

T. C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

**DEĞİŞİK KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA
VİRÜLANS FAKTÖRLERİ VE BU FAKTÖRLERİN
SENTEZLENMESİNDE ROL OYNAYAN BAKTERİYEL
İLETİŞİM “QUORUM SENSİNG” SİSTEMİNDEKİ
SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN HASTALIK
PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ**

163878

Dr. Süleyman ÖNAL

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 1000-TU-04 proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA - 2005

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Kısaltmalar	ii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pseudomonas aeruginosa mikrobiyolojik özellikleri	5
2.2. Biyokimyasal özellikleri	5
2.3. Antijenik yapısı	6
2.4. Virulans faktörleri	7
2.4.1. Adhezinler	8
2.4.2. Polisakkarit Kapsül	9
2.4.3. Elastaz ve Alkalen Proteaz	9
2.4.4. Sitotoksin (Lökosidin)	10
2.4.5. Fosfolipaz C ve Rhamnolipid	10
2.4.6. Endotoksin	10
2.4.7. Ekzotoksin A	10
2.4.8. Ekzoenzim S ve T	11
2.4.9. Piyosiyenin	11
2.5. Patogenez	12
2.6. Plasmidleri, fajları, bakteriyosinleri	12
2.7. Dirençlilik	13
2.8. Laboratuvar tanısı	13
3. BAKTERİYEL İLETİŞİM: "QUORUM-SENSING"	14
3.1. QS Sisteminde Yer Alan Sinyal Molekülleri	15
3.2. Pseudomonas aeruginosa'da Bulunan QS Sistemi ve Virülanstaki Rolü	17
3.3. QS Sisteminin Konak Yanıtı Üzerine Etkisi	22
3.4. Farklı Cinsler Arasında Etkileşimlerle QS Sisteminin Rolü	25
3.5. Enfeksiyonlardan Korunma ve Tedavide QS inhibitörlerinin Yeri	26

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER	29
4.1. GEREÇLER	29
4.1.1. Besiyerleri	29
4.1.2. Kimyasal Maddeler	29
4.2. ARAÇLAR	30
4.3. YÖNTEMLER	31
4.3.1. Klinik örneklerin izolasyonu	31
4.3.2. Enzim Ölçümleri İçin Supernatan Hazırlanması	31
4.3.3. Elastaz Tayini (Elastin Kongo Kırmızısı Deneyi)	32
4.3.4. Total Proteaz Tayini	32
4.3.5. Piyosiyanın Tayini	33
4.3.6. Biofilm Ölçümü	34
4.3.7. Sinyal moleküllerinin tayini	35
4.3.8. AHL Saptanması için Paralel Çizim Yöntemi	36
4.3.9. İstatistik	36
5. BULGULAR	37
6. TARTIŞMA	45
ÖZET	57
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	61

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emeği geçen, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım sırasında endişelendiğim anlarda beni cesaretlendirerek motive eden, Saygıdeğer hocam, tez danışmanım, Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Buket Cicioğlu Arıdoğan'a, deneyimleriyle ve rehberliğiyle ışık tutan Doç. Dr. Mustafa Demirci'ye, tez çalışmam sırasında yardım ve katkılarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Selçuk Kaya'ya, Yrd. Doç. Dr. Ali Kudret Adiloğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Emel Sesli Çetin ve Yrd. Doç. Dr. Gülgün Tınaz Hocalarıma her türlü katkı ve desteklerinden dolayı sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Asistanlığım boyunca laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma, bana hoşgörüsüyle rahat ve huzurlu bir çalışma ortamı hazırlayan eşime ve oğlum Fethi ve kızım Elif'e teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

AHL	: N-acyl-L-homoserin lakton
QS	: Quorum Sensing
3OC ₁₂ -HSL	: N-(3-oxododecanoyl) homoserin lactone
C4-HSL	: N-butyryl homoserine lactone
CF	: Kistik fibrozis
TSİ	: Üç şekerli demirli agar (tri sugar iron agar)
OF	: Oksidasyon fermantasyon
LPS	: Lipopolisakkarit
asialo GM I	: Sialik asitsiz gangliosid reseptör
PMNL	: Polimorf nükleer lökositler
EF2	: Elongasyon faktör 2
PCN	: Piyosiyanin
AI-2	: Autoinducer-2
BHL	: N-butanoyl-L-homoserine lactone
HHL	: N-hexanoyl-L-homoserine lactone
PAS	: <i>Pseudomonas</i> quinolon sinyal molekülü
PAI-1	: <i>Pseudomonas</i> autoinducer-1
PAI-2	: <i>Pseudomonas</i> autoinducer-2
PGE2	: Prostaglandin E2
CFTR	: CF transmembrane conductance regulator
HTGS	: Human submucosal tracheal gland serous cells
mPGES	: Microsomal prostaglandin E synthase
TSST-1	: Toksik şok sendromu toksini-1

1. GİRİŞ

P. aeruginosa, gram negatif fırsatçı bir patojen olup bitki, hayvan ve insanlarda ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu organizma nazokomial enfeksiyonların major bir nedenidir ve başta kistik fibrozis olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonlarından sorumludur (1).

P. aeruginosa'nın patojenitesi hücre ile ilişkili alginat, pili ve lipopolisakkarit, proteazlar (elastaz, alkalen proteaz ve LasA proteaz), hemolizinler (rhamnolipid ve fosfolipazlar), toksinler (ekzoenzim S ve ekzotoksin A) ve pyosiyanin gibi hücre dışı virülans faktörlere bağlı olup multifaktöriyeldir. Bu virülans faktörlerin çoğunun ekspresyonu iki N-acyl-L-homoserin lakton (AHL) bağımlı hücreler arası haberleşme sistemi tarafından gerçekleştirilir (2,3). QS hücre yoğunluğuna bağımlı bir mekanizma olup, bakteride bioluminisens, plazmid konjugasyonu ve değişik virülans faktörlerinin üretimini içine alan bir dizi çeşitli aktiviteleri düzenler (5).

Hücreler arası haberleşme autoinducer olarak adlandırılan küçük N-acyl homoserin lakton molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* iyi tanımlanmış QS sistemiyle ilişkili las ve rhl sistemi gibi en az iki sisteme sahiptir. Bu sistemler elastazlar (LasB ve LasA), alkalen proteaz, hidrojen siyanid, ekzotoksin A, pyosiyanin, lektinler, rhamnolipid ve süperoksit dismutaz gibi çeşitli virülans faktörlerin üretimini kontrol ederler (5-7).

Her QS sistemi "autoinducer" adı verilen sinyal moleküllerini sentezleyen (LasI ve RhlI) ve bunlarla aynı kökenden gelen transkripsiyonel regülatör olarak bilinen (LasI ve RhlI) iki bileşenden oluşmaktadır. LasI, autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserin lactone (3OC₁₂-HSL) molekülünü sentezlerken, RhlI, 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 (5,6).

Pek çok çalışmada *P. aeruginosa* patojenitesinde QS sisteminin katkısı tanımlanmıştır. Klinik çalışmalarla gösterilmiştir ki QS sistemi özellikle *P.*

aeruginosa ile oluşan akciğer kistik fibrozisin'de enfekte dokularda tamamen fonksiyoneldir (8-12).

P. aeruginosa ile enfekte KF'li hastaların balgam örneklerinde yapılan analizlerde hem lasI hem de lasR transkriptlerinin varlığı gösterilmiştir.

Bu transkriptlerin birikimi, QS tarafından kontrol edilen *lasB*, *lasA* ve *toxA* genlerinin transkriptlerinin birikimleri ile koreledir (8, 11).

İlave çalışmalarla KF'li hastaların balgamlarında autoinducer moleküllerinden biri veya her ikisinin varlığı doğrulanmıştır (8, 13, 14).

P. aeruginosa'nın virülansında QS'nin önemi termal yanıklı farelerin *P. aeruginosa* enfeksiyonunun farklı hayvan modellerinde ve akut ve kronik akciğer enfeksiyonu modellerinde gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ana suşların virulansı ile QS genlerinde delesyon bulunan *P. aeruginosa* mutantlarının virulanslarıyla karşılaştırılmıştır (15-18).

P. aeruginosa ile akut pulmoner enfeksiyonu oluşturulan fare modelleri kullanarak QS genlerindeki delesyonların enfeksiyonun mortalite oranında olduğu kadar *P. aeruginosa*'nın neden olduğu akciğer hasarını da azalttığını gösterilmiştir (15).

Çeşitli virulans faktörlerinin kontrolü QS sistemi ile gerçekteşitinden, bu sistemlerden biri veya her ikisinin kaybı durumunda *P. aeruginosa*'nın insanlarda enfeksiyon oluşturma kabiliyetinde önemli ölçüde azalma mümkün olmaktadır.

Bu çalışma ile insanlarda enfeksiyona neden olan QS-yetersiz suşlar, bu suşların var olup olmadığı ve spesifik enfeksiyon tipleri ile virülans faktörleri arasındaki ilişkileri tanımlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pseudomonas cinsinde, *Pseudomonadaceae* ailesi içinde, suda ve toprakta yaşayan, gram negatif, nonfermentatif, aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türler yer almaktadır. Bunların arasında bir kısmı bitkiler, bir kısmı da hayvanlar ve insanlar için patojen olan türler bulunmaktadır. *Pseudomonasların* çoğu insanları infekte etmekle beraber, bazıları özellikle savunma sistemleri bozulmuş ve baskılanmış bireyler için önemli bir fırsatçı patojendir. Konağın savunma sisteminin kırılmış olması ve bakterilerin sık kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli oluşları nedeniyle *pseudomonas* infeksiyonları genellikle ağır seyirlidir ve tedavileri de güçtür (19).

Eskiden beri insanlar ve hayvanlar için patojen özellikte oldukları bilinen *P. aeruginosa*, *Pseudomonas mallei* ve *Pseudomonas pseudomallei* gibi bakteriler dışında günümüzde *Pseudomonadaceae* ailesine ait başka türlerin de klinik materyallerden izole edildikleri görülmüştür. Dolayısıyla bu gruptaki bakterilerin tıptaki önemleri giderek artmaktadır. Bu cinste bulunan bakteriler rRNA homolojilerine göre, beş gruba ayrılmaktaydı. Son yıllarda yapılan ayrıntılı çalışmalara göre *Pseudomonas* cinsinin yeniden sınıflandırılması önerilmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* Homoloji grup I'de yer alırken, bu gruptaki diğer türlerden oldukça farklı olan homoloji grup II'deki mikroorganizmaların, *Burkholderia* cinsine aktarılması uygun bulunmuştur. Böylece daha önceleri *Pseudomonas* cinsinde bulunan yedi tür, *Burkholderia* cinsinde (*B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. pickettii*, *B. gladioli*, *B. caryophyllii* ve *B. solanacearum*) incelenmektedir. Bu türlerden ilk beşi insanlardan izole edilmiştir. Homoloji grup III'de bulunan mikroorganizmalar ise, yeni bir aile olan *Comamonadaceae* içinde *Comamonas* ve *Acidovonax* cinslerine kaydırılmıştır. Homoloji grup IV'de bulunan *Pseudomonas diminuta* ve *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas* cinsi içinde kalmışlardır. Homoloji grup V'deki mikroorganizmalar *Xantomonas* cinsinde sınıflandırılması genel kabul görmekle birlikte *Xantomonas maltophilia*, yeni bir cins olan *Stenotrophomonas* cinsine aktarılmıştır. *Pseudomonas putrefaciens*, *Shewanella putrefaciens*; *Pseudomonas paucimobilis*, *Sphingomonas paucimobilis* olarak yeniden sınıflandırılmıştır.

Pseudomonas cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Birçok hastanede *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'den sonra en sık hastane infeksiyonuna yol açan patojendir (20, 21).

Tablo 1 : *Pseudomonas* ve yakın bakterilerin rRNA homoloji grupları.

rRNA Homoloji grup ve alt grupları	Cins ve türler
I. Flouresan grup	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>
Non-Flouresan grup	<i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i>
II.	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>B. mallei</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. pickettii</i>
III.*	<i>Comamonas acidovorans</i> <i>C. testosteroni</i>
IV.*	<i>P. diminuta</i> <i>P. vesicularis</i>
V.	<i>Xantomonas maltophilia</i>

* İnsanlardan çok nadir izole edilen gruplar (20).

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın mikrobiyolojik özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, gram negatif, aerob, basil ya da kokobasildir. Genellikle 0.5-0.8 µm eninde, 1.5- 3.0 µm boyundadır. Bir uçta bir kirpikle veya birden fazla kirpikle hareketlidir. İlk olarak 1882'de Gessard tarafından mavi iltihap etkeni olarak gösterilmiştir. Zorunlu aerobdur. Organik üreme faktörlerine ihtiyacı yoktur. *Pseudomonas* 'lar bir uçta tek kirpik (flagella) veya daha az oranda bir uçta, birden fazla kirpikle, hareketlidir. *P. aeruginosa* 'da bir uçta tek kirpik bulunur. *Burkholderia mallei* ise kirpiksiz ve hareketsizdir.

En iyi üreme ısıları 37°C dir. *P. aeruginosa* ve diğer bazı türler 42 °C'de de üreyebilirler, ancak 4°C'de üremezler. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok kullanılan besi yerlerinde rahatlıkla ürediklerinden, izolasyonları oldukça kolaydır. MacConkey Agar'da mavi-yeşil röfle vererek ürerler. Bu görünüm pyosiyanın pigmentinden kaynaklanmaktadır. Adi agarda ve buyyonda mavi-yeşil renk oluşur (22).

İzolasyon için besiyerleri 24-48 saat inkübe edilmelidir. Enzim aktivitelerini araştırmak için kullanılan besi yerleri, 30°C'de inkübe edilmelidir. Ancak yapılan bir kısım çalışmalarda enzim aktiviteleri ölçümü yapılırken 37°C'de inkübasyon yapıldığı da bilinmektedir. Ayrıca kirpik proteinleri en iyi düşük ısılarda sentez edildiğinden, hareket besiyerlerinin oda ısısında (20-25 °C) inkübe edilmesi gerekmektedir (20, 21, 22).

2.2. Biyokimyasal özellikleri

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken, maltozu etkilemez. İndofenol oksidaz, sitrat ve L-arginin dihidrolazı pozitifdir. Nitrattan gaz yapar. L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilazı negatifdir. Üç şekerli demirli agar'da (TSİ: tri sugar iron agar) hidrojen sülfür (H₂S) yapmaz. Piyoverdin (yeşil-sarı) ve pyosiyanın (mavi) adı verilen floüresan pigmentler yapar. Klinik izolatların yarısından fazlası pyosiyanın yapmaktadır. Bu pigment nötral ve alkali pH'da mavi veya yeşilimsi-mavi olarak görülür. *Aeruginosa* adı bu pigmentten dolayı verilmiştir. Bu pigmentler uzun dalga boylu UV ışığında (Wood lambası ile) floüresan da

verirler. Bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) veya piyomelanin (kahverengi-siyah) pigmentleri yaparlar (20, 23).

Sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon yoluyla solunum yapan bakterilerin kullandığı enzim olup, oksidaz testi bu enzimin aktivitesini ölçmeye yöneliktir. Oksidaz ayırıcı (dimetil veya tetrametil fenilendiamin hidroklorid) kurutma kağıdına damlatılır veya ayırıcının emdirildiği çubuklar kullanılabilir. Koloni ile muamele sonucu oksidaz pozitif bakteriler fenilendiamin bileşiklerini okside ederek mor renkli indofenole dönüştürürler.

Non fermentatif bakterilerin bir kısmı glikozu okside ederek parçalarlar. Böylece TSİ besiyerinin yatık kısmını asitleştirirler. Bir kısmı ise non oksidatifirler. Bunlar peptondan oluşturdukları alkali ürünlerle asidi nötralize ederek pH değişikliğini maskelerler. Bunun için bakteri iki tüpe ekilir. Tüplerden biri mineral yağ ile kaplanarak hava ile teması kesilir. Yani anaerobik koşullarda fermentatif etki incelenir. Diğerine bir şey konmaz yani aerobik koşullarda oksidatif etki araştırılır. Şekerleri fermentatif yolla parçalayan bakteriler her iki tüpte de asit oluşturarak fenol kırmızısı ayırıcı sarıya çevirirken, oksidasyon ile şekeri parçalayan bakteriler sadece aerobik tüpte sarı renk oluştururlar. (21, 23).

Flo agarda piyoverdin (fluorescein) pigmenti (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida*) oluştuğunda tüpün tamamında sarı renk görülür, Tech agarda ise pyosiyanin (sadece *P. aeruginosa*'da görülür) turkuaz mavisi şeklinde gözlenir. Wood lambası altında UV ışığında incelendiğinde ise sadece flouresan veren flo agardaki piyoverdin pigmenti gözlenir (21).

2.3. Antijenik yapısı

Epidemiyolojik amaçlar için *P. aeruginosa*'nın çeşitli suşlarını gruplara ayırmada hapten yapısına benzeyen lipopolisakkarit (LPS) yapısında, somatik (O) antijenleri kullanılır. Uzun süre kaynatma ve otoklavlama ile ölü bakteri süspansiyonlarının antijen olarak şırıngası ile hazırlanan özgün tavşan antiserumları kullanılarak, lam aglutinasyonu ile tiplendirmeler yapılır (24,25).

Ayrıca H antijenlerinden başka termolabil antijenler ve pilus antijenleri de vardır. Bakteriler çok sayıda plazmid taşırlar. Plazmidler bir yandan metabolizma ile ilgili olaylarda rol oynarlar, öte yandan da çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmada

etkileri vardır. *Pseudomonas* türleri genellikle çoklu dirençlidir. Bu durum büyük ihtimalle enterik bakterilerden ve diğer *pseudomonas* suşlarından kazanılan direnç plazmidlerinden kaynaklanmaktadır. *Pseudomonas* suşlarında konjugasyon (iki bakteri hücrelerinin teması sonucunda genetik eleman aktarımı), transdüksiyon (direnç genlerinin bakteriofaj aracılıklı transferi) ve transformasyon (ortamdaki serbest bulunan DNA'nın bakteri hücresine alınması) ile gen transferi olmaktadır. Ayrıca faj tiplendirmesi ve piyosin (bakteriyosin) tiplendirmesi de yapılmaktadır. *Pseudomonas* suşlarında lizojeni çok yaygındır. Bazı fajlar bakteriyi enfekte ettikten sonra çoğalmaz ve bakteriyi eritmez. Bakteri kromozomuna entegre olarak bakteri DNA'sı ile birlikte çoğalır ve yavru bakterilere geçer. Bu tip fajlara **ılımlı faj**, kromozoma entegre olan faj nükleik asidine **profaj**, bu olaya ise **lizojeni** ve DNA'sında profaj taşıyan bakteriye de **lizojenik bakteri** adı verilir. Lizojeni sırasında az sayıda viral gen eksprese edilir ve bu genler bakteriye yeni özellikler kazandırabilir. Bazı bakteriler bu şekilde patojenite ve virulans kazanır. Örneğin difteri hastalığına yol açan *Corynebacterium diphtheriae* lizojenik bir bakteridir ve salgıladığı ekzotoksin ile hastalığa yol açar. Bu bakteri profajdan kurtulursa hastalık yapma yeteneğini kaybeder. Bir diğer örnek, normal şartlarda akut farenjit oluşturan A grubu streptokoklar lizojenik özellik kazanırlarsa yine bir toksin oluşturarak kızıl hastalığına yol açarlar.

