflamatuvar inflamasyon gözlemlendi. Bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm histolojik parametrelerin toplanması ile elde edilen akciğer hasar skoru değerlendirildi. Kontrol grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 5,6 idi. Furanon grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 11,2 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup akciğer dokularındaki nötrofil sayıları yönünden değerlendirildi. Kontrol grubunda peribronşial, perivasküler ve intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Furanon grubunda ise tüm bu

bölgelerde değişik derecelerde nötrofil ve monosit yoğunluğu vardı ve bu durum kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda her bir parametrede istatistiki olarak anlamlı fark oluşturuyor idi. Furanon tedavisi alan grupta peribronşial, perivasküler alanda monosit hakimiyeti gözlenir iken intra alveolar alanda hem nötrofil hem de monosit hakimiyeti gözlemlenmekte idi. Tüm bu veriler bize Furanon tedavisi alan grupta pnömoni oluştuğunu ispatlamaktadır.

Furanon tedavisinin pnömoni de histopatolojik parameterelerde düzelme veya kötüleşme yapıp yapmadığını değerlendirmek için Furanon grubunu sadece pnömoni oluşturduğumuz Grup II ile karşılaştırdık. Her iki grup arasında pnömotik konsolidasyon, konjesyon, hemoraji ve inflamatuvar inflamasyon bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit etmedik. Pnömoni grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 8,6 idi. Furanon grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 11,2 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup arasında peribronşial nötrofil ve monosit sayıları bakımından istatistiki olarak anlamlı fark tespit edildi. Furanon grubunda peribronşial nötrofil sayısı pnömoni grubuna göre artmış iken monosit sayısı azalmış idi. Her iki grup arasında perivasküler nötrofil sayısı açısından fark var idi ancak monosit sayısı bakımından fark yok idi. Furanon grubunda perivasküler bölgede nötrofil sayısını artmış idi. Her iki grupta intraalveolar nötrofil sayısı bakımından fark yok idi, ancak monosit sayısı bakımından fark var idi. Furanon grubunda intraalveolar bölgede monosit sayısı artmış idi. Bu veriler bize Furanon tedavisinin pnömonide histopatolojik parameterelerde kötüleşme oluşturduğunu ve burada akciğer dokusunda nötrofil yoğunluğunu arttırarak yaptığını göstermektedir.

Kontrol grubu ile Furanon grubunu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Kontrol grubu ile Furanon grubu arasında IL4, IL 8, IL 10, IL 12 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Pnömoni grubu (Grup 2) ile Furanon grubunu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Pnömoni grubu ile Furanon grubu arasında IL4, IL 8, IL 12 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Pnömoni grubundaki IL 10 ortalaması ile Furanon grubundaki IL 10 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak

anlamli idi. Özetle Furanon tedavisi *P. Aeruginosa* PAO-1 ile enfekte BALB/c farelerde BAL sıvısında IL 10 seviyelerini yükseltmekte idi.

IL 10 antiinflamatuvar bir sitokindir ve *P. Aeruginosa* infeksiyonundan 24 saat sonra pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin seviyeleri azalmaya başladığı zaman üretimi pik yapar (88). Akciğerlerden *P. Aeruginosa*'nın temizlenmesinde nötrofillerin toplanması gerekmektedir ve pro-inflamatuvar sitokinlere karşın IL 10 artışı bu patojenin kontrolünü ve temizlenmesini azaltmaktadır (89-94). Yaptığımız çalışmada Furanon grubunda ve Azitromisin + Furanon grubunda IL 10 seviyesinde artış olduğunu ve her iki grupta akciğer doku harabiyetinin diğer gruplardan fazla olduğunu tespit ettik. Furanon IL 10 seviyesini arttırarak akciğer doku harabiyetinin artmasına neden olmakta idi. En fazla fare ölümü Grup V'de (9 fare), daha sonra Grup III' de (6 fare) gözlemlendi. Her iki grupta IL 10 seviyesi yüksek idi ve IL 10 yüksekliğinden Furanon sorumlu idi.

Azitromisin grubunun ve Furanon grubunun akciğer dokularını histopatolojik olarak karşılaştırdık. Her iki grup arasında pnömotik konsolidasyon, konjesyon, hemoraji, inflamatuvar inflamasyon bakımından istatistiki anlamlılığa ulaşacak bir fark tespit etmedik. Sadece Furanon grubunda konjesyon ve hemoraji biraz daha şiddetli gözleniyor gibi gözükmesine rağmen bu fark istatistiki olarak anlamlılığa ulaşmadı. Tüm histolojik parametrelerin toplanması ile elde edilen akciğer hasar skoru değerlendirildi. Azitromisin grubunun akciğer hasar skoru ortalaması ile Furanon grubunun akciğer hasar skoru ortalaması arasında istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Her iki grup akciğer dokularındaki nötrofil sayıları yönünden değerlendirildi. Her iki grup arasında peribronşial, perivasküler nötrofil ve monosit sayıları bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Yine her iki grup arasında intraalveolar nötrofil sayısı bakımından fark yok idi, ancak monosit sayısı bakımından fark var idi. Furanon grubunda intraalveolar bölgede monosit sayısı artmış idi.