Çoğu suşlar en az bir profaj için lizojendir. *Pseudomonas* grubu bakteriler diğer enterobakterilerden farklı olarak, bakteriyosin yapımını sağlayan genleri plazmidler yerine, kromozomda bulundururlar. *Pseudomonas* grubu bakterilerin oluşturduğu bakteriyosinlere piyosin ve aeuginosin de denir. *P. aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosin tipi belirlenmiştir. İki yaygın serotiplendirme şemasından biri Fisher-Devlin-Gnabasik sistemidir ve 7 tipi vardır. Diğer uluslararası antijen tiplendirme sistemi (IATS)'dir ve toplam 17 farklı tip gösterir.

P. aeruginosa infeksiyonlarını önlemek için sıklıkla izole edilen O tiplerinden, çeşitli aşılarda geliştirme çalışmaları devam etmektedir (20, 25, 26).

2.4. Virulans faktörleri

P. aeruginosa fırsatçı sağlıklı kişilerde hastalık oluşturmazken konak savunmasının bozulduğu durumlarda çeşitli virülans faktörlerinin etkisiyle ciddi

enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu virülans faktörleri nedeniyle *P. aeruginosa*'nın patogenezi multifaktöriyeldir (20,27,28).

P. aeruginosa invaziv ve toksijenik olarak infeksiyonlara yol açar. İnfeksiyonlar

- 1) Bakteriyel yapışma ve kolonizasyon
- 2) Lokal invazyon
- 3) Yayılma ve sistemik hastalık olmak üzere üç aşamalı olarak seyreder.

Her aşama bir öncekinin devamı niteliğinde olup hastalık aşamaların birinde kesintiye uğrayabilir. Mikroorganizmaya ait virülans faktörleri belli basamaklarda rol alır ve kendine özgü bulguların ortaya çıkmasına neden olur (20,28).

Patojenite, mikroorganizmanın konakta çoğalarak hastalık oluşturması olarak tanımlanır. Bu durumdan sorumlu yapılar ise virülans faktörleri olarak adlandırılır. Hastalık oluşturmada ve virülansda çeşitli yapılar ve hücre dışı enzimleri rol oynamaktadır (29, 30, 31).

2.4.1. Adhezinler

P. aeruginosa'nın piluslar ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları (nonpilus adhezinler) olmak üzere iki protein adhezini vardır. Bu yapılar epitellere tutunmadan sorumludur. Bu yapılara karşı gelişen antikorlar da epitele tutunmayı engeller. *P. aeruginosa*'nın tip 4 pilusları, *Neisseria gonorrhoeae*'nin piluslarına ve ayrıca *Vibrio cholerae* *Tcp* piluslarına benzer (29).

P. aeruginosa, pilusları ile, öncelikle sialik asitsiz gangliosid reseptörlere (asialo GM I) tutunur. *P. aeruginosa* suşları nöraminidaz da üretir ve oluşan nöraminidaz, gangliosidlerdeki sialik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşturulmuş olur. *P. aeruginosa* pilusları epitel hücrelere tutunmayı sağlar, musine tutunmaz. Pilus aracılığıyla tutunma üst solunum yollarının kolonizasyonunda önemli rol oynarken, alginat ile tutunma mukosilyer atılımda hasar görülen durumlarda alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk adımı oluşturmaktadır. Non pilus adhezinlerin bir bölümü, hem epitele hem de musine tutunmayı, diğerleri ise yalnızca musine tutunmayı sağlar (27, 28, 29).

2.4.2. Polisakkarit Kapsül

P. aeruginosa suşları, bazı koşullarda, polisakkarid kapsül yapar. Hücre dışında bulunan bu yapıya slaym (slime) tabakası denildiği gibi glikokaliks veya mukoid ekzopolisakkarid olarak da tanımlanır. Bu yapı alginatla sonlanan tekrar eden yapılar şeklinde β -1,4 bağları ile birbirine bağlı D-mannuronik asit ve onun C-5 epimeri olan L-glukuronik asitten oluşmaktadır (32). Bu karbonhidrat bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir, onu iyice tesbit eder ve konak savunmasından (mukosiliyer aktivite, fagositik hücreler, antikorlar ve kompleman gibi) bakteriyi korur. *P. aeruginosa*'nın mukoid suşları, sıklıkla, kistik fibrosisli hastaların balgamlarından izole edilir. Alginat sentezlenmesiyle bakteriler birbirlerine yapışmakta ve çevrelerini saran matriks aracılığıyla konak savunmasından korunmaktadır. Ayrıca alginatın *P. aeruginosa*'ya karşı kullanılan aminoglikozitlerin, bakterisit etkisini inhibe ettiği düşünülmektedir (20, 28, 29).

2.4.3. Elastaz ve Alkalen Proteaz

Klinik örneklerden izole edilen çoğu *P. aeruginosa* izolatu, birkaç hücre dışı proteaz yapar. Bunlardan en iyi araştırılan ikisi elastaz ve alkali proteazdır. Elastaz, LasA (serine proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) olarak iki formda bulunan ve *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastini sinerjistik olarak parçalayabilen enzimdir. Virulansla 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. Kronik *Pseudomonas* enfeksiyonları LasA ve LasB antikorları ile birlikte, enfekte dokularda immün kompleks birikimi ile karakterizedir. Elastaz benzeri bir protein olan alkalen proteaz ise doku hasarına ve *P. aeruginosa* enfeksiyonunun yayılmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda konağın immün cevabına engel olmaktadır. Her iki enzim (elastaz ve alkalen proteaz) de deride, akciğerde ve korneada nekrozlar yapar (20, 33).

2.4.4. Sitotoksin (Lökositidin)

Sitotoksin 25.000 mol ağırlığında toksik bir proteindir. Çoğu ökaryotik hücreye sitotoksik etki yapar. Lökositlere sitopatik etkisi nedeniyle, lökositidin olarak adlandırılır. Hücre membranlarına etki eder; polimorf nükleer lökositlerin fonksiyonunu (PMNL) bozar; deney hayvanlarında, akciğerlerde ve damarlarda hasara neden olmaktadır (20, 33).

2.4.5. Fosfolipaz C ve Rhamnolipid

P. aeruginosa iki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir (rhamnolipid). Rhamnolipid aynı zamanda solunum yollarında silier aktivitenin inhibisyonundan sorumludur. Fosfolipaz C'nin solunum sistemi ve idrar yolu enfeksiyonlarındaki esas rolü açık değildir. Ancak bu hemolizinin üretimi ile hastalık arasında önemli bir ilişki vardır. Bu iki madde, sinerjik hareket ederek lipidleri ve lesitini hasara uğratar. Proteazlar gibi hemolizinler de nekroz yaparak, infeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardım eder (20, 33).

2.4.6. Endotoksin

Lipopolisakkarit yapısındaki endotoksin diğerk gram-negatif bakterilerde olduğu gibi *P. aeruginosa*'nın önemli bir hücre duvar antijenidir. *Pseudomonas* endotoksini lipit A, diğerk bakteriyel lipopolisakkaritler gibi organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ayrıca sepsis sendromunun değişik etkilerine aracılık etmektedir. *Pseudomonas* lipopolisakkaritleri biyolojik olarak diğerk gram negatif bakterilerinkinden daha zayıf gibi görünmektedir (20, 33).

2.4.7. Ekzotoksin A

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 adozin 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. Safılaştırılmış ekzotoksin A, hayvanlar için oldukça letaldir. Bu toksin aynı zamanda immünosupresif etkiye sahiptir. Köpek ve rhesus maymunlarında şok yapar. Toksin yapan suşlar, bakteriyemik insan hastalığında, daha virulandır (20, 33).

2.4.8. Ekzoenzim S ve T

Bir başka hücre dışı enzim Ekzoenzim S ve T'dir. Bu proteinler de, bir adenoindifosfat ribozil transferazdır. Hedef proteini henüz tanımlanmamıştır. Saf ekzoenzim S, fareler için toksiktir. Doku kültürlerindeki hücelere sitopatik etki gösterir. Ekzoenzim S salgılayamayan mutant suşlar, deneysel yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlarında daha az virulandır. Bu proteinler bakteriyel yayılma, doku invazyonu ve nekrozdan sorumludurlar (20, 21, 26).

2.4.9. Pyosiyenin

Sadece *P. aeruginosa* tarafından üretilir. Bu pigment oksijenin toksik şekilleri olan süroksit ve hidrojen peroksit üretimini katalizler. Bir demir bağlayıcı siderofor olan piyoselin (pyochelin) varlığında doku hasarına yol açabilen daha toksik hidroksil radikaller üretir. Pyosiyenin aynı zamanda inflamatuvar cevabı uyarır (33).

Pyosiyenin (PCN), *P. aeruginosa* tarafından sentezlenen karakteristik mavi renkte, kloroformda çözünebilen bir bileşiktir (1-hidroksi-5-metil fenazin). PCN, memeli hücrelerinde solunumu inhibe eder (34). İnsan silier hareketini bozar (35). Epitelial hücre büyümesini ve lenfosit proliferasyonunu engeller (36). PCN, in vitro silier hareketi inhibe eden konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* ile enfekte olan kistik fibrozisli hastaların pulmoner sekresyonlarında tespit edilmiştir (35).

PCN aynı zamanda pek çok mikroorganizmaya karşı antibiyotik aktivite göstermektedir (37). Bu özellik *P. aeruginosa*'nın mikroorganizmalara karşı savaşında rol oynayabilir.

Hassan ve Fridovich PCN toksisitesi için bir mekanizma tanımlamışlardır. PCN'nin biyolojik yollardaki elektron akışını, İntraselüler O₂ redüksiyon

oluşumunu arttırarak başka yöne kaydırır. Bu da hücre ölümüne yol açar. *P. aeruginosa*'nın çok kuvvetli bir aerob oluşu, PCN'ye karşı duyarsız olması ve bu bileşiğin üretim sürecinde serbest radikal hasarından kaçış kabiliyeti ilgi çeken bir konudur (38).

2.5. Patogenez

P. aeruginosa sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa neden olan, sık rastlanılan bir insan saprofitidir. Birçok olguda hastalık normal konak savunmasının değişmesiyle başlar. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulmasında, damar içi veya üriner katater varlığında, endotrakeal tüp kullanıldığında hastalık gelişebilir. Ayrıca nütropeni, hipogamaglobülinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar *Pseudomonas* infeksiyonlarına zemin hazırlar.

P. aeruginosa'nın farklı fizik koşullara uyum sağlayabilmesi, beslenme gereksinimlerinin azlığı ve antibiyotiklere kolay direnç kazanabilmesi patojenliğine katkıda bulunur. *Pseudomonas* infeksiyonlarının patogenezi çok faktörlü ve karmaşıktır. Organizmanın virulans faktörleri patogenezin herbir basamağını düzenler ve karakteristik sendromlardan sorumludur (20, 39).

2.6. Plasmidleri, fajları, bakteriyosinleri

Pseudomonas 'larda çok sayıda plasmidler bulunmaktadır. Bunlar bir yandan metabolizma ile ilgili olaylarda rol alırlar, diğer yandan da çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmalarında rol oynarlar. *Pseudomonas*'lar çoklu dirençlidirler. Çoklu direnç büyük olasılıkla enterik bakterilerden ve diğer *Pseudomonas* suşlarından kazanılan direnç plasmidleri ile oluşmaktadır. *Pseudomonas* suşlarında konjugasyon, transduksiyon ve transformasyonla gen transferi olmaktadır.

Ayrıca faj tiplendirmesi ve piyosin (bakteriyosin) tiplendirmesi de yapılmaktadır. *Pseudomonas* suşlarında lizojeni çok yaygındır. Çoğu suşlar en az bir profaj için lizojendir. Faj tiplendirmeleri için değişik sayıdaki faj setleri kullanılmaktadır. *Pseudomonas*'larla enterobakterilerin gen haritaları arasında çeşitli farklar vardır. Bunlardan biri, bakteriyosin yapımını sağlayan genler enterobakterilerde plasmidlerde yer alırken, *Pseudomonas*'larda kromozoma yerleşmiş olmasıdır. *Pseudomonas*'ların çeşitli suşlarınca oluşturulan

bakteriyosinlere piyosin ve aeruginosin de denir. Bakteriyosin tiplendirmesinde çeşitli örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının oluşturdukları piyosinin, değişik indikatör suşlara etkisi incelenir. *P. aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosin tipi belirlenmiştir (20, 40).

2.7. Dirençlilik

P. aeruginosa'nın pek çok antibiyotige karşı doğal direnci vardır. Çok sayıda direnç mekanizması bildirilmesine rağmen, porin proteinlerindeki mutasyon direnç mekanizmasında en büyük rolü oynar. Antibiyotikler dış membrandaki porlar aracılığıyla pseudomonad hücrelerine penetre olurlar. Bu proteinler porların etrafında yerleşerek kanallara doğru akışı sınırlı hale getirir ve böylece değişik antibiyotik sınıflarına direnç geliştirebilir. *P. aeruginosa*, vejetatif bakteriler içinde, çevre koşullarına kendini en iyi uydurabilenlerdendir. Yeterli nem sağlandığında, çok az besin maddesiyle, uzun süre canlı kalabilir. Hastane ortamında solunum cihazları, duşlar, banyolar, fosekler, soğuk su nemlendiricileri, yataklar, çarşafklar, gazlı bezler, tamponlar, yerler gibi çok sayıda alandan izole edilebilir.

Dezenfektan olarak kullanılan kimyasal maddelere çok dirençlidir, dördütlü amonyum bileşikleri, heksaklorofenli sabunlar ve iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebilir. *Pseudomonas*'ların dezenfeksiyonunda fenoller ve betaglutaraldehit etkili olabilir. Kaynar su mikroorganizmayı öldürür. *P. aeruginosa* ayrıca farklı bir β -laktamaz ürettiğinden sıklıkla kullanılan β laktam antibiyotiklerin çoğunu, özellikle penisilinleri, birinci kuşak sefalosporinleri ve karbapenemleri inaktive eder (23, 26, 33).

2.8. Laboratuvar tanısı

İnfeksiyon tipine göre klinik örnekler (deri lezyonlarından sürüntü ve pü, idrar, kan, BOS, balgam gibi) alınmalıdır. Gram boyalı preparatlarda, gram negatif basiller görülür. Bunların *Pseudomonas*'a özgü görünümü yoktur. Diğer enterik bakterilerden farksızdır.

Alınan örneklerin kültürü kanlı agara, MacConkey agara yapılmalıdır. Kanlı agarda beta hemolitik koloniler ve MacConkey agarda laktöz negatif kolonilerin

gelişmesi, ekşi meyve kokusu duyulması ve üreme ortamını boyayan mavi-yeşil pigmentin olması *Pseudomonas*'ı düşündürülen tipik özelliklerdir. Ayrıca oksidaz, katalaz, OF besiyerindeki durumu ve diğer biyokimyasal özellikleri belirlenmelidir. Üretilen süşun antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır. *Pseudomonas*'ların ve diğer non fermenterlerin özelliklerini araştırmak için çeşitli ticari kitler ve otomatize sistemler de kullanılabilir. Bir *Pseudomonas* salgınında değişik hastalardan ve hastane ortamından üretilen *Pseudomonas* süşularının, birbiriyle karşılaştırılması için antibiyotik duyarlılık modelleri incelenmeli; imkan varsa serotiplendirme, faj ve piyosin tiplendirmeleri yapılmalı ve plasmidleri incelenmelidir. Bu karşılaştırmalar sonunda hastane infeksiyonunun kaynağı bulunabilir ve gerçek bir salgının varlığı anlaşılabilir (20, 23).

3. BAKTERİYEL İLETİŞİM: "QUORUM-SENSING"

Önceleri bakterilerin son derece primitif oldukları ve bireysel hareket ettikleri düşünölmekteydi. Ancak deneysel modeller kullanılarak farklı inokulüm miktarlarında oluşturulan enfeksiyonlarda, konak savunmasını alt edebilmek için belirli yoğunlukta mikroorganizma topluluğunun olması gerektiği saptandı. Aslında bu bulgu "quorum-sensing" fenomeni konusunda bir ipucu niteliği taşımekteydi (41).

Bakterilerin yeni bir çevreye adaptasyonu ve bu çevreyi tanıma ve algılama cevabı patogeneizde önemlidir. Bakteri pek çok mekanizma ile pH, ozmolarite, besin kaynağı ve popölasyon yoğunluğu gibi çevresel şartları algılar. Bakteri çevrede değişen bir koşul algıladığında, kendi metabolizmasında bir takım değişiklikler yaparak yeni şartlara kendini adapte etmeye çalışır. "Quorum-sensing" (QS) sistemi bakterinin çevresindeki popölasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir ve bakteri bu bilgiyi pek çok geninin regölasyonunu kontrol etmekte kullanır (41, 42).

"Quorum" kelimesi latince kökenli bir kelime olup, "minimum popölasyon birimi" anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, "quorum-sensing" (QS) kavramı "minimum popölasyon birimini algılama" olarak ifade edilebilir. Bu kavram ilk defa 1994 yılında Fuqua ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar,

iki deniz bakterisi olan *Vibrio harveri* ve *Vibrio fisheri*'nin bir tür balığın ışık organı adı verilen organında yüksek yoğunlukta oldukları zaman bioluminesans verdiklerini saptamışlardır. Bu bakteriler deniz suyunda mililitrede yaklaşık 10^2 adet bulunurken, bioluminesans verdikleri ışık organında mililitrede 10^{10} ila 10^{11} miktarında bulunmaktadır. Dolayısıyla bakterilerin oluşturduğu ışık, sadece yüksek yoğunlukta olduklarında saptanabilmektedir. Araştırmacıların gözlemlerine göre, bakteriler ortamdaki yoğunluklarını bir molekülün ortamdaki yüksek konsantrasyonu ile algılamaktaydılar ve bu molekülün yüksek miktarda olması bakteri yoğunluğu ile paralellik göstermekteydi (41, 43).

Bu gözlemden sonra QS konusundaki araştırmalar insan patojenleri ile devam etmiş ve özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılan pek çok çalışma ile bu iki bakterideki QS sistemleri çözümlenmeye çalışılmıştır (44).

QS sisteminde ortak mekanizma, ortama salınan sinyal molekülleri ile regülasyonun sağlanmasıdır. Bakteriler, küçük hücre dışı sinyal molekülleri üretirler. Bu moleküller dış ortama bakteri tarafından salınır. Aynı zamanda bakteri yüzeyinde bulunan bazı reseptörler sinyal molekülünün konsantrasyonunu algılar. Eğer bu konsantrasyon belirli bir seviyede ise bakteride bazı genlerin ekspresyonu indüklenir. Bu indüksiyon sonucunda bazı hücre dışı ürünler üretilir (41, 45).

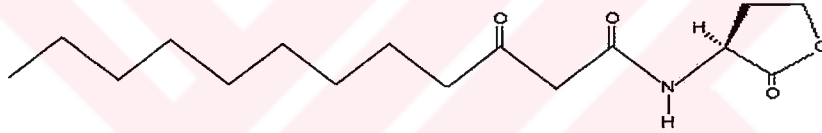
QS sisteminin bakteriye getirdiği pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün cevaptan kaçabilir (46).

3.1. QS Sisteminde Yer Alan Sinyal Molekülleri

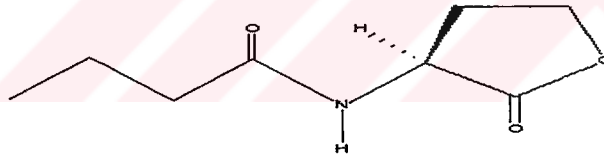
QS sistemi içinde sinyal molekülleri en önemli rolü oynarlar. Bu sinyal moleküllerine aynı zamanda "autoinducer" adı da verilmektedir. Bunun nedeni, bu moleküllerin metabolizmasını regüle ettikleri hücrede oluşmasından kaynaklanmaktadır. Bugünkü bilgilerimiz ışığında, bakteriler tarafından üretilen üç QS sinyal molekül ailesi tanımlanmıştır. Gram negatif bakteriler tipik olarak

acyl homoserin lakton (AHL: acylated homoserine lactone) üretirler. Gram pozitif bakteriler ise küçük peptidleri sinyal molekülü olarak kullanırlar. Bir sinyal molekülü olan "autoinducer-2" (AI-2) ise hem gram negatif, hem de gram pozitif bakterilerde saptanmıştır. Dolayısıyla bu sinyal molekülü evrensel olup, bakterinin diğer bakteri topluluklarını algılamasını sağlamaktadır (47).

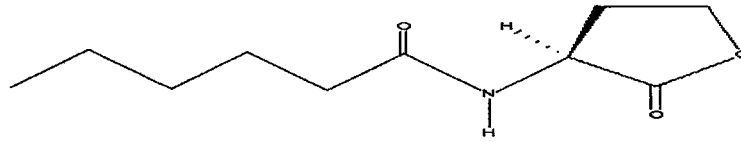
Gram negatif bakterilerde pek çok sinyal molekül ailesi tanımlanmış olmakla birlikte, üzerinde en fazla durulan N-acyl homoserin lakton ailesine ait olanlardır. Özellikle fırsatçı insan patojenleri olan *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Serratia marcescens* gibi bakterilerin AHL ürettikleri saptanmıştır. Lakton siklik bir moleküldür. Aynı molekül içinde karboksil grubun hidroksil grup ile ester oluşturması sonucu oluşur. Bu siklik yapıya bir amid bağı ile acyl yan zinciri eklenir. Yan zincirin ucu değişken uzunlukta olup, şimdiye kadar 4-14 karbon uzunluğunda AHL'lar tanımlanmıştır (49, 50).



N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL): (3O-C₁₂-HSL)



N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL)



N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL)

Şekil 1: Sinyal moleküllerinin moleküler yapısı.

AHL pek çok gram negatif bakteride bulunmasına rağmen, AHL dışında farklı sinyal moleküller üreten gram negatif bakteriler de vardır. Örneğin, *P. aeruginosa*'da AHL moleküllerine ek olarak "*Pseudomonas* quinolon sinyal molekülü" (PQS) bulunur. Bu molekül yapısal olarak kinolon grubu

antibiyotiklere benzemekte ve *P. aeruginosa*'da AHL'a bağı QS sistemini modüle etmektedir (51).

Buna ek olarak pek çok gram negatif bakteride siklik dipeptidler sinyal molekülü olarak kullanılır. Bu dipeptidlerin fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber AHL'lerin antagonisti oldukları düşünülmektedir. AHL üretimi pek çok gram negatif bakteride bulunmakla beraber, zorunlu insan patojenleri olan *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Salmonella* gibi bakterilerde AHL oluşumu gözlenmiştir (52, 53). Şimdiye kadar gram pozitif bakteriler içinde AHL oluşumuna rastlanmamış, bunların sinyal molekülü olarak küçük peptidleri kullandıkları belirlenmiştir (54, 55).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*'da Bulunan QS Sistemi ve Virülanstaki Rolü

QS ilk olarak bir deniz mikroorganizması olan *Vibrio fisheri*'de keşfedilmesine rağmen bu alanda yoğunlaşan çalışmalar fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa* ile yapılmaktadır. Bu fırsatçı patojen immünkompromize hastalarda kanda, deride, gözde, gastrointestinal ve genitouriner sistemde enfeksiyon oluşturmaktadır. Kistik fibrozisli hastalarda ise konağın akciğer dokularında kolonize olarak kronik pulmoner hasara yol açmaktadır. *P. aeruginosa*'nın virülansında rolü olan determinantların bir çoğunun üretimi QS sisteminin kontrolü altında gerçekleşir (5, 41).

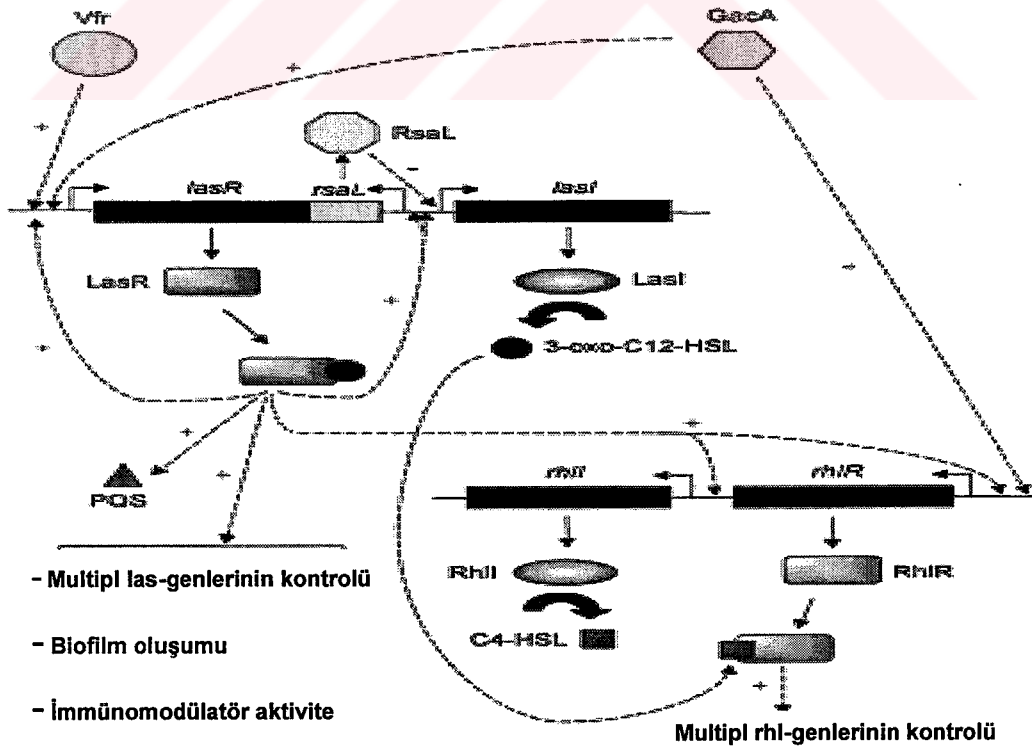
P. aeruginosa'da AHL ailesi üyelerinin yer aldığı iki QS sistemi (Las ve Rhl sistemi) ve bu sistemlerde yer alan iki büyük protein ailesi bulunur. Las ve Rhl sistemlerinde bulunan I proteinleri AHL sentaz görevini üstlenir. Diğer bir deyişle, bu proteinler sinyal molekülü sentezinden sorumludur. Ayrıca Las ve Rhl sistemlerinde bulunan R proteinleri ise transkripsiyonel regülatör olarak görev yapar. Sinyal molekülü Las sisteminde yer alan las I geninden sentezlenir ve hücre dışına basit difüzyon yöntemi ile transfer edilir.

Sinyal molekülleri dış ortamda birikerek belirli bir yoğunluğa ulaştığında bakterinin hücre membranında bulunan ve henüz tanımlanmamış bir reseptör tarafından algılanır. Bunun sonucunda hücre içinde QS sistemi aktive olur. QS sisteminin aktivasyonu bir dizi olayı başlatır. *lasI* geni tarafından sentezlenen *Pseudomonas* autoinducer-1 (PAI-1) adlı sinyal molekülü *lasR* tarafından

sentezlenen Las R proteini ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks Las R proteinini aktif hale getirir. Aktif hale gelen Las R proteinin dört fonksiyonu vardır:

- Bazı hedef virülans genlerinin ekspresyonunu başlatır,
- Rhl sistemi üzerine indüksiyon yapar,
- Las ve Rhl sistemleri arasında ulak görevi gören *Pseudomonas* quinolon sinyal molekülünün sentezini indükler,
- lasI geni üzerine indüksiyon yaparak daha fazla sinyal molekülünün sentezine neden olur.

Aktif hale gelen Las R proteini tarafından indüklenen Rhl sisteminde, *rhlI* geninden ikinci bir sinyal molekülü olan *Pseudomonas* autoinducer-2 (PAI-2) ve *rhlR* geninden de Rhl R proteini sentezlenir. PAI-2 sinyal molekülü Rhl R proteini ile birleşerek bir kompleks oluşturur ve Rhl R proteininin aktif hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen Rhl R proteini bazı hedef genlerin ekspresyonunu başlatırken, diğer taraftan da *rhlI* geni üzerine indüksiyon yaparak daha fazla sinyal molekülünün sentezlenmesini sağlar (41, 56, 57).



Şekil 2: Las ve rhl sistemlerinin sinyal molekülü üretim mekanizması

P. aeruginosa'da QS sisteminin virülansla ilgili genleri regüle ettiği in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Örneğin, Las sistemi elastaz, alkalen 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 eder (41, 58, 59).

Sözü edilen bu sinyal moleküllerinin aralarındaki ilişki oldukça kompleksdir. Bu kadar kompleks bir sistemin avantajı farklı yoğunluklarda ve farklı yoğunluk konfigürasyonlarında (apse veya biyofilm gibi) bakteriyel fonksiyonları regüle edebilmesidir. QS sisteminin şu andaki bilgilerimizden çok daha kompleks olduğu bir gerçektir. Bugün için, *P. aeruginosa*'ya ait homoserin lakton molekülleri tarafından regüle edilen en az 50 QS geninin bu sistemler tarafından regüle edildiği bilinmektedir. *P. aeruginosa*'da farklı sinyal moleküllerinin yer aldığı diğer QS mekanizmaları ise çözümlenmeyi beklemektedir (58, 60).

Tablo 2. *P. aeruginosa*'da QS ile yönetildiği bilinen virülans faktörler

Elastaz	}	<i>las</i> ve <i>rhl</i>
Sekresyon proteinleri		
AHL (acyl homoserin lakton)		
Pyosiyanin		
Süperoksit dismutaz	}	<i>las</i>
Alkalen proteaz		
Ekzotoksin A		
Katalaz		
Hidrojen siyanid	}	<i>rhl</i>
Rhamnolipid		
Lektinler		

QS *P. aeruginosa*'da virulansı, protein sentezini ve metabolizmada önemli genleri düzenler. Enfeksiyon boyunca QS sisteminin etkilerinin araştırılmasında QS genlerindeki bir veya daha fazla delesyonun bulunduğu *P. aeruginosa* suşları

değişik enfeksiyon modellerinde test edilmiştir. Bunun için şu ana kadar kronik AC enfeksiyonu, hem yavru hem de gelişkin farelerde akut pneumoni ve fare modellerinde yanık enfeksiyonu gibi modeller kullanılmıştır (61).

QS sisteminin enfeksiyon sırasında nasıl bir rol üstlendiğini saptamak amacıyla da pek çok hayvan modeli kullanılarak in-vivo deneyler yapılmaktadır. Nazal yolla enfekte edilen bu farelerde mutant suşun akciğerlerden hızla temizlenmediği ve fagositoza dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ancak mutant suşun invazyon kabiliyetini hemen hemen tamamen kaybettiği gözlenmiştir (62, 63).

QS sisteminin bakteremiye etkisini araştırmak amacıyla *lasR* geninden defektli mutant suş ile sokak suşu kullanılarak yapılan fare deneylerinde, sokak suşunun mutant suşa göre üç kat daha fazla bakteremiye sebep olduğu ve mutant suş ile enfekte hiç bir neonatal farenin ölmediği saptanmıştır (64).

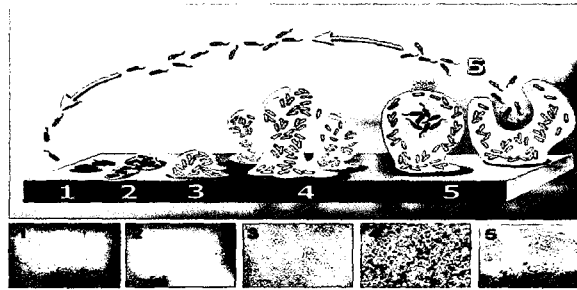
Bu veriler doğrultusunda, QS sisteminin yokluğu veya defektli olmasının bakterinin canlı kalması üzerinde herhangi olumsuz bir etkisi olmamakla birlikte, enfeksiyon oluşumunda, özellikle invazyonda son derece önemli olduğu sonucuna varılabilmektedir.

QS sistemi farelerde oluşturulan *P. aeruginosa*'ya bağlı yanık enfeksiyonlarında da çalışılmıştır. *lasI* geninden mutant suşların, enfekte olmuş yanık deriden karaciğere ve derinin diğer bölgelerine sokak suşuna oranla daha az yayıldığı saptanmış, ancak tıpkı bakteremi örneğinde olduğu gibi QS sisteminden defektli mutant suşun hayatta kalış kabiliyetinin etkilenmediği belirlenmiştir. Enfekte farelerde mortalite hızlarına bakıldığında, mutant suş ile mortalite oranının %7, sokak suşu ile %94 olduğu görülmüştür. Mutant suşa QS genlerini taşıyan plazmid transfer edildiğinde ise, mutant suş ile meydana gelen enfeksiyonda mortalite hızının %93'e yükseldiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla mortalitenin önlenmesindeki en önemli faktör QS sisteminin işlememesidir.

QS sistemi tüm enfeksiyon tiplerinde etkili değildir. Örneğin, farelerin kornealarında QS sisteminden defektli mutant suş ile oluşturulan enfeksiyonun şiddeti, sokak suşu ile oluşturulan enfeksiyonun şiddeti ile aynıdır. Bu sonuç, QS sisteminin lokal bir enfeksiyondan ziyade invazyonda önemli olduğuna işaret etmektedir (41, 65, 66).

İn-vivo deney sonuçları incelendiğinde, *P. aeruginos*'da QS sisteminin genel olarak enfeksiyonlarda önemli rol oynadığı söylenebilir. Ancak dikkat çekici nokta, QS sisteminin pek çok virülans faktörünü regüle etmesine rağmen bu sistemden defektli mutantların tamamıyla avirulan olmamasıdır. Dolayısıyla *P. aeruginosa*'da virülans multifaktöriyel olup, QS sistemi genlerinin mutasyonunun virülans üzerinde belirgin etkileri olmasına karşın patogenezi regüle eden başka faktörler de bulunmaktadır (41,46).

P. aeruginosa'nın patogenezinde biyofilm oluşturma özelliği önemli rol oynar. Biyofilm oluşumu bakterinin katı yüzeye tutunması ile başlar. Bu aşamayı takiben bakteri bir taraftan hızla çoğalmaya diğer taraftan ekzopolisakkaritten ibaret bir kılıf oluşturmaya başlar. Bu şekilde mikrokoloniler oluşturur. Mikrokoloniler arasında porlar ve borucuklar vasıtasıyla devamlı bir sıvı akışı mevcuttur. Mikrokolonilerin birbiri üzerine eklenmesi ile biyofilm kalınlaşır. Biyofilm oluşturan bakteriler fenotipik ve metabolik olarak değişime uğradıkları için çevre koşullarına ve antibiyotiklere dirençli hale gelir. *P. aeruginosa*'da QS sisteminin adezyonda ve mikrokolonilerin oluşumunda rolü olduğu da belirlenmiştir. QS sisteminden defektli mutantların oluşturduğu biyofilmlerin, sokak suşu tarafından oluşturulan biyofilmlere göre daha gevşek ve sağlam olmayan bir yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Mutant biyofilmlerin, hidrojen perokside daha hassas oldukları, katalaz ve süperoksid dismutaz aktivitelerinin azaldığı ve nötrofillere hassasiyetlerinin arttığı gözlemlenmiştir (41, 67-69).



Şekil 3. Biyofilm oluşumu

Bu gözlemlerin tümü şiddetli akut ve kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında QS sisteminin fonksiyonlarının etkilerini göstermiştir. Fakat QS, *P. aeruginos*'da pek çok faktörü regüle etmesine rağmen QS mutantlarının tam olarak avirulant olmaması ilginçtir. Bu durum *P. aeruginosa* virulansının multifokal olduğunu ve QS genlerindeki mutasyonların virulansda etkili olmasına

rağmen patojenitenin düzenlenmesinde diğer pek çok faktöründe rol oynadığı fikrini desteklemektedir (61).

3.3. QS Sisteminin Konak Yanıtı Üzerine Etkisi

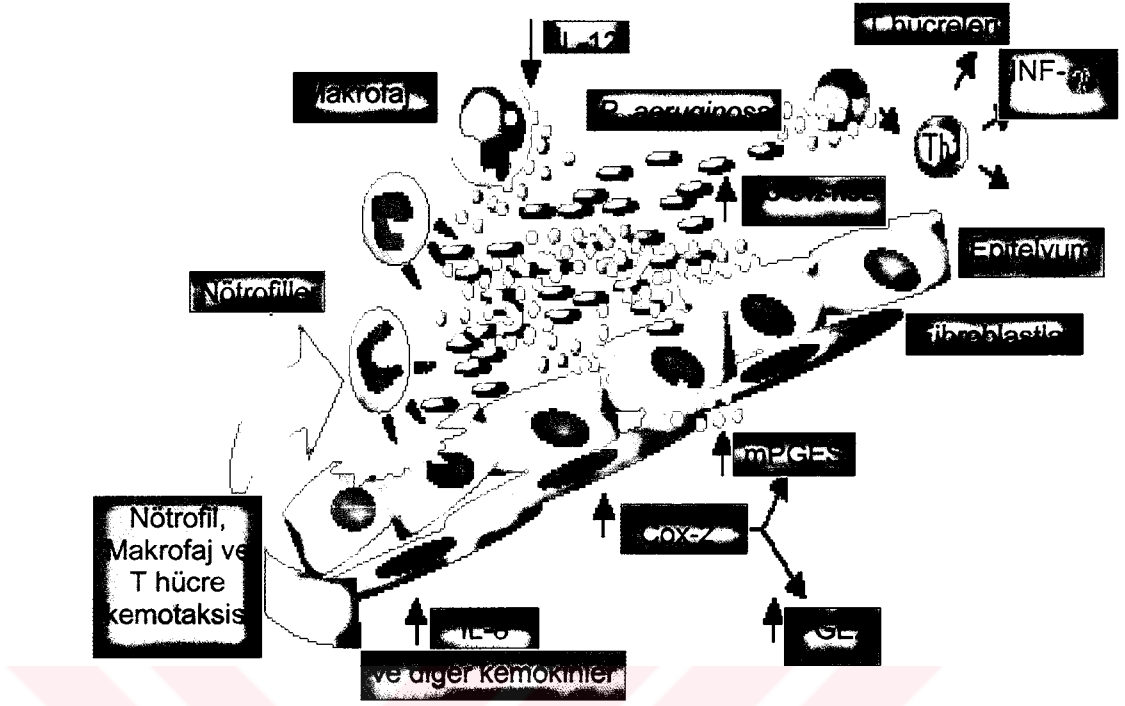
Yapılan çalışmalar daha ziyade sinyal moleküllerinin bakteriler arası iletişimdeki rolleri ve buna bağlı olarak virülans faktörlerini kontrol edebilme özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Fakat konak ile bu moleküller arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde açıklığa kavuşmamıştır. Bilinmektedir ki ökaryotik hücreler prostaglandinler ve hormonlar (AHL yapısına benzer şekilde) vasıtasıyla haberleşme yapabilmektedirler. Bu moleküller spesifik cevaplarla sonuçlanan değişik sinyal yollarını aktive ederler. Bu yüzden konak hücresinde bir cevabın ortaya çıkması için bakteriyel AHL moleküllerine benzer mekanizmalar kullanıldığı düşünülmektedir. Ökaryotik hücreler arasında ve AHL benzeri molekülleri kullanan bakteriler arasındaki haberleşmeler daha önceden tanımlanmıştır. Ökaryotik konakda sinyal molekülü üretildikten sonra bakteriye karşı cevaba neden olması AHL benzeri moleküllerin hücreler arası bir haberleşme mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir. Ökaryotik hücreler üzerine *P. aeruginosa* AHLs'sinin etkilerinin incelendiği ilk çalışmalarda birkaç AHL üreten Las R delesyonu içeren suşlar kullanılmıştır (61)

P. aeruginosa'ya ait sinyal moleküllerinin ökaryotik hücreler üzerindeki etkisini araştıran ilk çalışmalar PAI-1 mutantları ile yapılmıştır. Mutant suş insan bronşiyal epitel hücre kültürüne eklendiği zaman sokak suşuna göre mutant suşun IL-8 üretimini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Bu deneyler, hücreler üzerinde sinyal molekülünün direk etkisini göstermemekle birlikte inflamasyonda QS moleküllerinin rolü olabileceğine işaret etmektedir. Bu bulguyu desteklemek amacıyla, insan bronşiyal epitel hücre kültürüne saflaştırılmış PAI-1 eklendiğinde, IL-8 ve diğer bazı kemokinlerin üretimini arttırdığı saptanmıştır. Bunun sonucunda monosit, nötrofil ve T hücre göçü uyarılmakta, inflamasyon indüklenmektedir.