Azitromisin grubu ile Furanon grubunu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Azitromisin grubu ile Furanon grubu arasında IL4 düzeyi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Azitromisin grubunda IL 8

ortalaması ile Furanon grubunda IL 8 ortalaması aradaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Azitromisin grubunda IL 10 ortalaması ile Furanon grubunda IL 10 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Azitromisin grubunda IL 12 ortalaması ile Furanon grubunda IL 12 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Azitromisin grubunda IL 19 ortalaması ile Furanon grubunda IL 19 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Özetle Azitromisin tedavisi IL 8 ve IL 12 seviyesini düşürmekte, Furanon tedavisi IL 10 ve IL 19 düzeyini yükseltmekte idi.

Farelerde ve kistik fibrozisli hastalarda *P. Aeruginosa* akciğer enfeksiyonu durumunda IL 8 üretiminin arttığı bilinmektedir (71,127, 131). IL 8 bir nötrofil kemoatraktanıdır ve kistik fibrozisli hastalarda kronik enfeksiyonlardan, nötrofil akümülyasyonundan ve ilerleyici hava yolu yıkımından sorumlu tutulmaktadır (128-130). *P. Aeruginosa*'nın elastazı, flajeli ve pili yapıları IL 8 üretimini arttırmaktadır ve böylece akciğerde inflamasyonu arttırmaktadır (126,132). Özetle IL 8 *P. Aeruginosa*'nın virülansı için önemlidir ve fazlalığı akciğer doku yıkımına neden olarak, yarardan çok zarara neden olan nötrofil birikiminden sorumludur. Yaptığımız çalışma Azitromisin tedavisinin IL 8 düzeyini azalttığı göstermiştir.

Gram negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaritler güçlü bir immün yanıtı neden olan endotoksinlerdir. İn vitro olarak lipopolisakkaritlerin sitümüle ettiği lökositler TNF- α ve IL 12 gibi bakteriyi öldüren fakat aynı zamanda konakta ağır doku hasarınada neden olan pro-inflamatuar sitokinlerin sekresyonunu uyarır ve akciğer doku hasarı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (143,144). Dolayısı ile bu savunma sisteminin over aktivasyonunun düzenlenmesi çok önemlidir (134-138). Yaptığımız çalışma Azitromisin tedavisinin IL 12 seviyesini azalttığını göstermiştir.

Azitromisin + Furanon tedavisi grubunda 10 farede pnömotik konsolidasyon gözlemlendi ve bu durum kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı idi. Ayrıca Azitromisin + Furanon tedavisi grubunda akciğer dokusunda şiddetli konjesyon, şiddetli hemoraji olduğunu tespit ettik ve bu durum kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı farklılık arz etmekte idi. Kontrol ve Azitromisin + Furanon tedavisi

grubundaki fareler akciğer dokularındaki inflamatuvar inflamasyon yönünden değerlendirildiğinde; Kontrol grubunda hiçbir farede inflamatuvar inflamasyon gözlemlenmez iken, Azitromisin + Furanon tedavisi grubunda tüm farelerde değişik derecede inflamatuvar inflamasyon gözlemlendi. Bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm histolojik parametrelerin toplanması ile elde edilen akciğer hasar skoru değerlendirildi. Kontrol grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 5,6 idi. Azitromisin + Furanon tedavisi grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 14,9 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup akciğer dokularındaki nötrofil sayıları yönünden değerlendirildi. Kontrol grubunda peribronşial, perivasküler ve intraalveolar nötrofil ve monosit sayısı 0 idi. Azitromisin + Furanon tedavisi grubunda ise tüm bu bölgelerde değişik derecelerde nötrofil ve monosit yoğunluğu vardı ve bu durum kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda her bir parametrede istatistiki olarak anlamlı fark oluşturuyor idi. Azitromisin + Furanon tedavisi alan grupta peribronşial, perivasküler, intraalveolar alanda nötrofil hakimiyeti gözlemlenmekte idi ve bu durum istatistiki olarak anlamlı idi. Tüm bu veriler bize Azitromisin + Furanon tedavisi alan grupta pnömoni oluştuğunu ispatlamaktadır.

Azitromisin + Furanon tedavisi pnömoni de histopatolojik parameterelerde düzelme veya kötüleşme yapıp yapmadığını değerlendirmek için Azitromisin + Furanon tedavisi grubunu sadece pnömoni oluşturduğumuz Grup II ile karşılaştırdık. Her iki grup arasında pnömotik konsolidasyon, konjesyon ve hemoraji bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark var idi. Her iki grup arasında inflamatuvar inflamasyon bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit etmedik, ancak istatistiki anlamlılığa ulaşmasa da Azitromisin + Furanon tedavisi alan grupta daha şiddetli inflamatuvar infiltrasyon gözlemlenmekte idi. Pnömoni grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 8,6 idi. Azitromisin + Furanon tedavisi grubunun akciğer hasar skoru ortalaması 14,9 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı. Her iki grup arasında peribronşial ve perivasküler nötrofil ve monosit oranları arasında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edildi. Ancak her iki grup arasında intraalveolar nötrofil sayısı bakımında istatistiki olarak fark var iken monosit sayısı bakımından arada bir fark tespit edilmedi. Bu veriler bize Azitromisin + Furanon

tedavisi pnömonide histopatolojik parametereleri kötüleştirdiğini bunuda akciğer dokusunda nötrofil birikimini arttırarak yaptığını göstermektedir.