PAI-1 sinyal molekülünün diğer bir etkisi, prostaglandin (PG) yapımında son derece önemli bir yere sahip olan siklooksijenaz-2 (Cox-2) enzimi üzerinedir. Bu sinyal molekülü tarafından indüklenen siklooksijenaz-2 ve prostaglandin sentaz enzimleri nedeniyle prostaglandin E2 (PGE2) üretimi artmaktadır. PGE2'nin

fonksiyonları arasında endotelial geçirgenliğin indüksiyonu da bulunmaktadır. Ortaya çıkan yanıt sonucunda PAI-1'in uyarımına bağlı olarak koroner ve pulmoner düz kasların kontraksiyonu inhibe olmakta, bunun sonucunda lokal kan akımı, ödem ve enfeksiyon bölgesine hücre göçü artmaktadır (41)

3O-C₁₂-HSL PG'lerin üretiminde önemli bir enzim olan siklooksijenaz-2 enziminin açıklanmasını da düzenleyebilir. Bu Cox-2 indüksiyonu ve akabinde PGE₂'yi aktive ederek sentezlenmesini artırır. PGE₂ seviyesinde artış yanık yaralarında ve KF'li hastaların AC de *P. aeruginosa* enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. İbuprofen gibi antiinflamatuvar ilaçların kullanılmasıyla PGE₂ üretiminin inhibisyonu KF hastalarında AC fonksiyonlarının iyileşmesine neden olmuş ve enfekte yanık yaraları bulunan hayvanlarda da mortalite oranını azaltmıştır. PGE₂'nin pek çok fonksiyonu vardır, endotelial permeabilitenin indüklenmesi bunlardan biridir. Bu cevapların bir araya gelmesi 3O-C₁₂-HSL uyarılmasıyla hem koroner hem de pulmoner düz kas kontraksiyonu inhibe edilir. Bu vazorelaksant aktivite enfeksiyon bölgesinde lokal kan akımının, ödemin ve hücre göçünün artmasına yol açar. Antibakteriyel ve proteolitik proteinlerin sekresyonunda önemli olan insan submukozal trakeal bez seröz hücreleri (**HTGS: human submucosal tracheal gland serous cells**) üzerine yapılan çalışmalar, KF transmembran iletim düzenleyicisi (CFTR: **CF transmembrane conductance regulator**)'ndeki bir mutasyonun bu hücreleri 3O-C₁₂-HSL'den sorumlu hale getirdiğini ortaya çıkardılar. KF hastalarında rastlanan bir fenotip olan CFTR mutasyonunu içeren hücreler 3O-C₁₂-HSL ile kültüre edildiğinde, antibakteriyel ve proteolitik proteinlerin sekresyonu azaltılmış oldu. Yazarlar, sekresyondaki bu inhibisyonun *P. aeruginosa*'nın KF akciğerinde artışına bağlı bir mekanizma olabileceğini ileri sürdüler KF hastalarında rastlanan bir fenotip olan CFTR mutasyonunu içeren hücreler 3O-C₁₂-HSL ile kültüre edildiğinde, antibakteriyel ve proteolitik proteinlerin sekresyonu azaltılmış oldu. Yazarlar, sekresyondaki bu inhibisyonun *P. Aeuroginosa*'nın KF akciğerinde artışına bağlı bir mekanizma olabileceğini ileri sürdüler (61, 70).



Şekil 4. *P. aeruginosa* enfeksiyonu esnasında konak üzerine 30-C₁₂-HSL nin etkileri model olarak sunulmuştur. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının çoğunda bakteri koruyucu biyofilm tabakası içinde gelişimini sürdürür ve burada bakteriler 30-C₁₂-HSL QS molekülünü yüksek miktarda üretirler. Bu molekül multipl inflamatuvar mediatörlerin üretimini stimüle etmek için konak hücresi ile bağlantı kurar. IL-8 ve diğer kemotaktik faktörlerin indüksiyonu enfeksiyon alanına pek çok farklı hücre çeşidinin göçünü uyarır. Ancak nötrofiller gibi hücreler tarafından üretilen faktörler enfeksiyonu ortadan kaldıramaz ve sonunda doku hasarı meydana gelir. PGE₂ gibi diğer mediatörlerin indüklenmesi inflamatuvar süreci daha da zora sokabilir. 30-C₁₂-HSL aynı zamanda enfeksiyon boyunca indüklenen immün cevabın tipini belirleyen IL-12 ve IFN- γ gibi çeşitli sitokinlerin üretiminde değişiklikler oluşturarak bir immünomodülatör gibi hareket edebilir (61).

PAI-1 sinyal molekülünün immün hücreler üzerine olan etkisi de gösterilmiştir. Lipopolisakkarit ile aktive olmuş fare peritoneal eksuda hücreleri PAI-1 ile kültür edildiğinde IL-12 üretiminde ciddi bir inhibisyon olduğu saptanmıştır. IL-12, T hücrelerinden IFN- γ yapımını sağlayan çok önemli bir stimülatördür. Bu stimülasyon sonucu makrofaj aktivasyonu ve proinflamatuvar

cevabın indüksiyonu meydana gelmektedir. IL-12'nin PAI-1 sinyal molekülü tarafından inhibisyonu, T hücrelerinin aktivasyonunu ve dolayısıyla IFN- γ üretimini bloke eder (41, 71)

3O-C₁₂-HSL sadece fibroblast ve epitel hücreler gibi yapısal hücreleri aktive etmez aynı zamanda klasik immün hücreleri de aktive eder. Örneğin LPS ile aktive edilmiş fare peritoneal hücreleri 3O-C₁₂-HSL ile kültüre edildiğinde IL-12 üretiminin önemli ölçüde inhibe edildiği görülmüştür. IL-12 proinflamatuvar cevabın indüksiyonunda ve makrofaj aktivasyonunda önemi ve rolü bilinmektedir. Bununla birlikte T hücreleri tarafından üretilen interferon- γ (IFN- γ) stimülasyonunda aracılık yapan sitokindir. IL-12'nin inhibe olması doğal olarak IFN- γ 'nın üretiminde ve T hücrelerinin aktivasyonunda değişiklikler oluşturacaktır. Bununla birlikte 3O-C₁₂-HSL, IFN- γ üretiminin uyarılmasında rol oynar ve T hücreleri ile direkt olarak etkileşebilir (27). Bu nedenle çevresel uyaranlara ve hücre tiplerine bağlı olarak hareket eden 3O-C₁₂-HSL immün cevabın farklı yönlere kaymasını indükleyebilir. Bu yüzden *P. aeruginosa* enfeksiyon sürecinin farklı dönemlerinde 3O-C₁₂-HSL bakteri patogenezinde önemli etkiler oluşturarak konak immün cevabında değişimleri indükleyebilir.

PAI-1 sinyal molekülünün diğer bir etkisi, yardımcı T hücre (Th) yanıtı üzerinedir. Bu sinyal molekülü Th yanıtını Th1 'den Th2'ye doğru değiştirmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarda çok önemli bir yere sahip olan Th1 yanıtı IL-12 ve IFN- γ senteziyle karakterizedir. Bir sinyal molekülü tarafından T hücre aktivasyonunun baskılanması, bakterinin avantajına bir durum sağlamaktadır. PAI-1 'e ait bu etkiler *P. aeruginosa*'da bulunan diğer sinyal molekülleri ile gerçekleşmemektedir (72, 73).

Sinyal molekülleri ile konak hücreler arasındaki etkileşime dair daha pek çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

3.4. Farklı Cinsler Arasında Etkileşimlerle QS Sisteminin Rolü

Aynı tür içinde ve aynı cins içindeki farklı türler arasında etkileşimler olabildiği gibi farklı cinsler arasında da böyle etkileşimler söz konusudur. Kistik fibrozisli hastalarda hastalığın erken dönemlerinde akciğerlerde *S. aureus* kolonize olmakta, ileri dönemde *S. aureus* kolonizasyonu yerini *P. aeruginosa*'ya

birakmaktadır. *P. aeruginosa*'nın *S. aureus*'un yerini almasındaki neden, bu iki bakterinin farklı dilleri konuşmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim *S. aureus* kültürlerine eklenen *P. aeruginosa*'nın sinyal molekülü *S. aureus*'daki efektör molekül olan RNA III'ün ekspresyonunu inhibe etmekte ve böylece virülans faktörlerinin oluşması engellenmektedir. Bu durumda toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), hemolizin, protein A ve fibronektin bağlayan proteinin oluşmadığı belirlenmiştir (41,74). Dolayısıyla kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinden *S. aureus*'un eradikasyonu *P. aeruginosa*'ya bağlıdır. Farklı Gram negatif bakterilerin aynı aileye ait sinyal molekülleri sentezlediği bilinmektedir. Bu mikroorganizmalar birlikte buldukları ortamlarda aynı dili konuşmalarının avantajını kullanırlar. Örneğin, kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde enfeksiyona yol açan ve ciddi mortalite nedenlerinden olan *P. aeruginosa* ve *B. cepacia* aynı sinyal moleküllerinin kullanıldığı QS sistemine sahip olmaları nedeniyle birbirlerinin virülans faktörlerinin sentezine yardımcı olurlar.

Hem Gram negatif, hem de Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan autoinducer-2 (AI-2) sinyal molekülü, farklı bakteri topluluklarının birbirlerini algılamalarını sağlar. AI-2 sinyal molekülü furanosil borat diester yapısında olup, diğer sinyal moleküllerinden yapı olarak çok farklıdır. Bu sinyal molekülü pek çok bakteride tanımlanmış olup, hangi yolla sentez edildiği ve QS sistemini nasıl aktive ettiği ile ilgili bilgiler henüz açıklık kazanmamıştır . Şimdiye kadar yapılan çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, AI-2 sinyal molekülünün, *Escherichia coli*'de (0157: H7) shiga toksin yapımını, *Porphyromonas gingivalis*'de hemagglütinin aktivitesini, *Salmonella typhi*'de biyofilm oluşumunu ve *Streptococcus pyogenes*'de hemolizin yapımını kontrol ettiği belirlenmiştir (41, 75, 76).

Farklı bakteriler üzerinde AI-2'nin ne şekilde işlev gördüğü ve gerek virülans gerekse bakteriler arası iletişimdeki rolünü belirlemek amacıyla in-vitro ve in-vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3.5. Enfeksiyonlardan Korunma ve Tedavide QS inhibitörlerinin Yeri

Bir enfeksiyon sırasında bakteri üremesinin inhibisyonu, invazyon yeteneğine sahip bakterinin eradikasyonu amacıyla kullanılan bir yaklaşımdır.

Ancak hızla gelişen antibiyotik direnci bazen bu yaklaşımı başarısız kılabilir. Diğer bir yaklaşım, bakterilerin birbirleriyle ve konak ile iletişimlerini önlemek, başka bir deyişle QS sistemini inhibe etmek olabilir. 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 (77).

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 µg/ml azitromisinin, *P. aeruginos*'da elastaz ve rhamnolipid sentezini inhibe ettiğini göstermiştir. 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. 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.

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 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, pyoverdin ve kitinaz aktivitelerinin tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir.

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. 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. 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 (41, 78).

Bu bilgiler ışığında çıkarılacak en önemli nokta, bakteriler arası iletişimin engellenerek bakteri virülansının kontrol altına alınabileceğidir. Virülansın direk olarak hedef alınması, *P. aeruginosa* ile enfekte kişilerin erken profilaktik tedavisinde ümit vaad etmektedir. QS inhibitörü olan ajanlar, akciğerlerde, implantlar üzerinde ya da yaralarda biyofilm oluşumunu engelleyebilir. Kistik fibrozis'li (KF)'li hastalarda bu yaklaşım ile konak patojen dengesi konak lehine dönerek patojenin eradikasyonuna yardımcı olabilir ve böylece ciddi enfeksiyonlar önlenir.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. GEREÇLER

4.1.1. Besiyerleri

1. Laura Bertani (LB) agar (Sigma)
2. LB broth (Sigma)
3. Pseudomonas broth (PB) besiyeri
 - 20 g Bacto-Peptone (Difco)
 - 1.4 g MgCl₂
 - 10 g K₂SO₄
 - 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı.
4. M 63 minimal medium
 - 13.6 g KH₂ PO₄
 - 2.0 g (NH₄)₂SO₄
 - 0.5 mg FeSO₄.7H₂O (pH 7.0)
 - 0.2% (w/v) glucose
 - 1 mM MgSO₄.7H₂O
 - 0.5% (w/v) Casamino asit ile desteklenerek 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı

4.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Elastin Kongo kırmızısı (Elastin-Congo Red) (Sigma)
2. Gliserol
3. Azur mavisi (Hide azure blue powder) (Sigma)
4. Kloroform
5. Hidroklorik asit
6. Kristal viyole
7. Sodyum fosfat buffer (1M NaHPO₄ pH 6.8)
 - 69 g Na₂HPO₄. H₂O
 - 134 g NaH₂PO₄.7H₂O
 - 1L distile suda çözülerek hazırlanmıştır.
8. *Chromobacterium violaceum* CV026 (mini-Tn5 mutant) suşu
9. *Agrobacterium tumefaciens* NT1 suşu

4.2. ARAÇLAR

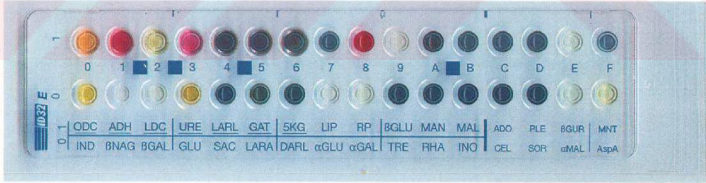
1. Etüv
 2. Çalkalayıcı Etüv
 3. Pasteur fırını
 4. Otoklav
 5. Buzdolabı
 6. Derin dondurucu (-80)
 7. Hassas terazi
 8. Soğutmalı Santrifüj
 9. Karıştırıcı (Vortex)
 10. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1600)
 11. Petri kutuları, pipetler, tüpler, pipet uçları
 12. pH metre
- 

4.3. YÖNTEMLER

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya alınmıştır. Bakterinin virülansında önemli rol oynadığı kabul edilen elastaz, alkali proteaz, pyosiyenin ve biofilm oluşumu gibi faktörlerin kantitatif ölçümleri yapılmıştır. *P. aeruginosa*'nın virülansında rolü olan determinantların bir çoğunun üretimini kontrol eden QS sisteminde yer alan uzun zincirli ve kısa zincirli sinyal moleküllerini üretebilen suşlar saptanmıştır.

4.3.1. Klinik örneklerin izolasyonu

2004-2005 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yatan hastalardan elde edilen 30 idrar, 21 kan, 19 yara, 16 balgam, 7 kulak akıntısı, 4 katater örneğinden izole edilmiş toplam 100 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya alınmıştır. Tanımlanma Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında API ID 32E (BioMerieux, Fransa) otomatik sistemi ve konvansiyonel yöntemler kullanılarak yapılmıştır (Resim 1). İzolatlar Laura Bertani (LB) agar'da üretildikten sonra %20 gliserollü LB broth besiyerinde bir gecelik inkübasyonu takiben -80 °C'de saklanmıştır. Stoklanan kültürler birden fazla dondurma ve çözme işlemine tabi tutulmamıştır (79).



Resim 1 : API ID 32E (BioMerieux, Fransa) stripi

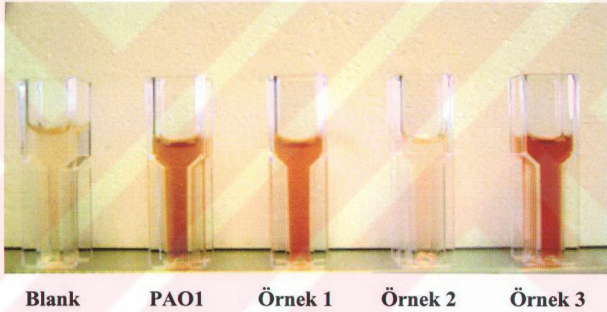
4.3.2. Enzim Ölçümleri İçin Supernatan Hazırlanması

LB agarda üretilen her bir izolattan 6 (altı) koloni 5ml'lik Laura-Bertani (LB) broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübe edilerek çoğaltıldı. Tüm kültür süspansiyonları 540 nm'de 2.0 absorbans değerine ayarlanarak standardize edildi. Ayarlama işlemi steril LB broth eklenerek yapıldı. Bu standart bakterie

süspansiyonlarından 1 ml alınarak 30 ml LB broth besiyerine eklenerek 37 °C'de 18 saat inkübasyona tabi tutuldu. Sonra 4°C, 10000 g'de, 20 dakika, santrifüjlenerek süpernatantlar enzim ölçümleri için ayrıldı (79, 80, 81).

4.3.3. Elastaz Tayini (Elastin Kongo Kırmızısı Deneyi)

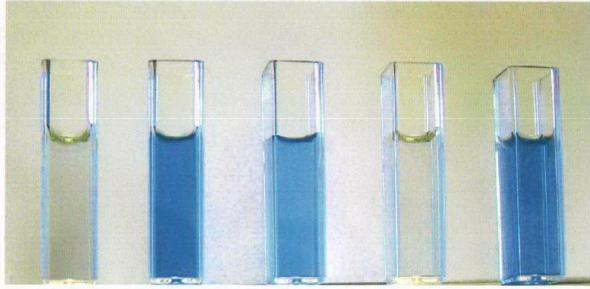
İzolatlardan elde edilen süpernatantlardaki elastolitik aktivite, elastin Kongo kırmızısı deneyi (elastin kongo red) kullanılarak saptandı (Resim 2). Süpernatantlardan 100µl alınarak her birine 30 mg substrat olarak elastin Kongo red içeren 2 ml Sodyum fosfat buffer (10 mM NaHPO₄) tampon çözeltisi eklendi. Bu reaksiyon 37 °C'de 14 saat süreyle inkübasyona tabi tutuldu. 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek ortama salınan Kongo red 495 nm dalga boyunda (OD 495) ölçüldü (Shimadzu UV-1600 spectrophotometer). Pozitif kontrol olarak PAO1 suşu kullanıldı (79, 81, 82, 83).



Resim 2: *P. aeruginosa* suşlarında ve pozitif kontrol olarak kullanılan PAO 1 suşunda elastaz aktivitesinin spektrofotometrik (OD 495) olarak elastin Kongo red yöntemiyle gösterilmesi

4.3.4. Total Proteaz Tayini

Proteolitik aktivite Lanotte ve arkadaşlarının tarif ettiği metotla ölçüldü. 1 ml süpernatana 5 mg azur mavisi (Hide powder azure) içeren 2 ml 10 mM NaHPO₄ eklenerek 37 °C'de 2 saat güçlü bir şekilde çalkalayıcıda karıştırıldı. Karışım 2000 g'de 10 dakika santrifüj sonrası süpernatant alınarak çöktelti atıldı. Süpernatant absorbansı değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü (Resim 3). Pozitif kontrol olarak PAO1 suşu kullanıldı (80, 84).

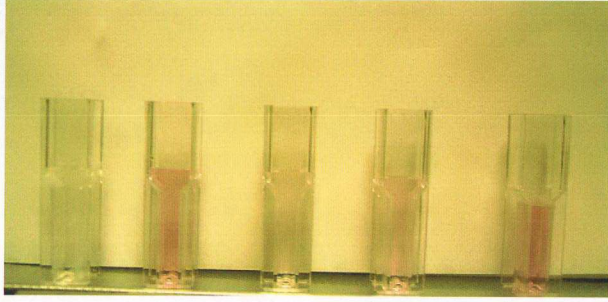


Blank PAO 1 Örnek 1 Örnek 2 Örnek 3

Resim 3: Alkali proteaz düzeylerinin *P. aeruginosa* suşlarında ve pozitif kontrol olarak kullanılan PAO 1 suşunda spektrofotometrik (OD 595) olarak Azur mavisi deneyi ile ölçümünün gösterilmesi

4.3.5. Pyosiyanın Tayini

Pyosiyanın ölçümü asidik solüsyonda 520 nm dalga boyunda absorbans değerlerini tayin etme temeline dayanılarak gerçekleştirildi. Kültürler *Pseudomonas* broth (PB) besiyerinde üretildi. Tüm kültürler 0.5 Mc Farland (10^8 CFU/ml) ölçüsünde standardize edildi. Bu kültürden 330 µl alınarak 15 ml'lik falkon tüplerde 10 ml PB mediumda 24 saat 37 de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda santrifüj edilerek (10000 g x 20 dakika) süpernatant ayrıldı. 5 ml süpernatant 5ml kloroform eklenerek 2 saat çalkalayıcıda 37 de karıştırıldı. Karışımın alt kısmı pipet yardımıyla alınarak ayrı bir tüpe aktarıldı ve 1.5 ml 0.2 N HCl ilave edildi. Üst tabakada açık pembe-koyu kırmızıya kadar değişebilen renklerin mevcut olduğu pyosiyanın zengin tabakası ayrılarak spektrofotometre kuvvetlerine aktarıldı (Resim 4). Spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda (OD 520) ölçüm yapıldı (79, 81, 85).

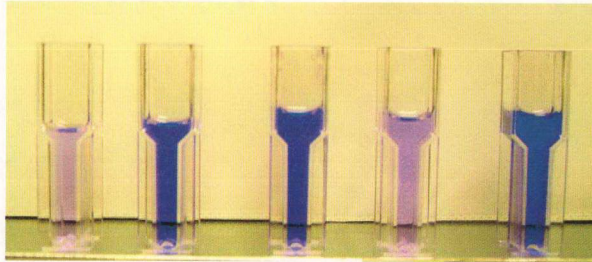


Blank PAO 1 Örnek 1 Örnek 2 Örnek 3

Resim 4: Pyosyanin ölçümlerinin çalışma suşlarında ve PAO 1 suşunda gösterilmesi

4.3.6. Biofilm Ölçümü

LB broth mediumda bir gecelik inkübasyon sonucunda M 63 minimal medium ile 0.02 (OD 600) absorbansa ayarlanarak standardize edildi. Bu süspansiyondan 1 ml, 12 x 75'lik polistren tüplere (Becton Dickinson, BD Falcon 352054) aktarıldı. 30 °C'de 10 saat inkübasyonu takiben tüp içeriği yavaş bir şekilde boşaltılarak tüpler nazik bir şekilde distile su ile yıkandı. Tüplere 1 ml %1'lik kristal viyole konuldu. Yaklaşık 15 dk boyama devam ettirildi. Yavaşça distile su ile tekrar yıkama yapıldı. Boyanmış biofilm kaplı tüplere 4 ml %95 etanol doldurularak boyanmış biofilm tabakası çözdürüldü. Spektrofotometre küvetlerine aktarıldı (Resim 5). 495 nm dalga boyunda (OD 495) ölçüm yapıldı (79, 86, 87, 88).



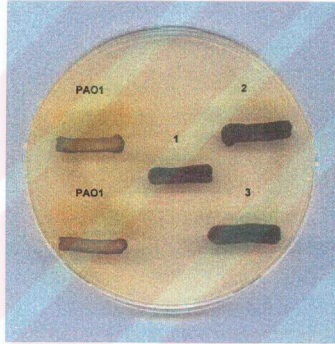
Blank PAO 1 Örnek 1 Örnek 2 Örnek 3

Resim 5: Biofilm ölçümlerinin çalışma suşlarında ve PAO 1 suşunda gösterilmesi

4.3.7. Sinyal Moleküllerinin Tayini

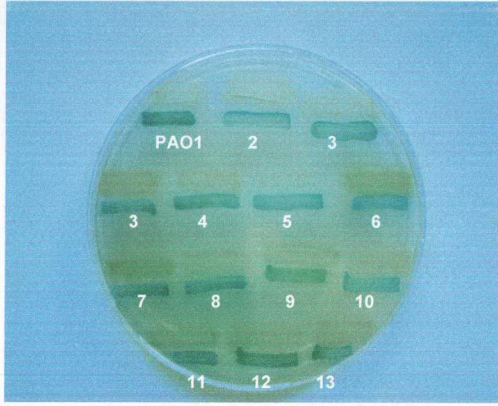
Tüm suşlar LB agar da üretildi. Acyl homoserin laktonların (AHL: acylated homoserine lakton) tanımlaması hem *Chromobacterium violaceum* suşu CV026 (89) hem de *Agrobacterium tumefaciens* suş NT1 kullanılarak yapıldı (90, 91, 92, 93).

C. violaceum CV026 (mini-Tn5 mutant), 4. karbondan 8. karbona kadar olan N-acyl zincirinde AHL'nin (N-butanoyl-L-homoserine lactone: BHL) saptanması için indikatör suş olarak kullanıldı. *C. violaceum* CV026 mutant suş olduğundan kendi başına violesin pigmentini oluşturamaz. Bu pigmenti oluşturabilmesi için AHL moleküllerine ihtiyaç duyar. *C. violaceum* CV026 içerdiği mor renkli violesin pigmenti aracılığıyla AHL moleküllerine karşı yanıt oluşturur (Resim 6)(89).



Resim 6: Kısa zincirli AHL (N-butanoyl-L-homoserine lactone: BHL) üretiminin gösterilmesi (PAO1 kontrol suşu ve pozitif reaksiyon veren suşlar (1, 2, 3).

Agrobacterium tumefaciens suş NT1 plazmid pZLR4 taşıyıcı ve ek indikatör olarak kullanılır. *Agrobacterium tumefaciens* suş NT1 6. karbondan 12. karbona kadar uzanan N-acyl zincirinde AHL ye yanıtta X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-*b*-D-galactopyranoside) varlığında mavi renk oluşturur (Resim 7) (90, 91, 92).



Resim 7: Uzun zincirli AHL molekülünün gösterilmesi. Tüm suşlar pozitif reaksiyon verdi.

Çalışma suşları %1.2 agar ile katılaştırılmış ve antibiyotik eklenmiş LB agar besiyerinde üretilirdi. *Agrobacterium tumefaciens* suş NT1 için 20 mg/ml gentamisin, *C. violaceum* CV026 için ise 20 mg/ml kanamycin kullanıldı.

4.3.8. AHL Saptanması için Paralel Çizim Yöntemi

N-acyl-homoserin laktone üretimi, çalışma suşları ve bunlara paralel çizgide ekimi yapılan CV026 ve NT1 suşlarının 30°C'de 1 gece inkübasyonunu takiben pigment oluşumu gözlenerek incelendi. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşuyla için, LB agar besiyerine 50µg/mL X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ve Gentamisin 20µg/ml ilave edildi. Test edilecek suşlar çizilerek 30 derecede 1 gece inkübe edildi.

4.3.9. İstatistik:

İstatistiksel yöntemler olarak, bağımsız örneklerde student's *t* testi, Mann-Whitney U testi, korelasyon analizi (Spearman) ve multiple regresyon analizleri SPSS 6.0 for Windows 95 kullanılarak yapıldı. istatistiki anlamlılık için $p < 0.05$ değeri eşik alındı.

5. BULGULAR

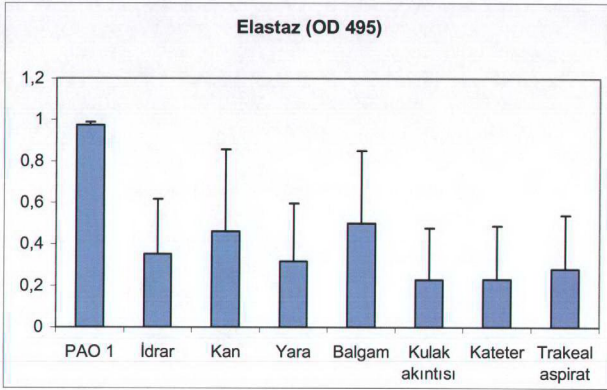
2004-2005 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yatan hastalardan enfeksiyon etkeni olarak çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 100 *Pseudomonas aeruginosa* suşu toplanmıştır. Suşların vücut bölgelerine göre dağılımı Tablo 3'de sunulmuştur. Ayrıca tüm kökenlerde virülans faktörlerinin üretimini düzenleyen ve bakteriyel iletişimde (QS: quorum sensing) rol alan kısa zincirli ve uzun zincirli sinyal moleküllerinin varlığı araştırılmıştır.

Tablo 3: *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının izole edildiği vücut bölgeleri

Vücut bölgesi	n (sayı)
İdrar	30
Kan	21
Yara	19
Balgam	16
Kulak Akıntısı	7
Kateter	4
Trakeal aspirat	3

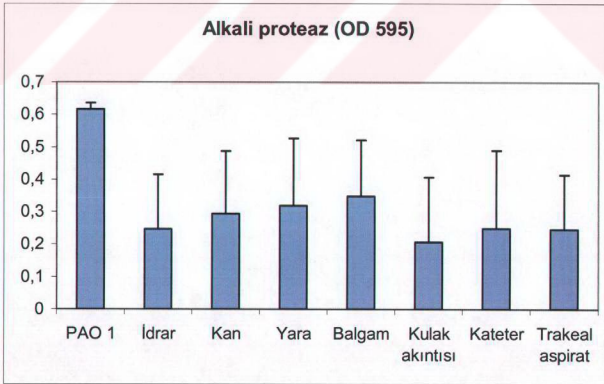
Pozitif kontrol olarak kullanılan PAO1 suşuna ait Elastaz aktivitesi ($0,973 \pm 0,0145$) çalışma grubuna ait suşlardan daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Balgam ve kan örneklerinden elde edilen suşların elastaz aktivitesi (sırasıyla $0,499 \pm 0,35$, $0,46 \pm 0,396$) diğer lokalizasyonlara ait suşlara göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Ayrıca tüm bölgelere göre elastaz aktivite düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0.05$) (Şekil 5).



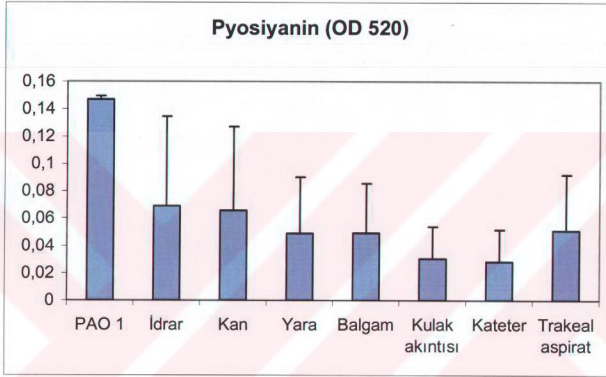
Şekil 5: Vücut bölgelerine göre elastaz enzim aktivitesi (OD 495). Ortalamalar \pm SEMs olarak verilmiştir ($p>0.05$).

Alkali proteaz aktivitesi pozitif kontrol olarak kullanılan PAO1 suşunda ($0,616 \pm 0,0197$) diğer tüm bölgelere ait suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Tüm lokalizasyonlara ait alkali proteaz enzim aktiviteleri birbirleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($P>0.05$) (Şekil 6).



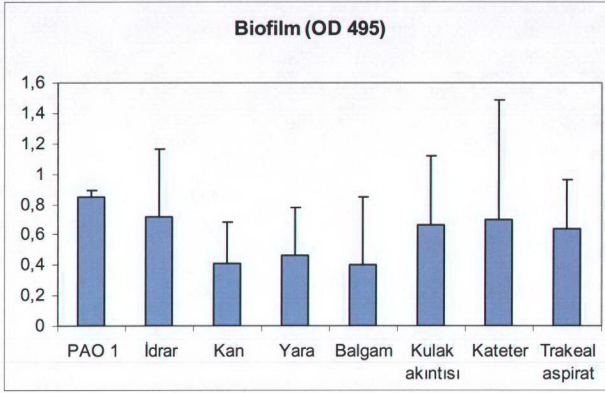
Şekil 6: Vücut bölgelerine göre alkali proteaz aktivitesi (OD 595). Ortalamalar \pm SEMs olarak verilmiştir ($p>0.05$).

Pyosiyenin üretimini spektrofotometrik olarak ölçümünde pozitif kontrol olarak kullanılan PAO1 suşunda ($0,147 \pm 0,0025$) balgam ve kan izolatlarna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ($P<0.05$), idrar pyosiyenin düzeyleri standart suşa yakın değerlerde bulunmuştur. İdrar örneklerinin pyosiyenin değerleri ($0,0691 \pm 0,0654$), kan, yara ve balgam izolatlarna göre (sırasıyla $0,0656 \pm 0,0614$, $0,0488 \pm 0,0415$, $0,0492 \pm 0,0363$) daha yüksek ve istatistiksel açıdan fark anlamlıydı ($P<0.05$) (Şekil 7).



Şekil 7: Vücut bölgelerine göre pyosiyenin üretim düzeyleri (OD 520). Ortalamalar \pm SEMs olarak verilmiştir

Biofilm oluşumu incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan PAO1 suşunda ($0,845 \pm 0,0476$) kan ve balgam izolatlarna ait değerlerden (sırasıyla $0,414 \pm 0,265$, $0,403 \pm 0,447$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($P<0.05$). Ancak, idrar, kateter, yara ve trakeal aspiratların biofilm oluşumları PAO1 suşuyla kıyaslandığında fark anlamlı değildi ($P>0.05$). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise idrar izolatlarnın biofilm oluşum düzeyi ($0,719 \pm 0,441$), kan, yara, balgam izolatlarnadaki değerlerden (sırasıyla $0,414 \pm 0,265$, $0,467 \pm 0,31$, $0,403 \pm 0,447$) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($P<0.05$) (Şekil 8).



Şekil 8: Vücut bölgelerine göre biofilm oluşum düzeyleri (OD 495). Ortalamalar \pm SEMs olarak verilmiştir.

Chromobacterium violaceum CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 indikatör suşları, tüm test suşlarında AHL üretimini gözlemek için kullanıldı ve pozitif sonuç verenler kayıt altına alındı. Tüm suşlar uzun zincirli sinyal molekülünü (3OC₁₂-HSL: N-(3-oxododecanoyl) homoserin lactone) üretirken, Suşların 29'unun kısa zincirli sinyal molekülü (BHL: N-butanoyl-L-homoserine lactone) ürettiği gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) kısa ve uzun zincirli sinyal moleküllerinin CV026 ve NT1 indikatörlerine yanıt oranları.

	CV026		NT1	
	+	-	+	-
Suş sayısı	29	71	100	0

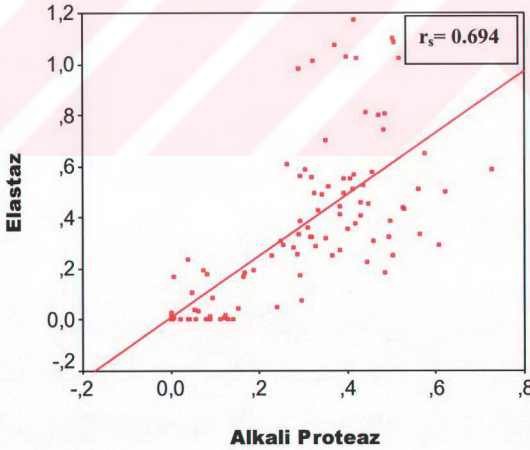
Kısa zincirli AHL molekülü üreterek indikatör suşlara karşı pozitif (n=29) ve negatif sonuç elde edilen suşların virülans faktörleri arasındaki ilişki tablo 5'de sunulmuştur. Kısa zincirli sinyal molekülü üreten suşlara ait elastaz, alkalen

proteaz değerleri, üretmeyen veya az seviyede üreten suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Pyosiyanın değerleri de daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildi. Biofilm değerleri ise bunların aksine kısa zincirli sinyal molekülü üretenlerde daha düşük seviyede saptandı (Tablo 5).

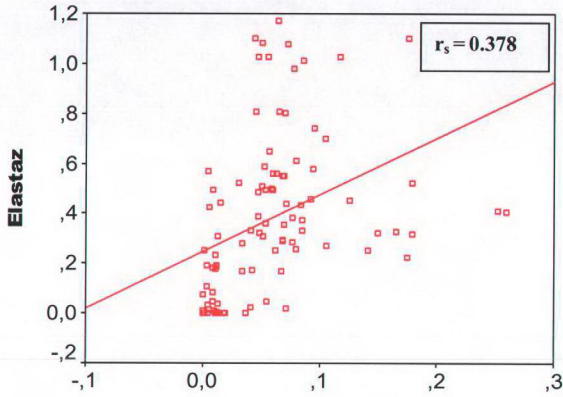
Tablo 5: AHL molekülü üreten ve üretmeyen suşlara ait virülans faktörlerinin üretim düzeyleri

sinyal molekülü	Elastaz	Alkali Proteaz	Pyosiyanın	Biofilm
Pozitif (n:29)	0.529 ± 0.304	0.389 ± 0.149	0.063 ± 0.041	0.409 ± 0.404
Negatif (n:71)	0.315 ± 0,312	0.267 ± 0.184	0.0699 ± 0.079	0.606 ± 0.407
P değerleri	< 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05

Tüm suşların (n=100) ürettikleri elastaz, alkali proteaz, pyosiyanın ve biofilm oluşum düzeyleri arasındaki bağıntı analizleri yapıldı. Elastaz, alkalen proteaz ve pyosiyanın değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla Şekil 9, 10, 11).