Kontrol grubu ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grubun BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Kontrol grubu ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grup arasında IL4, IL 8, IL 12 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Kontrol grubunda IL 10 ortalaması ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grubun IL 10 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Pnömoni grubu (Grup 2) ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grubu BAL sıvısındaki sitokin seviyeleri bakımından karşılaştırdık. Pnömoni grubu ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grubun arasında IL4, IL 8, IL 12 ve IL 19 bakımından istatistiki olarak anlamlı fark yok idi. Pnömoni grubunda IL 10 ortalaması ile Azitromisin + Furanon tedavisi alan grubun IL 10 ortalaması arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi. Özetle Azitromisin + Furanon tedavisi *P. Aeruginosa* PAO-1 ile enfekte BALB/c farelerde BAL sıvısında IL 10 seviyelerini arttırmaktadır. Bundan da Furanon komponentinin sorumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak 45 adet BALB/c cinsi 10-12 hafta/15-20 gr dişi farenin 40 adetinde 25-30 µl (1x10⁷ CFU olarak sıvı besiyeri içinde) *P. Aeruginosa* PAO-1'in intratrakeal uygulanması ile başarılı bir şekilde akciğer pnömonisi oluşturulmuştur. Oluşturulan pnömoni histopatolojik olarak hem skorlama sistemi hemde akciğer dokusundaki nötrofil sayıları ve patolojik kesitler ile ortaya konulmuştur.

P. Aeruginosa PAO-1'in intratrakeal olarak uygulanması pnömotik konsolidasyona, konjesyona, hemorajiye ve inflamatuvar infiltrasyona neden olmaktadır. Peribroşial, perivasküler alanda nötrofillere göre monosit hakimiyeti gözlemlenir iken, intraalveolar alanda nötrofil hakimiyeti gözlemlenmektedir.

Azitromisin tedavisinde akciğer histopatolojisinde değişiklik gözlenmez iken, Furanon tedavisinde akciğer harabiyetinde artış meydana gelmektedir. Bunun nedenide akciğer dokusunda artmış nötrofil birikimidir.

Azitromisin + Furanon tedavisi bu doku harabiyetini daha da arttırmaktadır. Bu artış etkisinden de tedavinin Furanon komponenti sorumlu olabilir. Etken mekanizma olarak ise yine nötrofil birikimin deki artış sorumludur.

Azitromisin IL 8 ve IL 12 seviyelerini azaltmakta, Furanon ise IL 10 seviyelerini arttırmaktadır.

P. aeruginosa pnömonisi halen hem toplumda, hem çocuklarda hemde kistik fibrozis gibi kronik hastalıklarda önemini korumakta ve altta yatan patoloji ve bakterinin virülans faktörleri tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonu üzerinde çalışarak, *P. Aeruginosa* tarafından oluşturulan enfeksiyonu QS inhibitörleri ile bloke etmeyi ve etyopatogenezi ortaya koyarak, yeni tedavi modalitelerine kaynak olmayı hedeflemiştik. Elde ettiğimiz veriler bize azitromisin tedavisinin QS sistemi üzerindeki etkisi nedeni ile *P. Aeruginosa*'ya direkt etkili bir antibiotik ile beraber verilmesi durumunda antipseudomonal antibiotiklerin etkisini potansiyelize edebileceğini düşündürmektedir. Furanon ise her ne kadar QS inhibitörü olsada IL 10 artışı gibi ek mekanizmalar ile akciğer doku harabiyetini arttırabilmektedir ve *P. Aeruginosa*'nın klinik tedavisinde ümit vaat edici olarak gözükmemektedir. Her ne kadar elimizdeki imkânlar ile etki mekanizmasını tam olarak ortaya koyamamış olsak da, Azitromisinin ve Furanonun tek başına veya kombine olarak en azından bu dozlarda *P. Aeruginosa* pnömosinin tedavisinde etkili olmadığını ve bu dozlardan yüksek dozlarda etkili olsa bile yan etkilerden dolayı kullanım alanı bulamayacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle QS inhibitörleri ile *P. Aeruginosa* pnömosinin tedavisinde yeni inhibitör etken maddelerin bulunması ve diğer antibiotikler ile birlikte tedavi planlanmasının daha yararlı olacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

İnvivo Ortamda Qs İnhibitörlerinin Etkinliğinin Araştırılması ve Dokular Üzerindeki Etkilerinin Saptanması

Çeşitli virülans faktörleri üreten *Pseudomonas aeruginosa* bu faktörlerin sentezini gram negatif ve gram pozitif bakterilerde gen düzenlenmesinden sorumlu önemli bir mekanizma olan Quorum Sensing (QS) ile sağlar. Çalışmamızda fareler üzerinde *Pseudomonas aeruginosa* pnömoni modeli oluşturularak, oluşturulan enfeksiyonu QS inhibitörleri ile bloke etmeye çalıştık.