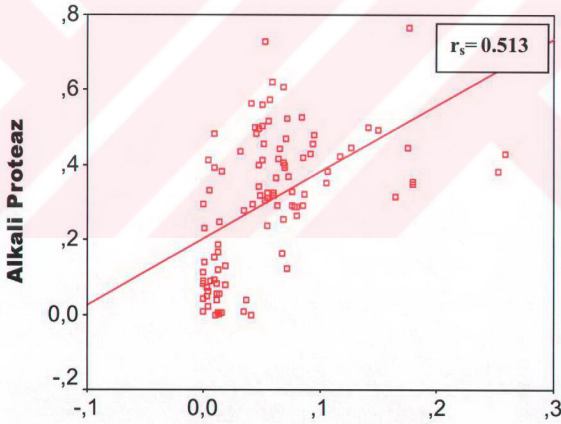


Şekil 9. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) elastaz ve alkali proteaz düzeyleri arasındaki ilişki (p>0,001).



Pyosiyanin

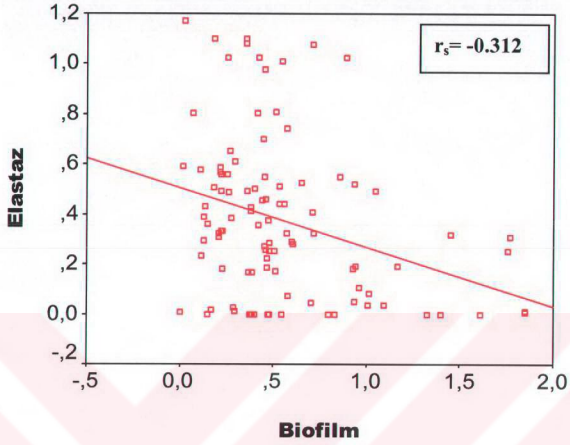
Şekil 10. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) elastaz ve pyosiyanin düzeyleri arasındaki ilişki ($p < 0.001$).



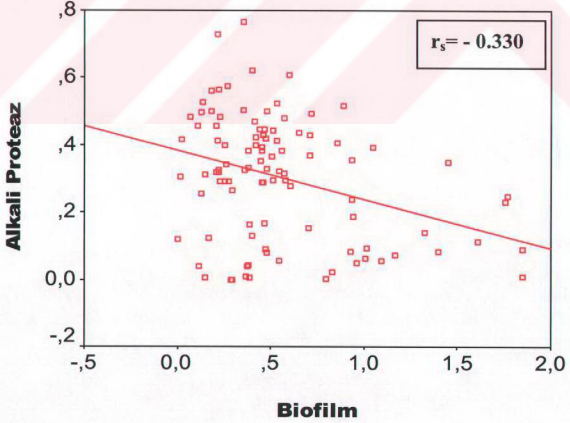
Pyosiyanin

Şekil 11. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) alkali proteaz ve pyosiyanin düzeyleri arasındaki ilişki ($p < 0.001$).

Biofilm oluşumu ile elastaz, alkali proteaz düzeyleri arasındaki bağıntı lizi yapıldığında ilginç bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı ve negatif bir ki saptanmıştır (Şekil 12, 13).

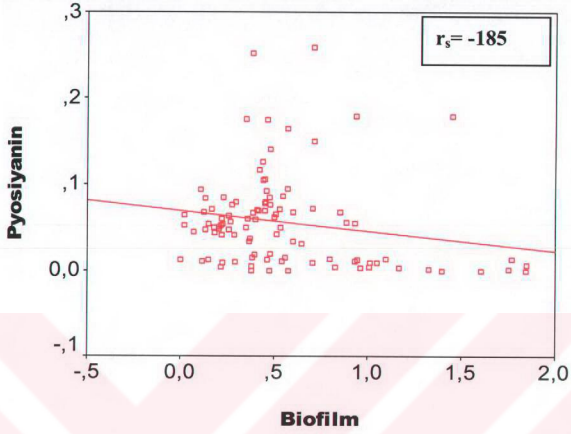


Şekil 12. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) elastaz ve biofilm oluşum düzeyleri arasındaki ilişki ($p < 0,05$).



Şekil 13. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) alkali proteaz ve biofilm düzeyleri arasındaki ilişki ($p = 0.001$).

Pyosiyanın ve biofilm oluşumu arasındaki bağıntı analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 14).



Şekil 14. *P. aeruginosa* suşlarında (n=100) pyosiyanın ve biofilm düzeyleri arasındaki ilişki ($p > 0,05$).

6. TARTIŞMA

İnsanlarda birçok farklı enfeksiyon tipine yol açan *P. aeruginosa* virülansı bir çok faktöre bağlıdır. Enfekte olan dokuya bağlı olarak *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde bazı virülans faktörleri diğerlerine göre daha önemli rol oynamaktadırlar. Doğal enfeksiyonlarda *P. aeruginosa* virülansına bireysel faktörlerin katılımı bazı klinik çalışmalarda incelenmiştir. Bu çalışmalar enfeksiyon sırasında tek bir virülans faktör kaybını kompanse etmek için diğer virülans faktörlerinin ortaya çıkartıldığını göstermiştir. Ekzotoksin A, las B, ekzoenzim S, Ekzo U veya diğer faktörleri defektif olan suşlar, bireysel olarak kulak, alt solunum yolu, üriner yol ve yara enfeksiyonlarına yol açmıştır (94-98).

Paeruginosa'da QS sisteminin virülansla ilgili genleri regüle ettiği in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Örneğin, Las sistemi elastaz, alkale 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 (58, 59). 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.

Bizim çalışmamızda *P. aeruginosa*'nın klinik enfeksiyonlara yol açması bakımından QS sistemlerinin temel rol oynayıp oynamadığını saptamaya çalıştık. Çalışmamızda 100 *P. aeruginosa* suşunda elastaz, alkali proteaz, pyosiyenin, biofilm oluşum aktiviteleri incelendi. Ayrıca bu suşlarda QS sisteminde rol alan kısa ve uzun zincirli N-Acyl homoserin laktonların varlığı araştırıldı.

Lanotte ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Kistik fibrozisli (KF) hastaların klinik durumlarıyla *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının ürettiği dört ekzoenzim (proteaz, elastaz, nöraminidaz, fosfolipaz C) arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu bakteriyle enfekte olan 22 KF hastasından 212 *P. aeruginosa* izolatu çalışılmış ve hastalar Shwachman-Kulczycki-Khaw (SKK) skorlama

sistemine göre üç klinik gruba ayrılmıştır. Üç popülasyondaki hastalardan alınan izolatların enzim üretimi analiz edildiğinde çok iyi ya da iyi klinik duruma sahip hastalardan elde edilen izolatların diğer hastaların izolatlarından daha yüksek elastaz ve nöraminidaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Aksine KF izolatlarının genel bir karakteristiği olan fosfolipaz C aktivitesi ise bitkin ve ya zayıf klinik duruma sahip hastaların izolatlarında daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma ile *P. aeruginosa*'nın klinik durumu iyi olan hastalarda nöraminidaz ürettiği, fosfolipaz C üretiminin ise pulmoner fonksiyon azalmasından kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (80).

Janda ve arkadaşları çevresel suşlar ile klinik suşların enzim aktivitelerini karşılaştırmışlar ve klinik izolatlarda elastaz ve proteaz aktivitelerinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Klinik izolatlarda daha fazla enzim üretiminin görülmesi ve sistemik izolatlarda elastaz ve alkali proteaz aktivitesinin yüzeysel ve lokal (ürogenital ve balgam vs.) izolatlara göre daha yüksek olması bu enzimlerin invazyonda oynadığı rolü ortaya koymuştur (99,100).

Bizim yaptığımız çalışmada özellikle kan ve balgam örneklerinde elastaz ve alkali proteaz aktivitesinin yüksek bulunması, sistemik enfeksiyonlarda bu enzimlerin invazyondaki rolüne ait verileri destekler mahiyettedir. Bu bulguya paralel olarak çalışmamızda özellikle kısa zincirli sinyal molekülü üreten suşlarda elastaz ve alkali proteaz seviyelerinin yüksek bulunması QS sisteminin virulans, patojenite ve invazyon kabiliyetinde oynadığı rolü göstermektedir.

Lokal bir enfeksiyon tanısı konduğunda, izole edilen suşun yüksek miktarda proteaz üretip üretmediğinin saptanması önemlidir. Bu durumda uygun antibakteriyel tedaviye başlanarak sistemik yayılımın önlenebileceği savunulmaktadır. Ayrıca epidemiyolojik açıdan enzim profillerinin çıkartılmasının, kökenlerin piyosin tiplendirilmesi, seroloji ve antibiyotik duyarlılık testlerinden daha avantajlı olduğu gösterilmiştir (99).

P. aeruginosa, hastalığın patogeneğinde rol oynadığı saptanan bir çok ekstraselüler ürün oluşturur. Wood ve arkadaşlarının çalışmasında, konağın durumunun, salgılanan ürünlerin seviyesini ciddi bir şekilde etkilediğini gösterilmiştir. Yanık yaraları, deri yaraları, idrar, KF balgamı, akut pnömoni balgamı ve kan gibi değişik klinik örneklerden izole edilen çok sayıda *P.*

aeruginosa suşları karşılaştırılmış olup, klinik izolatların total proteaz, elastaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A ve ekzoenzim S seviyeleri in vitro ortamda kantitatif olarak ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada akut akciğer enfeksiyonu izolatlarında elastaz ve ekzoenzim S seviyeleri, idrar örneklerinden elde edilen suşlarda fosfolipaz C, ve kan izolatlarında ise fosfolipaz C ve ekzotoksin A anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Hücre dışı ürünler bakterinin izole edildiği lokalizasyona bağlı olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir. KF balgamından elde edilen izolatlar özellikle *P. aeruginosa*'nın neden olduğu Akut AC enfeksiyonlarından elden edilenle karşılaştırıldığında hemen hemen tüm ürünler daha düşük bulunmuştur (84).

Bu bilgiler ışığında sistemik enfeksiyona eğilim açısından risk altında olan hastalarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu lokal bir enfeksiyon görüldüğünde, izole edilen suşun yüksek oranda elastaz aktivitesine sahip olup olmadığının saptanması durumunda, uygun antibiyotik tedavisinin başlanması sistemik enfeksiyonların önlenmesi bakımından önemli katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Alt solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonlarından üretilen *P. aeruginosa* suşlarında virülans faktörlerin üretimlerini ve virülans genlerini araştıran Rumbaugh ve arkadaşları, idrar yolu ve yara izolatlarında ekzotoksin A ve ekzoenzim S düzeylerinin daha yüksek oranda olduğunu rapor etmişlerdir (98). Kernacki ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın neden olduğu korneal enfeksiyonda invivo olarak pseudomonal proteazların olup olmadığını saptamak ve önceki çalışmalarda kullanılan sıçan türlerinin pürifiye proteazlara karşı mononükleer antikor cevabı oluşturup oluşturmadıklarını amaçladıkları çalışmada, *P. aeruginosa* ile oluşturulan korneal enfeksiyonda alkali proteaz pozitifliği gözlenirken elastazın tesbit edilemediğini bildirmişlerdir. Daha önce yapılan bakteriyel çalışmalarda gözde bakteri sayısının en çok yükseldiği zamanda alkali proteaz aktivitesinin de pik yaptığı ve gözlerin steril denebilecek durumunda olduğu zamanlarda aktivitenin olmadığı rapor edilmiştir. C57 BL/6J sıçanları her iki proteazın mikrogram düzeylerine karşı, sadece adjuvanla birlikte verildiğinde ancak mononükleer antikor cevabı oluşturabilmişlerdir. Kullandıkları çalışma modelinde invivo enfeksiyon sırasında elastaz değil, aktif alkali proteaz korneal

dokularda gösterilmiştir. Bu proteazların konsantrasyonları bir antikor cevabı oluşturmak için gereken düzeyden çok daha düşük bulunmuştur (101).

Howe ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada proteaz üretemeyen defektli *P. aeruginosa* suyunun (PA103) travmatize edilmiş sıçanın korneasında kolonize olmadığı ve hasar oluşturmadığını göstermişlerdir. Bunun aksine aynı *P. aeruginosa*'nın parental (mutant olmayan) kökenleri ile enfeksiyon oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca mutant suşla birlikte düşük dozda alkali proteaz verildiğinde parental suşun neden olduğu enfeksiyonda oluşan hasardan ayırtedilemeyecek kadar bir kornea hasarının oluştuğunu saptamışlardır (18,102, 103).

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu virülans faktörlerinin tümünün *P. aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından üretildiğini, ancak izole edildiği vücut bölgesine göre üretim miktarları arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada alkali proteaz üretimi balgam, yara, kan ve idrarda saptanmıştır. Ancak vücut bölgeleri açısından birbirine yakın değerler elde edilmiştir. Bu konunun daha iyi aydınlatılabilmesi için geniş serili çalışmaların yapılması gereklidir.

P. aeruginosa proteazlarının patojenite üzerine olan etkilerini saptamak için değişik hayvan modelleri oluşturularak yapılan çalışmalarda, proteazların (elastaz ve alkali proteaz) immünoglobulinler, interferon, kompleman komponentleri, IL-1, IL-2 ve TNF salınımını etkileyerek konak savunma sistemlerine karşı olumsuz etki yaptığı anlaşılmıştır. Ayrıca proteazların Polimorf Nüveli lökosit (PMNL) kemotaksisini, Doğal öldürücü hücre (NK) fonksiyonunu ve T lenfosit fonksiyonunu inhibe ettiği deneysel olarak gösterilmiştir (104).

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 indüklemediğini 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 (ERK1/2: extracellular signal-regulated proteins)

fosforilasyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Tavşan primer alveolar Tip II epitelyal hücrelerin primer kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Pseudomonas elastazının* 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 (105).

Hamood ve arkadaşları konağın durumu ile *P. aeruginosa'nın ürettiği* elastaz, fosfolipaz C, toksin A ve exoenzim S gibi farklı ekstraselüler virülans arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, trakeal, idrar yolları ve yara enfeksiyonlarından elde edilen 105 üriner *P. aeruginosa* izolatında, izolasyon yerlerine bağlı olarak üretilen virülans faktörlerinde değişiklikler olduğunu göstermişlerdir. Trakeal, idrar yolu ve yaradan elde edilen izolatların çoğunda elastaz ve fosfolipaz C, yara izolatlarında toksin A, yara ve idrar yolu izolatlarında ise ekzoenzim seviyelerinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *P. aeruginosa* ile oluşan persistan enfeksiyonlarda exotoksin S üretimi yüksek düzeyde bulunmuştur (106).

Döring ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kronik akciğer hastalığı olan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında proteaz üretiminin %93 oranında olduğu bildirilmiştir (107).

Tüç ve Yağcı'nın çalışmasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %96'sında proteaz üretimi saptanmıştır (108).

Bizim çalışmamızda da fark anlamlı olmamakla birlikte en yüksek alkali proteaz değerleri balgam örneklerinde saptanmıştır.

Jaffar-Bandjee ve arkadaşları *Pseudomonas aeruginosa* ile kronik enfekte olan hastalarda pulmoner alevlenmeler sırasında balgamda elastaz, exotoksin A ve alkali proteaz sekresyonlarının takip edilerek ve KF'li hastalardaki alevlenmelerle bu ekzoproteinlerin seviyeleri arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırdıkları çalışmada 12 ile 20 gün arasında hastanede yatış gerektiren bir veya birkaç alevlenme periyodu boyunca takip edilen 18 hastanın tamamının bronşiyal sekresyonlarında *P. aeruginosa* izole edilmiştir. Tedaviden sonra ise eradike edilememiştir. *P. aeruginosa* dansitesinin antibiyotik

tedavisinden sonra anlamlı olarak azaldığını, fakat vakaların çoğunda balgamda 10^6 CFU/gr'dan fazla bakteri kaldığı bulunmuştur. Total olarak homojenize edilmiş bronşiyal sekresyonlarda immünoenzimatik ölçümlerle *P. aeruginosa* exoproteinleri anlamlı miktarlarda olduğu gösterilmiştir. Başlangıçta exoproteinlerin en yüksek seviyelerinin ortaya çıkarılması, tedaviden sonraki anlamlı düşüş ve ataklar arasındaki faz boyunca exoproteinlerin yokluğu *P. aeruginosa*'nın alevlenmeler boyunca yenilenen virulans hakkında tartışmaya kapı açmıştır. Bununla birlikte inflamatuvar sürecin başlangıcında bakteri miktarında ve immün kompleks oluşumunda meydana gelen değişikliklerin de pulmoner alevlenmelere sebep olabileceği bildirilmiştir (109).

Değişik çalışmalar kronik *Pseudomonas aeruginosa* akciğer enfeksiyonundan şikayetçi olan kistik fibrozisli hastaların serumlarında patojen tarafından üretilen ekstrasellüler enzimler olan alkalin proteaz, elastaz ile ekzotoksin A ve alginatı da içeren diğer antijenlere karşı spesifik antikorların varlığını göstermişlerdir (110-112).

Kistik fibrozisli hastaların çoğunda *Pseudomonas aeruginosa*'nın mikrokoloniler şeklinde kalıcı olmasını sağlayan yapışkan poliuronik asit tabakası bulunur. *P. aeruginosa* antikor titresini ile akciğer hastalığının ciddiyeti arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu da kistik fibrozisli hastalardaki *P. aeruginosa*'ya karşı oluşan artmış immün cevabın pulmoner hasarla ilişkili olduğunu gösterir. Kronik hastaların hemen hepsinde yıllar içinde *P. aeruginosa* antijenlerine karşı immün cevabın yıllar içinde artması bunların üretiminin persistan enfeksiyon sırasında da azalmadığını gösteriyor. Antikor titrelerinin bir plato yapıp ondan sonra nadiren düşmesi, bakteriyel antijenlerin üretiminin ve bunlardan dolayı humoral immün sistem stimülasyonunun da devamlı olduğunu gösteriyor.

KF'li hastaların büyük çoğunluğunda serumda elastaz ve/veya alkalin fosfataza karşı spesifik antikorların bulunması (%83-89) kistik fibrozislilerde bu enzimlerin in vivo üretiminin ortak olduğunu gösterir. Bu yüzden bu enzimler hastalığın patogeneze katkıda bulunuyor olabilirler. Exotoksin A ve elastazın *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulansındaki rolleri kronik akciğer enfeksiyonlu ratlarda gösterilmiştir (107, 113-116).

Amitani ve arkadaşları kronik bronşiyal enfeksiyonlu hastalarda epitelyal hasar gözlemleyerek nötrofil elastaz ve *Pseudomonas aeruginosa* elastazının mukosilyer temizlemenin gecikmesine katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (117).

Bu bulgu *P. aeruginosa*'nın kistik fibrozisli hastaların akciğer yüzeylerinde sadece zararsız bir kolonizasyon yapmadığını göstermektedir. Fakat kistik fibrozisli hastalarda kolonize olan *P. aeruginosa*'nın patojen olmasının sebepleri ve patojenitenin arkasındaki mekanizmalar net değildir. Kistik fibrozisli hastaların yaşam sürelerinin uzatılması ve kalitelerinin yükseltilmesini sağlayacak önleyici ve küratif stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmak için kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu sırasında meydana gelen alevlenmelerin patogenezi hakkında detaylandırılmış ortak bir fikir oluşturulabilir (109,117).

Tüm bu çalışmalar, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların patogenezinde proteazların önemli rol oynadığını göstermektedir.

Pyosiyanin (PCN) *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan mavi renkli pigment olup, memeli ve bakteriyel hücreleri öldürebilen redox-aktif fenazin bileşiğidir. *Pseudomonas* türleri arasında sadece *P. aeruginosa* PCN üretmektedir (118).