Çalışmada 45 adet BALB/c cinsi 10-12 hafta/15-20 gr dişi fareler kullanıldı. I. Grup: Kontrol; II. Grup: *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1); III. Grup: PAO1 + Furanone C-30; IV. Grup: PAO1 + Azitromisin; V. Grup: PAO1 + Furanone C-30 + Azitromisin olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Deney başlangıcında (0.gün) tüm farelere grup 1'deki fareler hariç PAO1 ile transtrekeal olarak enfekte edilmiştir. Furanone C-30 0.75 µg/g (SC) olarak, azitromisin 0.02mg/g dozunda (SC) uygulanmıştır. Bir hafta sonra (7.gün) tüm fareler sakrafiye edilmiştir.

45 adet BALB/c cinsi farenin 40 adetinde 25-30 µl (1x10⁷ CFU) PAO-1'in intratrakeal uygulanması ile başarılı bir şekilde akciğer pnömonisi oluşturulmuştur. Oluşturulan pnömoni histopatolojik olarak hem skorlama sistemi hemde akciğer dokusundaki nötrofil sayıları ve patolojik kesitler ile ortaya konulmuştur. Azitromisin tedavisinde akciğer histopatolojisinde değişiklik gözlenmez iken, Furanon tedavisinde akciğer harabiyetinde artış meydana gelmektedir. Bunun nedenide akciğer dokusunda artmış nötrofil birikimidir. Azitromisin + Furanon tedavisi bu doku harabiyetini daha da arttırmaktadır. Bu artış etkisinden tedavinin Furanon komponenti sorumludur. Azitromisin IL 8 ve IL 12 seviyelerini azaltmakta, Furanon ise IL 10 seviyelerini arttırmaktadır.

Azitromisin ve Furanon tedavisinin en azından bu dozlarda *P. Aeruginosa* pnömosinin tedavisinde etkili olmadığını düşünmekteyiz. Bu nedenle QS inhibitörleri ile *P. Aeruginosa* pnömosinin tedavisinde yeni inhibitör etken maddelerin bulunmasının, diğer antibiyotikler ile birlikte tedavi planlanmasının daha yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Azitromisin, BALB/C fare, Furanon, *P. aeruginosa*, Quorum Sensing.

SUMMARY

The in Vivo Investigation of Qs Inhibitor Efficiency and Determination of the Effectiveness on Tissues.

Pseudomonas aeruginosa produces miscellaneous virulence factors and it provides these factors synthesis by Quorum Sensing (QS) which is responsible for the gram-negative and gram-positive bacteria gene regulation. In present study we are creating a pneumonia model with *Pseudomonas aeruginosa* at mice and tried to blocked the created infection by QS inhibitors.

In study 45 female BALB/ c mice weighing 15 to 20 g (10-12 week) were used. They were completely randomized into 5 groups: grup 1; control, grup 2; *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), grup 3; PAO1 + Furanone C-30, grup 4; PAO1 + Azithromycin, grup 5; PAO1 + Furanone C-30 + Azithromycin. The beginning of the experiment (Day 0) all mice, except group 1, were infected with intratracheal instillation of PAO1. The applied dose of Furanone C-30 and Azithromycin were 0.75 µg/g (SC) and 0.02mg/g (SC), respectively. A week later (day 7), all mice were sacrificed.

The pulmonary pneumonia were successfully created at 40 of 45 BALB/c mice with intratracheal instillation of 25-30 µl (1x10⁷ CFU) PAO1. The pneumonia were determined with histopathological methods that involves both scoring system and the number of neutrophils in lung tissue at pathological sections. Azithromycin treatment weren't caused any changes in lung histopathology, while the furanone treatment increased lung injury. The reason of this was increased neutrophil recruitment. Azithromycin + Furanone treatment were further increased this tissue destruction. The treatments Furanone component were responsible of this increased effect. Azithromycin were decreased the levels of IL 8 and IL 12, Furanone were increased the level of IL 10.

We thought that at least these doses of Azithromycin and Furanone treatment didn't effective at *P. Aeruginosa* pneumonia treatment. Therefore, discovery of new inhibitor active substances in the treatment of *P. Aeruginosa* pneumonia and use of them with other antibiotics would be more beneficial at treatment planning.

Keywords: Azithromycin, BALB/C Mouse, Furanone *P. aeruginosa*, Quorum Sensing.

KAYNAKLAR

1. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Edition, Pennsylvania, USA: Elsevier Inc, 2005:pp.2587-2615
2. McGrath S, Wade DS, Pesci EC. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett*. 2004;15;230 (1):27-34.
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 2007;67(3):351-368.
4. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 2000;68:4331-4334.
5. Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining S, Frank DW, Doroques DB, Long T, Gropper MA, Wiener-Kronish JP. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun* 1998;66:3242-3249.
6. Kievit TR, Iglewski BH: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839-4849.
7. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *J Hosp Infect* 1999;43: 211-218.
8. Boşgelmez-Tınaz G, Ulusoy S, Uğur A, Ceylan Ö. Inhibition of quorum sensing regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Curr Microbiol* 2006;55(2):114-8.
9. Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Saier MH JR. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* 2003;149 :3051-3072.
10. Palleroni NJ. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 2003;149 (Pt 1): 1-7.
11. Deretic V, Schurr MJ, Yu H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 1995;3 (9):351-356.
12. Winn JR W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. In: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Edition, Baltimore, MD, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:pp.303-391.
13. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2006;(3):170-174.
14. Chan J, Hadley J. The microbiology of chronic rhinosinusitis. results of a community surveillance study. *Ear Nose Throat J* 2001;80 (3):143-145.
15. Shannon KP, French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(5):818-825.

16. Sasaki M, Hiyama E, Takesue Y, Kodaira M, Sueda T, Yokoyama T. Clinical surveillance of surgical imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. *J Hosp Infect* 2004;56(2): 111-118.
17. Micek ST, Kollef KE, Reichley RM, Roubinian N, Kollef MH. Health care-associated pneumonia and community acquired pneumonia: a singlecenter experience. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;5 (10):3568-3573.
18. Esel D, Doğanay M, Alp E, Sumerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. *Clin Microbiol Infect* 2003;9 (10):1038-1044.
19. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):551-560.
20. Gransden WR, Leibovici L, Eykyn SJ, Pitlik SD, Sarma Z, Konisberger H, Drucker M, Phillips I. Risk factors and a clinical index for diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Clin Microbiol Infect* 1995;1(2):119-123.
21. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(5):627-634.
22. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 1998;66:43-51.
23. Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlet LD. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 1994;62:4572-4579.
24. Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 2002;70:1352-1358.
25. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal infect* 2006;36:78-91.
26. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001;183:5395-5401.
27. Erdem B. *Pseudomonaslar*. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş kitabevi, 1999:s.551-8.
28. Gillihan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed, Washington: ASM Press, 1995;509-19.
29. Leidal KG, Munson KL, Denning GM. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:186-195.
30. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7072-7077.

31. Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O' Callaghan RJ, Wright JR. Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:409-418.
32. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AL, Vasil ML. Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 1999;67:2371-2376.
33. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C. USA: ASM Press 1994; pp.260-268.
34. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor Pseudomonas aeruginosa. *Anal Bioanal Chem* 2007;387(2):409-414.
35. De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839-4849.
36. Taga ME, Bassler BL. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14549-14554.
37. Akova M. Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: Umut vadeden yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı. *ANKEM* 2005;19:126-128.
38. Camara M, Williams P, Hardman A. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial smail-laik. *Lancet Infect Dis* 2002;2:667-676.
39. Schaber JA, Carty NL, Mcdonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quorum sensing deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *J Med Microbiol* 2004;53:841-853.
40. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyi OD, Young JM. Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:417-423.
41. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11(3-4):217- 21.
42. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. Pseudomonas aeruginosa chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr* 2007;19(1):83-8.
43. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR. Mucin-Pseudomonas aeruginosa interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 2006;59(1):142-51.
44. Baskın H. Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: "Quorum sensing" (Çoğunluğu algılama). *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2006;36(2):111- 5.
45. Hogardt M, Roeder M, Schreff AM, Eberl L, Heesemann J. Expression of Pseudomonas aeruginosa exoS is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* 2004;150:843-851.
46. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa. *Microbes Infect* 2000;2:1721-1731.
47. Bazire A, Dheilly A, Diab F, Morin D, Jebbar M, Haras D, Dufour A. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and ramnolipid biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Lett* 2005;253:125-131.
48. Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andreumont A, Ruimy R. Transcription of quorum sensing system genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 2003;185:7222-7230.

49. Singh MP, Greenstein M. A simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL) related compounds in microbial extracts. *J Microbiol Methods* 2006;65:32-37.
50. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* 2006;296:149-161.
51. Rasmussen T, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* 2006;152:895-904.
52. Tateda K, Comte R, Pechere J, Köhler T, Yamaguchi K. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1930-1933.
53. Tateda K, Matsumoto N, Huruya N, Nagashima T. Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides: Exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2271-2275.
54. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, Coquillotte S, Fieberg AY, Accurso FJ, Campbell PW 3rd; Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: A randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:1749-1756.
55. Ni N, Li M, Wang J, Wang B. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. *Med Res Rev* 2009;29:65-124.
56. Ren D, Sims JJ, Wood TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5 (bromomethylene)-3- butyl-2(5H)- furanone. *Environ Microbiol* 2001;3(11):731-736.
57. Manefield M, Welch M, Givskov M, Salmond GPC, Kjelleberg S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;205:131-138.
58. Smith KM, Bu Y, Suga H. Induction and Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. *Chem Biol* 2003;10:81-89.
59. Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, Limpert AS, von Götz F, Steinmetz I, Eberl L, Tümmler B. Globalregulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2004;150:831-841.
60. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003;22:3803-3815.
61. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003;112:1300-1307.
62. Choo JH, Rukayadi Y, Hwan JK. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol* 2006;42:637-641.
63. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen HP, Rygaard J, Moser J, Eberl L, Høiby N, Givskov M. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 2005;151: 3873-3880.

64. Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 2004;53:1563-1571.
65. Festing MFW, Overend P, Gaines Das R, Cortina BM, Berdoy M. The Design of Animal Experiments: reducing the use of animals in research through better experimental design. London: The Royal Society of Medicine Press Limited, 2002.
66. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002;43:244-58.
67. Utkan ZN, Cantürk NZ. Deneysel hayvanlarının ve deneysel modellerinin seçimi. In: Cantürk NZ ve Sayek İ, ed. Cerrahi Araştırma. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2005:125-9.
68. Pauwels RA, Germonpre PR, Kips JC, Joos GF. Genetic control of indirect airway responsiveness in the rat. *Clin Exp Allergy* 1995;25:55-60.
69. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization 2008. Switzerland.
70. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:387-98.
71. Moser C, van Gennip M, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Lee B, Hougen HP, Calum H, Ciofu O, Giskov M, Molin S, Høiby N. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *APMIS* 2009;117:95-107.
72. van Gennip M, Moser C, Christensen LD, Bjarnsholt T, Calum H, Jensen PØ, Christophersen L, Hougen HP, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Høiby N. Augmented effect of early antibiotic treatment in mice with experimental lung infections due to sequentially adapted mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(6):1241-50.
73. Iwata M, Sato A. Morphological and immunohistochemical studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1991;59(4):1514-20.
74. Tang H, Kays M, Prince A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* 1995;63(4):1278-85.
75. van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, Konstan MW, Davis PB, Erokwu B, Haxhiu MA, Ferkol TW. Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):271-9.
76. Smith RS, Wolfgang MC, Lory S. An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 2004;72(3):1677-84.
77. Boyd AR, Hinojosa CA, Rodriguez PJ, Orihuela CJ. Impact of oral simvastatin therapy on acute lung injury in mice during pneumococcal pneumonia. *BMC Microbiol* 2012;15:12:73.
78. Wangdi T, Mijares LA, Kazmierczak BI. In vivo discrimination of T3SS positive and negative *Pseudomonas aeruginosa* via a caspase-1 dependent pathway. *Infect Immun* 2010;78:4744-4753.
79. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS ONE* 2009;4:e7259.

80. Skerrett SJ, Martin TR, Chi EY, Peschon JJ, Mohler KM, Wilson CB. Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol* 1999;276:L715–L727.
81. Lee JH, Del Sorbo L, Khine AA, de Azavedo J, Low DE, Bell D, Uhlig S, Slutsky AS, Zhang H. Modulation of bacterial growth by tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;168:1462–1470.
82. Gosselin D, DeSantis J, Boule M, Skamene E, Matouk C, Radzioch D. Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1995;63:3272–3278.
83. Buret A, Dunkley ML, Pang G, Clancy RL, Cripps AW. Pulmonary immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats: roles of alveolar macrophages, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 alpha. *Infect Immun* 1994;62:5335–5343.
84. Kolls JK, Lei D, Nelson S, Summer WR, Greenberg S, Beutler B. Adenovirus-mediated blockade of tumor necrosis factor in mice protects against endotoxic shock yet impairs pulmonary host defense. *J Infect Dis* 1995;171:570–575.
85. Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, Tateda K, Kyasapura BL, Standiford TJ. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol* 2000;165:6496–6503.
86. Choi S, Park YS, Koga T, Treloar A, Kim KC. TNF-alpha is a key regulator of MUC1, an antiinflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:255–260.
87. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1996;157:12–20.
88. Wölbeling F, Munder A, Kerber-Momot T, Neumann D, Henning C, Hansen G, Tümmler B, Baumann U. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Immunobiology* 2011;216:901–908.
89. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 Is a Major Mediator of Sepsis-Induced Impairment in Lung Antibacterial Host Defense. *J Immunol* 1999;162:392–399.
90. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun* 2010;78:1582–1592.
91. Sun L, Guo RF, Newstead MW, Standiford TJ, Macariola DR, Shanley TP. Effect of IL-10 on Neutrophil Recruitment and Survival after *Pseudomonas aeruginosa* Challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:76–84.
92. Spight D, Zhao B, Haas M, Wert S, Denenberg A, Shanley TP. Immunoregulatory effects of regulated, lung-targeted expression of IL-10 in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:251–265.
93. Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Lester Kirchner H, Berger M. Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1176–1181.

94. Sawa T, Corry D, Gropper M, Ohara M, Kurahashi K, Wiener-Kronish J. IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol* 1997;159:2858–2866.
95. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Barber A, Manogue K, Tracey KJ, Kuo G, Fischman DA, Cerami A. Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins. *Am J Physiol* 1989;256:R659–R665.
96. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988;167:1211–1227.
97. Moldawer LL, Svaninger G, Gelin J, Lundholm KG. Interleukin 1 and tumor necrosis factor do not regulate protein balance in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1987;253:C766–C773.
98. Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1764–1769.
99. Oldenburg HS, Rogy MA, Lazarus DD, Van Zee KJ, Keeler BP, Chizzonite RA, Lowry SF, Moldawer LL. Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur J Immunol* 1993;23(8):1889-94.
100. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311–320.
101. Schultz MJ, Knapp S, Florquin S, Pater J, Takeda K, Akira S, van der Poll T. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2003;71:1630 – 1634.
102. Schultz MJ, Rijneveld AW, Speelman P, van Deventer SJ, van der Poll T. Endogenous interferon-gamma impairs bacterial clearance from lungs during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:39–44.
103. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743–750.
104. Hazlett LD, McClellan S, Kwon B, Barrett R. Increased severity of *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection in strains of mice designated as Th1 versus Th2 responsive. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:805–810.
105. Kondratieva TK, Kobets NV, Khaidukov SV, Yermeev VV, Lyadova IV, Apt AS, Tam MF, and Stevenson MM. Characterization of T-cell clones derived from lymph nodes and lungs of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible and resistant mice following immunization with heat-killed bacteria. *Clin Exp Immunol* 2000;121:275–282.
106. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Høiby N. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS* 1997;105:838–842.
107. Tam M, Snipes GJ, Stevenson MM. Characterization of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible inbred mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:710–719.
108. Hartl D, Griese M, Kappler M, Zissel G, Reinhardt D, Rebhan C, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:204–11.

109. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Høiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS* 2000;108:329–35.
110. Banchereau J, Rybak ME. Interleukin-4. In: Thomson A(ed.), *The cytokine handbook*. San Diego, Calif: Academic Press, 1995: p. 99–126.
111. Berger M. Inflammation in the lung in cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy* 1991;9:119–142.
112. Capsoni F, Minonzio F, Ongari AA, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN γ . *J Leukocyte Biol* 1995;58:351–358.
113. Chen BDM, Sensenbrenner L, Fan K, Run Q. Murine recombinant IL-4 is a bifunctional regulator of macrophage growth induced by colony-stimulating factors. *J Immunol* 1992;148:753–759.
114. Sampson LL, Heuser J, Brown EJ. Cytokine regulation of complement receptor-mediated ingestion by mouse peritoneal macrophages. GM-CSF and IL-4 activate phagocytosis by a common mechanism requiring autostimulation by IFN- γ . *J Immunol* 1991;146:1005–1013.
115. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunology macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176:287–292.
116. Bober LA, Waters TA, Pugliese-Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK. IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Immunol* 1995;99:129–136.
117. Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, Borish L. Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:978–984.
118. Girard D, Paquin D, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 1997;325:147–153.
119. Poe JC, Wagner DH, Miller RW, Stout RD, Suttles J. IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signalling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis. *J Immunol* 1997;159:846–852.
120. Andersson A, Grunewald SM, Duschl A, DiSanto JP. Mouse macrophage development in the absence of the common γ chain: defining receptor complexes responsible for IL-4 and IL-13 signalling. *Eur J Immunol* 1997;27:1762–1768.
121. Jungi TW, Brcic M, Sager H, Dobbelaere DAE, Furger A, Roditi I. Antagonistic effects of IL-4 and interferon γ on inducible nitric oxide synthase expression in bovine macrophages exposed to gram-positive bacteria. *Clin Exp Immunol* 1997;109:431–438.
122. Perreti M, Szabo C, Thiemertmann C. Effect of interleukin 4 and interleukin 10 on leukocyte migration and nitric oxide production in the mouse. *Br J Pharmacol* 1995;116:2251–2257.
123. Essner R, Rhoades K, McBride WH, Morton DL, Economou JS. IL-4 downregulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol* 1989;142:3857–3861.
124. Kambayashi T, Jacob CO, Stassmann G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. *Cell Immunol* 1996;171:153–158.
125. Jain-Vora S, LeVine AM, Chronos Z, Ross GF, Hull WM, Whitsett JA. Interleukin-4 Enhances Pulmonary Clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1998;66(9):4229–36.

126. Azghani AO, Baker JW, Shetty S, Miller EJ, Bhat GJ. Pseudomonas aeruginosa elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflamm Res* 2002;51: 506-510.
127. Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu WJ, Singh IS, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF- κ B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L407–L416.
128. Sturges NC, Wikström ME, Winfield KR, Gard SE, Brennan S, Sly PD, Upham JW. Monocytes from children with clinically stable cystic fibrosis show enhanced expression of Toll-like receptor 4. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:883–889.
129. Prince A. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:548–551.
130. Huber AR, Kunkel SJ, Todd RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254:99–102.
131. Dean TP, Daij Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993;34:159–161.
132. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995;96:2204–2210.
133. Shanks KK, Guang W, Kim KC, Lillehoj EP. Interleukin-8 Production by Human Airway Epithelial Cells in Response to Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates Expressing Type a or Type b Flagellins. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(8):1196-202.
134. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 1996;26:1647–1651.
135. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998;8:383–390.
136. Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, Kurimoto M. Interleukin-18 activates NF- κ B in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:454–457.
137. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1. *Eur J Immunol* 2000;30:3057–3060.
138. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol* 2001;167:2879–2886.
139. Decken K, Köhler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, Gately MK, Alber G. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* 1998;66:4994–5000.
140. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1997;186:39–45.