PCN, *P. aeruginosa* ile enfekte KF'li hastaların balgamlarında büyük oranda tesbit edilebilmektedir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen pek çok virülans faktör arasında PCN'nin tesbitinde yaşanan zorluklar nedeniyle bu pigmentin çoğul hücrel fonksiyonları ile ilişkisi invitro çalışmalarla gösterilmesine rağmen klinik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir (119).

Bu nedenle PCN'nin varlığı yada yokluğu *P. aeruginosa*'nın tanısında ve sınıflandırılmasında anahtar rol oynar (120, 121). PCN çeşitli farmakolojik preparat çalışmalarında nitrik oksit (NO) antagonisti olarak görev alır. Ayrıca ökaryotik ve prokaryotik hücreler üzerine çeşitli farmakolojik etkileri vardır (122). Pyosiyanin bazı suşlarda, membranlarda elektron transfer birimi olarak işlev görür. Elektron transfer birimi ve fosforilasyonda katalizör rolü oynayan PCN mikroorganizmalarda ve yeşil bitkilerin fotosentetik sisteminde önemli yere sahiptir. PCN uygulamaları üzerine mevcut bilgiler sınırlı olup, elektrokimyasal

ve spektrofotometrik olarak yapılan çalışmalarda PCN'nin flavinler için iyi bir model olduğu gösterilmiştir (123).

Aynı zamanda PCN'nin solunumsal epitelial hücrelerde silial fonksiyonları inhibe ettiği saptanmıştır (124, 125).

Hassett ve arkadaşlarının *P. aeruginosa*'nın PCN'ye karşı gösterdiği direnç mekanizmasına yönelik yaptıkları çalışmada NADPH eksikliğinde endojen PCN'nin redoks döngüsünün sınırlandığını, *P. aeruginosa* tarafından pyosiyanın alınımının yavaş olduğunu ve pyosiyojenik koşullarda düşük seviyede NADPH'ın oksijen redüksiyon türlerinin oluşumunu sınırlandırabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmayla düşük fosfatlı ortamda organizmanın büyüyerek pyosiyanın ürettiğini ve katalaz aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (126).

Ancak bu fırsatçı patojenin oksidatif strese karşı koyma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için gelecekte *P. aeruginosa*'da süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz genlerinin klonlanması ve genetik analizlerini içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Reszka ve arkadaşları mikroperoksidaz 11 yada hemin gibi peroksidazların varlığında pyosiyanınin H_2O_2 tarafından oksidasyona uğratıldığını saptamışlardır. Pyosiyanın oksidasyonu geriye dönüşümsüzdür. Bu durum oksidasyon esnasında fenazine kromofor pigmentlerinin büyük oranda şekil değiştirdiğini göstermektedir. İnsan alveolar epitelial A549 hücrelerinde okside olmamış pyosiyanın, okside olmuş pyosiyanın aksine NADH oksidasyonunda ve İL-8 salınımında daha etkin olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma ile pyosiyanınin biyolojik sistemlerde ikili rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Birinci rol oksidan ve reaktif oksijen türlerinin (ROS: reactive oxygen species) üretimi, ikincisi ise peroksidaz için bir substrat olarak H_2O_2 tüketiminde oynadığı roldür. İkinci özellik pyosiyanınin indirgenmesi ve inaktivasyonuna yol açabilir (127).

P. aeruginosa'nın patogeneğinde biyofilm oluşturma özelliği önemli rol oynar. Biyofilm oluşumu bakterinin katı yüzeye tutunması ile başlar. Bu aşamayı takiben bakteri bir taraftan hızla çoğalmaya diğer taraftan ekzopolisakkaritten ibaret bir kılıf oluşturmaya başlar. Bu şekilde mikrokoloniler oluşturur. Mikrokoloniler arasında porlar ve borucuklar vasıtasıyla devamlı bir sıvı akışı mevcuttur. Mikrokolonilerin birbiri üzerine eklenmesi ile biyofilm kalınlaşır.

Biyofilmi oluşturan bakteriler fenotipik ve metabolik olarak değişime uğradıkları için çevre koşullarına ve antibiyotiklere dirençli hale gelir. *P. aeruginosa*'da QS sisteminin adezyonda ve mikrokolonilerin oluşumunda da rolü olduğu belirlenmiştir (67).

QS sisteminden defektli mutantların oluşturduğu biyofilmlerin, sokak suşu tarafından oluşturulan biyofilmlere göre daha gevşek ve sağlam olmayan bir yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Mutant biyofilmlerin, hidrojen peroksida daha hassas oldukları, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin azaldığı ve nötrofillere hassasiyetlerinin arttığı gözlemlenmiştir (41).

Gram negatif ve yaygın olarak serbest yaşayabilen bir bakteri olan *P. aeruginosa* nemli ortamları sever ve bitki, böcek, hayvan ve insanları enfekte eder (128).

Bu bakteri immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşturduğu enfeksiyonlarda fırsatçı patojen olarak mükemmel bir modeldir ve bazı durumlarda fatal seyreden hastalıklara neden olabilmektedir. Normal deri yada mukoza yapısı bozularak koruyuculuğunu kaybettiğinde, immün sistem mekanizmaları kırıldığında, normal bakteriyel floranın koruyucu işlevi geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi esnasında bozulduğunda ve hastane ortamında bir kısım cerrahi girişimler gibi olumsuzluklar fırsatçı olan bu patojenin enfeksiyon oluşturmaya zemin hazırlar (129). Bu patojenin oluşturduğu enfeksiyonlar özellikle kistik fibrozisli hastalarda yaygındır. Bu hastaların hemen hemen tamamında *P. aeruginosa* enfeksiyonu gelişir, ve bu hastaların % 90'ından fazlasının ölümüne neden olmaktadır (130).

P. aeruginosa biyofilmleri ölü doku üzerinde ve tıbbi cihaz uygulamalarında kullanılan malzeme üzerinde gelişebilir. O'Toole ve Kolter tarafından yapılan bir çalışmada biofilm oluşumunda flajella ve titreşim hareketinin (twitching motility) ilk adım olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada hareketsiz ve flajella üretimi defektif olan mutantlar kullanılmış olup, tek tabakalı bir biofilm formu oluşturmak için, bu mutantların polivinilklorit yapısında plastik (PVC: polyvinylchloride plastic) yüzeye yapışma kabiliyetinde büyük oranda azalma saptamıştır. Diğer bir mutant sınıfı olan Tip IV pili üretim defekti olan mutantlarda ise tek tabaka halinde biofilm oluşumu gözlenmiştir. Ancak bu

mutantlarda mikrokoloni olarak adlandırılan küçük bakteri hücresi toplulukları birikmemiştir. Bu bulgular ışığında biofilm oluşumunun flajella bağımlı olduğu ve tek hücre tabakası oluşumu için bir yüzey gerektiği anlaşılmıştır. Tek hücre tabaka üzerindeki tek hücrelerin kümeleşerek mikrokoloniler oluşturmasının ise Tip IV pililer ve titreşim hareketi (twitching motility) aracılığıyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (86).

Biofilm oluşturulmasında yapışma anında bakterilerde ani hareketlenme başlar. Bu sayede karmaşık kanal sistemlerinden oluşan tam olgun biofilm yapıları oluşturabilir. Bu tabakada mevcut olan bu kanal sistemleri aracılığıyla en dipteki bakteriler bile beslenme imkanı bulurlar. Yüksek molekül ağırlıklı alginat polimerleri ve büyük olasılıkla biofilm gelişiminin erken dönemlerindeki mikrobial DNA, *P. aeruginosa* hücrelerinin matriks içinde etkin olarak kalmasını sağlar (131). Buna rağmen biofilm olgunlaştığında bunu hücrelerin büyük hücre kümelerinden ayrılma süreci izler. Ana biofilm odağından hücreler yayılarak yüzeye tekrar yapışırlar. Bu şekilde olgun biofilm formunda, biofilm artışı kolaylaşır. Bu büyük çaplı ayrılma işlemine hidrodinamik akım ve/veya alginat liyaz (*algL* geni tarafından kodlanır) artışı gibi pseudomonal programlı cevaplar aracılık edebilir. Bu enzim alginatı yıkma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle biofilm yumuşamasını ve dağılmasını indükleyebilir (132).

Ayrılma işleminin aynı zamanda büyük mantar şeklindeki hücre kümelerinin merkez bölgesinden hareket eden tek hücreler halinde olduğu gösterilmiştir (133). Bu hareketli hücreler küme bölgesinden yüzüyor gibi hareket ederler. Çevreleri hareketsiz hücreler tarafından sarılıdır. Yapışma ve biofilm oluşumunun gözlenmesi olayın tamamını ifade etmez. Başka bir çalışmada artmış biofilm oluşumunun ardından ayrılma gerçekleştiği, takiben tekrar küme ve biofilm oluşumu gerçekleşerek döngünün devam ettiği bildirilmiştir (134).

Schaber ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada idrar örneklerinden elde edilen suşlarda pyosiyanın üretimini ve biofilm oluşumunun, yara ve alt solunum yolu izolatlarına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (79).

Bizim sonuçlarımızda da idrar örneklerinden üretilen suşlarda pyosiyanın ve biofilm düzeyleri diğer vücut bölgelerine göre daha yüksek bulundu. Suşların çoğu kısa zincirli sinyal molekülü üretmemelerine rağmen pyosiyanın ve biofilm

oluşumu gibi virülans faktörleri üretebilmişlerdi. *P. aeruginosa*'da hem las B hem de PCN üretimi QS tarafından kontrol edilir. Benzer bir şekilde biofilm oluşumu için de QS gereklidir. Yetersiz QS mekanizmalarına rağmen idrar örneklerinde PCN ve biofilm başlatım mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Bu faktörlerin yanı sıra QS tarafından kontrol edilen rhamnolipid, alkalen fosfataz ve lektinleri de içine alan faktörlerin üretimlerinin incelenmesi böyle bir mekanizmanın anlaşılmasında anahtar rol oynayacaktır.

Tınaz ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 50 *P. aeruginosa* suşunun *Chromobacterium violaceum* CV026 suşuna karşı reaksiyon gözlenmediği, buna karşın *Agrobacterium tumefaciens* NT1 indikatör suşuna karşı tüm kökenlerde pozitif reaksiyon gözlendiği bildirilmiştir (93).

Bizim çalışmamızda 100 *P. aeruginosa* suşundan 29'unda kısa zincirli üretim gözlenmiştir. Suşların çoğunda CV026 suşuna karşı cevabın olmaması kısa zincirli AHL moleküllerinin olmadığını yada çok düşük düzeylerde olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlarımız *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin enfeksiyonlarda üretiminde daha komplike sistemlerin devrede olabileceğini düşündürmektedir. Ürettiğimiz suşlar hastane ortamında enfeksiyon oluşturan suşlardır ve bu suşlar çoğunlukla virülans faktörlerini önemli düzeylerde üretebilmektedirler. Bu suşların tamamında uzun zincirli sinyal moleküller saptanmıştır. Ancak suşların 29'unda kısa zincirli sinyal molekülü saptanmıştır. Bu durum virülans faktörlerin kontrolünün ya QS sistemi tarafından zayıf olarak kontrol edilmesinden, ya QS dışında rol oynayan diğer kontrol mekanizmalarından ya da in vivo ortamda indüklenen ve henüz keşfedilmemiş faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Eğer QS sistemi enfeksiyon oluşumunun temelini oluştursaydı izolatların çoğunun QS defektif olmaması gerekirdi. Diğer taraftan QS tarafından kontrol edilmeyen virülans faktörleri, QS bağımlı olanların kaybını kompanse edebiliyorsa QS defektif suşlar enfeksiyon oluşturabilir.

Bulgularımızda elastaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kan ve balgam izolatlarında kısmen yüksek bulundu. Benzer şekilde alkali proteaz seviyeleri kan, balgam ve yara örneklerinde daha yüksekti.

Buna karşın idrar örneklerimizde pyosiyenin üretimi ve biofilm oluşumu kan,

balgam, yara örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Kulak akıntısı, katater ve trakeal aspirasyon örneklerimizde ise biofilm düzeyleri idrar örneklerine yakın değerlerde yüksek olarak bulundu. Ancak bu örneklerimizde az sayıda izolatta çalışma yapıldı. Sağlıklı sonuç ve yorumlar açısından daha fazla örnek üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Suşların tümü uzun zincirli sinyal molekülünü üretirken, 29 izolatta kısa zincirli sinyal molekülü üretimi gösterilmiştir. Kısa zincirli sinyal molekülü üreten suşlara ait elastaz, alkalen proteaz değerleri üretmeyen veya az seviyede üreten suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Pyosiyanin değerleri de daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildi.

QS sistemi, bakterilerin çevrelerindeki kendi türlerine ait bakteri topluluğunun yoğunluğunu saptamasına yarayan ve bunun sonucunda özellikle virülans faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonuna neden olması nedeniyle, özellikle invazyon kabiliyeti olan patojenlerin virülans ve patojenitesinde önemli rol oynamaktadır. QS sisteminin bakteri virülansı üzerinde önemli etkileri olup *P. aeruginosa*'da multipl regülasyonunda rolü büyüktür. Buna ek olarak *P. aeruginosa* tarafından 3O-C₁₂-HSL molekülünün üretiminin sadece bakteriler arasında hücreden hücreye haberleşmede değil aynı zamanda direkt olarak bir virülans faktör gibi de rol oynadığı gösterilmiştir. AHL nin ökaryotik hücrelerdeki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen eldeki sonuçlar 3O-C₁₂-HSL nin multipl hücre tiplerinde aktive olabildiği ve böylece *P. aeruginosa* enfeksiyonu esnasında konak cevabında değişiklikler oluşturduğu açıklanmıştır. Bu yüzden QS sisteminin düzenleyici rolü ve AHL nin üretimi *P. aeruginosa*'nın patogenezinde multipl rol oynayabildiğinden önemi kabul edilmelidir. Pek çok patojen için QS sisteminin halen çözümlenmemiş olmasına rağmen, QS sistemini hedef alan terapötik ajanlar, gelecekte enfeksiyonların tedavisinde ve proflaksisinde alternatif bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

ÖZET

P. aeruginosa, gram negatif fırsatçı bir patojen olup bitki, hayvan ve insanlarda ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu organizma nazokomial enfeksiyonların major bir nedenidir ve başta kistik fibrozis olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonlarından sorumludur.

P. aeruginosa'nın patojenitesi hücre ile ilişkili alginat, pili ve lipopolisakkarit, proteazlar (elastaz, alkalen proteaz ve LasA proteaz), hemolizinler (rhamnolipid ve fosfolipazlar), toksinler (ekzoenzim S ve ekzotoksin A) ve pyosiyenin gibi hücre dışı virülans faktörlere bağlı olup multifaktöriyeldir. Bu virülans faktörlerin çoğunun ekspresyonu iki N-acyl-L-homoserin lakton (AHL) bağımlı hücreler arası haberleşme sistemi tarafından gerçekleştirilir.

Çeşitli virülans faktörlerinin kontrolü QS sistemi ile gerçekleştiğinden, bu sistemlerden biri veya her ikisinin kaybı durumunda *P. aeruginosa*'nın insanlarda enfeksiyon oluşturma kabiliyetinde önemli ölçüde azalma mümkün olabilmektedir.

Bu çalışma ile insanlarda enfeksiyona neden olan QS-yetersiz suşlar, bu suşların var olup olmadığı ve spesifik enfeksiyon tipleri ile virülans faktörleri arasındaki ilişkileri tanımlamak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden (idrar (n=30), kan (n=21), yara (n=19), balgam (n=16), kulak akıntısı (n=7), kateter (n=4)) izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya alınmıştır. Bakterinin virülansında önemli rol oynadığı kabul edilen elastaz, alkali proteaz, pyosiyenin ve biofilm oluşumu gibi faktörlerin kantitatif ölçümleri yapılmıştır. *P. aeruginosa*'nın virülansında rolü olan determinantların bir çoğunun üretimini kontrol eden QS sisteminde yer alan uzun zincirli ve kısa zincirli sinyal moleküllerini üretebilen suşlar saptanmıştır.

Çalışmamızda balgam ve kan örneklerinden elde edilen suşların elastaz aktivitesi (sırasıyla 0.499 ± 0.35 , 0.46 ± 0.396) diğer lokalizasyonlara ait suşlara göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır.

İdrar örneklerinin pyosiyenin değerleri ($0,0691 \pm 0,0654$), kan, yara ve balgam izolatlarına göre (sırasıyla $0,0656 \pm 0,0614$, $0,0488 \pm 0,0415$, $0,0492 \pm 0,0363$) daha yüksek bulunmuştur. Yine idrar izolatlarının biofilm oluşum düzeyi

(0,719 ± 0,441), kan, yara, balgam izolatlarındaki değerlerden (sırasıyla 0,414 ± 0,265, 0,467 ± 0,31, 0,403 ± 0,447) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır.

Suşların tümü uzun zincirli sinyal molekülünü üretirken, 29 izolatta kısa zincirli sinyal molekülü üretimi gösterilmiştir. Kısa zincirli sinyal molekülü üreten suşlara ait elastaz, alkalin proteaz değerleri üretmeyen veya az seviyede üreten suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Pyosiyanin değerleri de daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildi. Biofilm değerlerinde ise kısa zincirli sinyal molekülü üretimi arasında pozitif bir bağlantı gözlenmedi. Bu durum idrar, katater gibi daha fazla biofilm oluşumunun sözkonusu olduğu örnek sayısının azlığından kaynaklanabileceği gibi, QS sistemi dışında daha etkin başka mekanizmaları düşündürülebilir.

QS sistemi, bakterilerin çevrelerindeki kendi türlerine ait bakteri topluluğunun yoğunluğunu saptamasına yarayan ve bunun sonucunda özellikle virülans faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonuna neden olması nedeniyle, özellikle invazyon kabiliyeti olan patojenlerin virülans ve patojenitesinde önemli rol oynamaktadır. QS sisteminin bakteri virülansı üzerinde önemli etkileri olup *P. aeruginosa* da multipl regülasyonunda rolü büyüktür. QS sisteminin halen çözümlenmemiş olmasına rağmen, QS sistemini hedef alan terapötik ajanlar, gelecekte enfeksiyonların tedavisinde ve proflaksisinde alternatif bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda uzun zincirli sinyal moleküllerinin tüm suşlarda üretilmiş olması QS sisteminin bakteri virülansı ve patojenitesindeki rolünü göstermektedir. Kısa zincir ürettiği saptanan suşlarda elastaz, alkalin proteaz ve pyosiyanin üretimlerinin üretmeyen suşlara göre daha yüksek bulunmuş olması QS sisteminin suşları daha virülan hale getirebildiğini ve patojenitede önemli rol oynadığını göstermektedir.

SUMMARY

The gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen. This organism is a major cause of nosocomial infections and it is especially responsible for chronic lung infections that plague most cystic fibrosis patients.

The pathogenicity of *P. aeruginosa* depends on multiple cell-associated factors such as alginate, pili, and lipopolysaccharide, and on extracellular virulence factors including proteases (elastase, alkaline protease, and LasA protease), hemolysins (rhamnolipid and phospholipase), and toxins (exoenzyme S and exotoxin A). Expression of many of these virulence factors is controlled by two N-acyl-L-homoserine lactone (AHL)-dependent cell-cell communication systems, which are utilized by *P. aeruginosa* to monitor its own population density in a process known as quorum sensing.

Because of the control of the virulence factors due to QS system; in human infectious capability of *P. aeruginosa* can be decreased markedly in lack of one or both of these two system component. The aim of this study is to determine whether there are QS insufficient subspecies that are infective for humans, and to identify the relations between specific infection types and virulence factors.

100 *P. aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens including urine (n=30), blood (n=21), wound (n=19), sputum (n=16) ear discharge (n=4) and catheter (n=4) were used in our study. Quantitative measurements (analysis) of elastase, alkaline protease, pyocyanin and biofilm formation were done. Strains were investigated to produce long and short chain signal molecules taken part in QS system.

In our study the elastase activities of the subspecies isolated from the sputum and blood specimens (0.499 ± 0.35 , 0.46 ± 0.396 , respectively) were detected higher than those of the subspecies isolated from other localizations.

The pyocyanin values of the urine specimens (0.0691 ± 0.0654) were detected higher than those of blood, wound and sputum isolates (0.0656 ± 0.0614 , 0.0488 ± 0.0415 , 0.0492 ± 0.0363 , respectively). The high biofilm formation level of the urinary isolates (0.719 ± 0.441) were statistically significant when

compared to the values of the blood, wound and sputum isolates (0.414 ± 0.265 , 0.467 ± 0.31 , 0.403 ± 0.447 , respectively).

All of the subspecies produced long chain signal molecule where as, only 29 isolates were shown to produce short chain signal molecule. The elastase and alkalene protease values of short chain signal molecule producing subspecies were high and the differences were statistically significant. Although pyocyanin values were also found to be higher, the differences were not statistically significant.

QS system plays an important role in virulence and pathogenicity of the pathogens especially capable of invasion, since it causes expression of the genes helping the bacterias determine the density of the bacterial community of their own species in their environment and consequently coding especially the virulence factors. QS system has important effects on bacterial virulence and its major role is in multiple regulation of *P. aeruginosa*. Although the QS system is not clarified since thoroughly, therapeutic agents targeting the QS system seems to be an alternative choice for the treatment and prophylaxis of the infections.

In our study the production of long chain signal molecules in all of the strains shows the role of the QS system in bacterial virulence and pathogenicity. The productions of elastase, alkalene protease and pyocyanin in short chain signal molecule producing strains were higher than those in strains which cannot produce short chain signal molecule. These results suggested that QS sistem may be made the strains much virulent and plays an important role in pathogenicity.

KAYNAKLAR

1. 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. Jan 15;230 (1):27-34. 2004.
2. Geisenberger O, Givskov M, Riedel K, Hoiby N, Tummeler B. & Eberl, L. Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett 184, 273–278. 2000.
3. Reszka KJ, O'malley Y, McCormick ML, Denning GM and Britigan BE. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 36, No. 11, pp. 1448 – 1459, 2004.
4. Miller MB & Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 55, 165–199. 2001.
5. de Kievit TR & Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun 68, 4839–4849. 2000.
6. Rumbaugh KP, Griswold JA. & Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect 2, 1721–1731. 2000.
7. Smith RS. & Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 6, 56–60. 2003.
8. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, Mitchell I. & Storey DG. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun 70, 1783–1790. 2002.
9. Storey DG, Ujack EE. & Rabin HR. Population transcript accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase in sputa from patients with cystic fibrosis. Infect Immun 60, 4687–4694. 1992.
10. Storey DG, Ujack EE., Mitchell I & Rabin HR. Positive correlation of algD transcription to lasB and lasA transcription by populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun 65, 4061–4067. 1997.
11. Storey DG, Ujack EE, Rabin HR & Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. Infect Immun 66, 2521–2528. 1998.
12. Wu H, Song Z, Hentzer M. & 8 other authors. Detection of Nacylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 146, 2481–2493. 2000.
13. Geisenberger O, Givskov M, Riedel K, Hoiby N, Tummeler B & Eberl L. Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett 184, 273–278. 2000.
14. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ. & Greenberg, E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407, 762–764. 2000.
15. 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 68, 4331–4334. 2000.

16. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH. & Hamood AN. Journal of Medical Microbiology 53. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infect Immun 67, 5854–5862. 1999.
17. Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB. & Prince A. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect Immun 64, 37–43. 1996.
18. Wu H, Song Z, Givskov M, Doring G, Worlitzsch D, Mathee K, Rygaard J. & Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. Microbiology 147, 1105–1113. 2001.
19. Brooks GF, Butel JS, Omsron JN. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA *Pseudomonads, Acinetobacters & Uncommon Gram-Negative Bacteria*, Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 20. Edition Appleton and Lange, Connecticut. s. 218-23. 1995.
20. Erdem B. *Pseudomonaslar*. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö: Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitabevi , 551-8. 1999.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Shreckenberger PC, Winn WC. The Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Shreckenberger PC, Winn WC. (eds) : Diagnostic Microbiology. 4th ed. Philadelphia, : JB Lippincott Company. 185-242. 1992.
22. Finegold SM, Baron EJ. Non fermentative Gram- negative bacilli and coccobacilli. In: Finegold SM., Baron EJ.(eds) : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology . 7th ed. St Louis, Missouri : Mosby Company. 422-33. 1986
23. Bilgehan H. Non-fermentatif gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı. İzmir : Baris Yayınları. 161-80. 1996.
24. Hall GS: Nonfermenting Gram Negative Bacilli and Miscellaneous Gram Negative Rods. Mahon and Manuselis Jr (eds) Textbook of Diagnostic Microbiology. WB Saunders Company Philadelphia. 513-38. 1995.
25. Lory S: *Pseudomonas* and other Nonfermenting Bacilli. Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg (eds) Microbiology Fourth Edition, JB Lippincott Company, Philadelphia 595-600. 1990.
26. Pollack M: *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell, Douglas and Bennett (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone Inc. New York, 1673-91. 1990.
27. Pollack M: *Pseudomonas aeruginosa* and Related Bacteria, Gürbäch S.L, Bartlett J.G, Blacklow N. R., Infectious Diseases P 1824 2 th ed. 1998.
28. Pollack M: *Pseudomonas aeruginosa* , Mandell G, Douglas G , Bennett J (eds) : Principles and Practice of Infectious Disease, P 1980, 4 th ed. Churchill Livingstone Inc. New York, 1995.
29. Gerçek A: *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörlerinin akut ve kronik enfeksiyonların patogeneziindeki rolleri, Türk Mikrobiyoloji Cem. Derg.22:92. 1992.
30. Çiragil P, Söyletir G. Çeşitli Vücut bölgelerinde izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aljinat, elastaz, ve alkaliproteaz üretimleri. Mikrobiyoloji Bülteni. (38) 4: 341-348. 2004.
31. Vazquez F, Mendoza MC, Villar MH, Vindel A, Mendez F.J. Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strain causing septicemia in a Spanish Hospital 1981-1990, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 698. 1992.
32. May TB, Chalcrabarty AM: Isolation and Assay of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate, Methods in Enzymology Vol 235 : 294. 1994.

33. 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 509-19. 1995.
34. Stewart-Tull DES and Armstrong AV. The effect of 1-hydroxyphenazine and pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* on mammalian cell respiration. J. Med. Microbiol. 5:67-73. 1972.
35. Wilson RT, Pitt G, Taylor D, Watson J, MacDermot D, Sykes DR and Cole P. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. J. Clin. Invest. 79:221-229. 1987.
36. Sorenson RU, Klinger JD, Cash HA, Chase PA and Dearborn DG. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. Infect. Immun. 41:321-330. 1983.
37. Schoental R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea* cultures. Br. J. Exp. Pathol. 22:137-147. 1941.
38. Hassan HM and Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. J. Bacteriol. 141:156-163. 1980.
39. Salyers AA, Whitt DD: Bacterial pathogenesis. A molecular approach ASM Press, Washington DC. 260-70. 1994.
40. Tuncer S, Akova M: Pseudomonas aeruginosa infeksiyonları. Flora 1:61-5. 1997.
41. Çakar A. Bacterial Communication "Quorum-sensing": Mikrobiyol bült 38: 273-284. 2004.
42. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. J Infeel 46: 207-214. 2003.
43. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP: Quorum-sensing in bacteria: LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 176: 269-275. 1994.
44. Swift S: Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. Adv Microb Physiol 45: 199-270. 2001.
45. Redfield R: Is quorum-sensing a side effect of diffusible sensing? Trends Microbiol 10: 365-370. 2002.
46. Smith RS, Kelly R, Barbara, Iglewski BH and Phipps RP. The *Pseudomonas* Autoinducer *N*-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E₂ Production in Human Lung Fibroblasts: Implications for Inflammation. *The Journal of Immunology*. 169: 2636-2642. 2002.
47. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol, 55: 165-199. 2001.
48. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP: Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl homoserine lactone quorum sensing. Annu Rev Genet 35: 439-468. 2001.
49. Whitehead N, Bamard ML, Slater H, Simpson N, Saimand G: Quorum sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 25. 365-404. 2001.
50. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN: Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem 69: 183-215. 2000.
51. Pesci EC, Milbank JB, Pearson Jp, et al: Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 11229-11234. 1999.
52. Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM. SdiA of *Salmonella enterica* is a Lux R homolog that detects mixed microbial communities. J Bacteriol 183: 5733-5742. 2001.
53. Wither H, Swift S, Williams P: Quorum sensing as an integral component of gene

- regulatory Networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 186-193. 2001.
54. Kleerebezem M, Oudri L. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: A case of multicellular behavior. *Peptides*. 22: 1579-1596. 2001.
 55. Dunny GM, Leonard BAB. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 51: 527-564. 1997.
 56. Winser K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 291: 131-143. 2001.
 57. Seed PC, Passadar L, Iglewski BH: Activation of the *Pseudomonas aeruginosa las I* gene by Las R and *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177: 654-659. 1995.
 58. Gambella MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa las R* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173: 3000-3009. 1991.
 59. 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* 176: 2044-2054. 1994.
 60. Camara M, Williams P, Hardman A: Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial signaling. *Lancet Infect Dis* 2: 667-676. 2002.
 61. Smith RS and Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current opinion in microbiology*. 6: 56-60. 2003.
 62. Köhler T, Curty LK, Barja F: Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signalling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182: 5990-5996. 2000.
 63. Wutt I, Seng L, Givskov M. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *las I* and *rhlI* quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology* 147: 1105-1113. 2001.
 64. Tang HB, DiMango E, Bryan R. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64:37-43. 1996.
 65. Brint JM, Ohman D: Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of Rhl-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive Lux R-Lux family. *J Bacteriol* 177:7155-7163. 1995.
 66. 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* 43, 211-218. 1999.
 67. Shih P, Huang C. Effects of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrobiol Chemother* 49: 309-314. 2002.
 68. Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* 5: 254-258. 2002.
 69. Stickler D, Morris N, McLean R, Fuqua C: Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol* 64: 3486-3490. 1998.
 70. Saleh A, Figarella C, Kammouni W, Marchand-Pinatel S, Lazdunski A, Tubul A, Brun P. and Merten MD. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits expression of P2Y receptors in cystic fibrosis tracheal gland cells. *Infect. Immun.* 67. 5076-5082. 1999.
 71. Tellord G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT. The *Pseudomonas aeruginosa*

- quorum-sensing signal molecule N-acyl homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36-42. 1998.
72. Smith RS, Harris SG, Phipps R and Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation *in vivo*. *J. Bacteriol.* 184. 1132–1139. 2002.
 73. Andersen JB, Heydom A, Hentzer M, Eberl L, Molin S, Givskov M: *gfp* based N-acyl-homoserinelactone monitors for detection of bacteriBI communication. *Appl Environ Microbiol* 67: 575-585. 2001.
 74. Reese P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202: 58-61. 1986.
 75. Sperandio V, Mellies J, Nguyen W. Quorum sensing control of expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15196-15201. 1999.
 76. Lyon WR, Madden JC, Levin JC, Caparan MG: Mutation of LuxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 42: 145-157. 2001.
 77. Tateda K, Comte R, Pechere J, Köhler T, Yamaguchi K. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 45: 1930-1933. 2001.
 78. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al: Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 22: 3803-3815. 2003.
 79. Schaber JA, Nancy LC, McDonald NA, Eric D, Graham ED, Rajkumar C, Griswold JA and Hamood AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* 53, 841–853. 2004.
 80. Lanotte P, Mereghetti L, Lejeune B, Massicot P and Quentin R. *Pseudomonas aeruginosa* and Cystic Fibrosis: Correlation Between Exoenzyme Production and Patient's Clinical State. *Pediatric Pulmonology* 36:405–412.2003.
 81. Essar DW, Eberly L, Hadero A and Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol.* February; 172(2): 884–900. 1990.
 82. Hamood AN, Griswold J & Colmer J. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 3154–3160. 1996.
 83. Schad PA, Bever RA, Nicas TI, Leduc F, Hanne LF & Iglewski BH. Cloning and characterization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 169, 2691–2696. 1987.
 84. Woods DE, Schaffer MS, Rabin HR, Campbell GD, Sokol PA. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J Clin Microbiol* 24:260–264. 1986.
 85. Cox CD. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun.* April; 52(1): 263–270. 1986.
 86. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295–304. 1998.
 87. O'Toole GA & Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28. 449–461. 1998.
 88. Deziel E, Comeau Y & Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and

- highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183, 1195–1204. 2001.
89. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703–3711. 1997.
 90. Shaw PD, Ping G, Daly SL, Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6036–6041. 1997.
 91. Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 1119–1129. 1998.
 92. Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L. Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J. Microbiol. Methods* 44, 239–251. 2001.
 93. Boşgelmez-Tınaz G, Ulusoy S, Arıdoğan B, Eroğlu F, Kaya S. N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiological Research (Basımda)*. 2005.
 94. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L. & Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147, 2659–2669. 2001.
 95. Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., Preston, M. J., Grout, M., Evans, D. J. & Pier, G. B. Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 2288–2294. 1996.
 96. Hamood AN, Griswold JA & Duhan CM. Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. *J Surg Res* 61, 425–432. 1996.
 97. Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW & Wiener-Kronish JP. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 183, 1767–1774. 2001.
 98. 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* 43, 211–218. 1999.
 99. Janda MJ, Botione EJ : *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool, *J Elin Microbio* 17: 55. 1981.
 100. Janda MJ, Atangnomo S, Botlone RJ, Desmond E.P, Correlation of proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* with site of isolation, *J Clin Microbiol* 10 : 626, 1980.
 101. Kernacki KA, Hobden JA, Hazlett LD, Fridman R, Berk RS. In vivo bacterial protease production during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jun;36(7):1371-8. 1995.
 102. Howe TR and Iglewski BH. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun.* March; 43(3): 1058–1063. 1984.
 103. Callaghan R. J, Engel S.L, Robden J.A, Calligan M.C, Green LC, Hill J.M: *Pseudomonas Keratitis* The Role of an Uncharacterized Exoprotein, Protease IV, in Corneal Virulence *Vol*137,P 534 1996.
 104. Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkali protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteing, *Invest Ophthalmol and Vis Scien* Vol 34: 2699,1993.

105. Azghani AO, Baker JW, Shetty S, Miller EJ and Bhat GJ. *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL- 8 production by alveolar epithelial cells in culture *Inflamm. res.* 51. 506–510. 2002.
106. Hamood AN, Griswold JA and Christopher M. Duhan MS. Production of Extracellular Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Tracheal, Urinary Tract, and Wound Infections *Journal of Surgical Research.* 61 (2) 425-432: 1996.
107. Döring G, Obernesser H . J, Botzenhart K, Flehming B , Hoiby : Proteasas of *Pseudomonas aeruginosa* in patienis with eystic fibrosis, *J Infect Dis* 147 :744-750.1983.
108. Tüç Y, Yağcı A, Klinik örneklerde izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin proteaz aktivitelerinin (elastaz ve alkali proteaz) değişik yöntemlerle gösterilmesi, Uzmanlık Tezi Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 2000.
109. Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carre`Re J, Chazalette JP And Galabert C. Production of Elastase, Exotoxin A, and Alkaline Protease in Sputa during Pulmonary Exacerbation of Cystic Fibrosis in Patients Chronically Infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Clinical Microbiology.* 33 (4). 924–929. 1995.
110. Döring G, Buhl V, Botzenhart K and Hoiby N. Immune response to protease of *Pseudomonas aeruginosa* followed by immune complex formation in cystic fibrosis, *In Proceedings 12th Annual Meeting E.W.G.C.F. Athens, Greece.* 74–77. 1983.
111. Döring G, Buhl V, Hoiby N, Schiotz PO and Botzenhart K. Detection of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in immune complexes isolated from sputum of cystic fibrosis patients. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* 92:307–312. 1984.
112. Klinger J. D., Strauss D. C., Hilton C. B. and Bass J. A.. 1978. Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: demonstration by radioimmunoassay. *J. Infect. Dis.* 128:49–58.
113. Döring G., and Hoiby N. Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 42:197–201. 1983.
114. Winnie GB and Cowan RG. Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlations between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function. *Pediatr. Pulmonol.* 10:92–100. 1991.
115. Woods D E., Cryz SJ, Friedman RL, and Iglewski BH. Contribution of toxin A and elastase to virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections of rats. *Infect. Immun.* 36:1223–1228. 1982.
116. Moss RB, Hsu YP, Lewiston NJ, Curd JG, Milgrom H, Hart S, Dyer B. and Larrick JW. Association of systemic immune complexes activation, and antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and exotoxin A with mortality in cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:648–652. 1986.
117. Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, Stockley RA and Cole PJ. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:26–32. 1991.
118. Smirnov VV, Kiprianova EA, Bacteria of *Pseudomonas* Genus. *Naukova Dumka, Kiev, USSR.* 100–111. 1990.
119. Gee WL, Hassett DJ, Ran H and Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.10 No.12 599-606. 2004.

120. Ingram JM and Blackwood AC. Microbial production of phenazines. *Adv. Appl. Microbiol.* 13. 267–282. 1970.
121. MacDonald JC. In: Gottlieb, D., Shaw, P.D. (Eds.), *Antibiotics*, vol. II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 52–65. 1967.
122. Ernst AH and Friedheim EMD. Pyocyanine, an accessory respiratory pigment. *J. Exp. Med.* 54, pp. 207–221. 1931.
123. Morrison MM and Sawyer DT, Flavin model systems. 2. Pyocyanine complexes of divalent manganese, iron, nickel, copper, and zinc in dimethyl sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* 100., pp. 211–213. 1978.
124. Kanthakumar DR, Cundell M, Johnson PJ, Wills GW, Taylor PJC and Wilson R. Effect of salmeterol on human nasal epithelial cell ciliary beating: inhibition of the ciliotoxin, pyocyanin. *Br. J. Pharmacol.* 112, pp. 493–498. 1994.
125. Ohfuji K, Sato N, Hamada-Sato N, Kobayashi T, Imada C, Okuma H, Watanabe E. Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors and Bioelectronics* 19. 1237–1244. 2004.
126. Hassett D J, L Charniga, K Bean, D E Ohman, and M S Cohen. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun.* 60(2): 328–336. 1992
127. Reszka KJ, O'Malley Y, McCormick ML, Denning GM, Britigan BE. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* Jun 1; 36(11):1448-59. 2004.
128. Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsengalis J. et al. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,8815-8821. 2000.
129. Ramphal R and Vishwanath S. Why is *Pseudomonas* the colonizer and why does it persist? *Infection* 15, 281-287. 1967.
130. Costerton J.W, Stewart PS and Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322. 1999.
131. Whitehurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattiek JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487. 2002.
132. Boyd A and Chakrabarty A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. 2355-2359. 1994.
133. Sauer K, Camper AK, Ehtich GD, Costerton JW and Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154. 2002.
134. Stoodlay P, Dodds I, Boyle JD and Laplin-Scott HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85. 519-528. 1999.