141. Yamamoto N, Kawakami K, Kinjo Y, Miyagi K, Kinjo T, Uezu K, Nakasone C, Nakamatsu M, Saito A. Essential role for the p40 subunit of interleukin-12 in neutrophil-mediated early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*: involvement of interferon-gamma. *Microbes Infect* 2004;6:1241–1249.
142. Allavena P, Paganin C, Zhou D, Bianchi G, Sozzani S, Mantovani A. Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium. *Blood* 1994;84:2261–2268.
143. Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Hara N. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1128–L1137.
144. Sakamoto H, Zhao LH, Jain F, Kradin R. IL-12p40(-/-) mice treated with intratracheal bleomycin exhibit decreased pulmonary inflammation and increased fibrosis. *Exp Mol Pathol* 2002;72:1–9.
145. Mitola S, Strasly M, Prato M, Ghia P, Bussolino F. IL-12 regulates an endothelial cell-lymphocyte network: effect on metalloproteinase-9 production. *J Immunol* 2003;171:3725–3733.
146. Zhong H, Wu Y, Belardinelli L, Zeng D. A2B adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:587–592.
147. Huang F, Wachi S, Thai P, Loukoianov A, Tan KH, Forteza RM, Wu R. Potentiation of IL-19 expression in airway epithelia by IL-17A and IL-4/IL-13: important implications in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1415–1421.
148. Rømer J, Hasselager E, Nørby PL, Steiniche T, Thorn Clausen J, Kraqballe K. Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. *J Invest Dermatol* 2003;121:1306–1311.
149. Koks S, Kingo K, Ratsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 2004;5:662–667.
150. Sabat R, Wallace E, Endesfelder S, Wolk K. IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:601–612.
151. Alanara T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomaki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scand J Rheumatol* 2010;39:118–126.
152. Hung L-Y, Nguyen TT, Wu R. Expression of IL-19 in Airway Epithelial Cells During Asthmatic Response. *J Immunol* 2009;182:79.11.
153. Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Peat JD, Vazquez N, Pestka S, Donnelly RP, Kotenko SV. Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* 2000;1:442–450.
154. Pletnev S, Magracheva E, Kozlov S, Tobin G, Kotenko SV, Wlodawer A, Zdanov A. Characterization of the recombinant extracellular domains of human interleukin-20 receptors and their complexes with interleukin-19 and interleukin-20. *Biochemistry* 2003;42:12617–12624.
155. Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKerman PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes – Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 2002;277:47517–47523.

156. Jordan WJ, Eskdale J, Boniotto M, Lennon GP, Peat J, Campbell JD, Gallagher G. Human IL-19 regulates immunity through auto-induction of IL-19 and production of IL-10. *Eur J Immunol* 2005;35:1576–1582.
157. Walters M, Sperandio V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006;74(10):5445–55.
158. Jeon B, Itoh K. Production of shiga toxin by a luxS mutant of *Escherichia coli* O157:H7 in vivo and in vitro. *Microbiol Immunol* 2007;51(4):391–6.
159. Morici LA, Carterson AJ, Wagner VE, Frisk A, Schurr JR, zu Bentrup KH, Hassett DJ, Iglewski BH, Sauer K, Schurr MJ. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *J Bacteriol* 2007;189(21):7752–64.
160. McGowan SJ, Barnard AM, Bosgelmez G, Sebahia M, Simpson NJ, Thomson NR, Todd DE, Welch M, Whitehead NA, Salmond GP. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol* 2005;55(2):526–45.
161. Gambella MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* las R gene, a transcriptional acylator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991;173: 3000–3009.
162. Ochsner U, Koch A, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in a *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1994;176:2044–2054.
163. Culic O, Erakovic V, Parnhalm MJ. Antiinflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:209–29.
164. Pasquale TR, Tan JS. Nonantimicrobial effects of antimicrobial agents. *CID* 2005;40(1):127–35.
165. Rubin KB, Henke OM. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. *CHEST* 2004;125:70S–78S.
166. Yousef AA, Jaffe A. The role of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2010;11:108–114.
167. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Hocesvar-Trnka J, Goss CH, Rose LM, Burns JL, Marshall BC, Ratjen F, AZ0004 Azithromycin Study Group. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010;303:1707–1715.
168. Shinkai M, Lopez-Boado YS, Rubin BK. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1096–101.
169. Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:975–81.
170. Hodge S, Hodge G, Brozyna S, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2006;28:486–95.
171. Nalca Y, Jansch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Haussler S. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1680–8.

172. Yanagihara K, Tomono K, Kuroki M, Kaneko Y, Sawai T, Ohno H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Maesaki S, Kadota J, Kohno S. Intrapulmonary concentrations of inflammatory cytokines in a mouse model of chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* 2000;122:67–71.
173. Yanagihara K, Tomono K, Sawai T, Hirakata Y, Kadota J, Koga H, Tashiro T, Kohno S. Effect of clarithromycin on lymphocytes in chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:337–42.
174. Legssyer R, Huaux F, Lebacqz J, Delos M, Marbaix E, Lebecque P, Lison D, Scholte BJ, Wallemacq P, Leal T. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in DeltaF508 cystic fibrosis mice. *Respir Res* 2006;7:134.
175. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Høiby N. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr(-/-)* mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3677–87.
176. Tsai WC, Hershenson MB, Zhou Y, Sajjan U. Azithromycin increases survival and reduces lung inflammation in cystic fibrosis mice. *Inflamm Res* 2009;58(8):491-501.
177. Sugiyama K, Shirai R, Mukae H, Ishimoto H, Nagata T, Sakamoto N, Ishii H, Nakayama S, Yanagihara K, Mizuta Y, Kohno S. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2007;147:540–6.
178. Dworjanyn SA, de Nys R, Steinberg PD. Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biol* 1999;133:727-736.
179. Manefield M, Rasmussen TB, Hentzer M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 2002;148:1119–1127.
180. Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann KS, Larsen JL, Johansen C, Riedel K, Eberl L, Givskov M, Gram L. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol* 2004;27:350–359.
181. Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Molin S, Givskov M, Høiby N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(6):1054-61.