

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*' DA;
AMİNOGLİKOZİDLERİN (GENTAMİSİN,
NETİLMİSİN, AMİKASİN) ETKİSİNDE
“QUORUM SENSİNG”- SİTOKİN İLİŞKİSİ:
KONAK CEVABININ KİNETİĞİ**

VAHİDE BAYRAKAL

MİKROBİYOLOJİ DOKTORA TEZİ

İZMİR- 2014

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2008970021

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*' DA;
AMİNOGLİKOZİDLERİN (GENTAMİSİN,
NETİLMİSİN, AMİKASİN) ETKİSİNDE
“QUORUM SENSİNG”- SİTOKİN İLİŞKİSİ:
KONAK CEVABININ KİNETİĞİ**

MİKROBİYOLOJİ DOKTORA TEZİ

VAHİDE BAYRAKAL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İ Hakkı BAHAR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN

Bu doktora tez projesi Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
SBAG 107S443 No' lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2008970021

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Vahide BAYRAKAL ‘PSEUDOMONAS AERUGINOSA’ DA; AMİNOGLİKOZİDLERİN (GENTAMİSİN, NETİLMİSİN, AMİKASİN) ETKİSİNDE “QUORUM SENSİNG”- SİTOKİN İLİŞKİSİ: KONAK CEVABININ KİNETİĞİ’ konulu Doktora tezini 21. Kasım. 2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. İ. Hakkı Bahar

BAŞKAN



Prof. Dr. Ayşe YÜCE

ÜYE



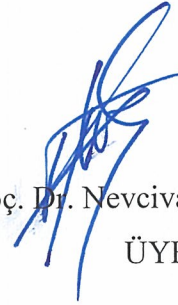
Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN

ÜYE



Prof. Dr. Serhan SAKARYA

ÜYE



Yard. Doç. Dr. Nevcivan GÜLDAŞ

ÜYE

Prof. Dr. Tonay İNCEBOZ

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Mustafa Bülent ERTUĞRUL

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ.....	VI
GRAFİK DİZİNİ	VIII
RESİM DİZİNİ.....	X
KISALTMA DİZİNİ.....	XI
TEŞEKKÜR	XIII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' nın Genel Özellikleri	8
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' nın Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri	9
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' nın Laboratuvar Tanısı.....	12
2.4. Biyofilm Oluşumu.....	13
2.5. Çoğunluğu Algılama	16
2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Biyofilm ilişkisi	18
2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Çoğunluğu Algılama İlişkisi	23
2.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Proteaz Enzimleri.....	25
2.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Konak Savunması.....	26
2.10. Antipseudomonal Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	28
2.11. Aminoglikozidler	29
2.11.1. Başlıca Üstünlükleri:.....	29
2.11.2. Etki Mekanizmaları:	29
2.11.3. Antibakteriyel spektrum:.....	31
2.11.4. Gentamisin:	31
2.11.5. Amikasin:	31
2.11.6. Netilmisin:	32
2.12. Anti- Pseudomonal Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	32
2.12.1. İntrensek Direnç	33
2.12.2. Kazanılmış (Ekstresek) Direnç.....	33

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
3.1. Araştırma tipi	35
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	35
3.3. Çalışma Materyali	35
3.4. Veri Toplama Araçları.....	36
3.4.1. Sarf Malzemeleri	36
3.4.2. Cihazların Listesi.....	39
3.4.3. <i>In vitro</i> Yöntemler	40
3.4.3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	40
3.4.3.2. Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'larının Belirlenmesi	40
3.4.3.3. Bağlanma- Aljinat Üretimi ve Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi	40
3.4.3.4. Suşların Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Mikro AHL Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	41
3.4.3.5. Alkalen Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	41
3.4.3.6. Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	42
3.4.4. Enfeksiyon Modeli (Hücre Kültürü Yöntemleri)	42
3.4.4.1. Hücre dizisi	42
3.4.4.2. Enfeksiyon modeli- Hücre kültürü	42
3.4.4.3. Nükleus Boyası (Hoeschst/ Propidium Iodide) Kullanılarak Hücre Ölümünün (apoptoz/nekroz) Floresans Mikroskopunda Değerlendirilmesi	45
3.4.4.4. Nitrik Oksit yanıtlarının Değerlendirilmesi	46
3.4.4.5. Sitokin Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	46
3.4.4.6. İstatiksel Analiz.....	46
3.5. Araştırma Planı	48
3.6. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	48
3.7. Etik Kurul Onayı ve Proje Desteği.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. <i>In vitro</i> Bulgular	49
4.1.1. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının Gentamisin, Amikasin, Netilmisin Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri	49

4.1.2. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde Çoğunluğu Algılama Yanıtları.....	49
4.1.3. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde Alkale Proteaz, Jelatinaz Değerlendirmesi	51
4.1.4 Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde alkale proteaz, jelatinaz ve Çoğunluğu Algılama Yanıtları (rhl ve las Sistemleri) Değerlendirmesi.....	56
4.2. Enfeksiyon Modeli Sonuçları	61
4.2.1. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde alkale proteaz, jelatinaz ve Çoğunluğu Algılama Yanıtları (rhl ve las Sistemleri) Değerlendirmesi.....	61
4.2.2. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde Bağlanma Özelliği (Aljinat Üretimi)/ Biyofilm Oluşumu Değerlendirmesi.....	65
4.2.3.Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	70
4.2.3.1. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	71
4.2.3.1.2.Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	77
4.2.3.1.3.Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	80
4.2.3.2. K1 Suşu İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	82

4.2.3.3. K2 Suşu İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	90
4.2.4. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi	98
4.2.4.1. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	102
4.2.4.2. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi	105
4.2.4.3. Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi	108
4.2.5. ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Sitokin Yanıtlarının Değerlendirilmesi	111
5. TARTIŞMA.....	121
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	133
7. KAYNAKLAR	135
8. EKLER	148
8.1 Etik Kurul Onayı	148
8.2. ARBİS ÖZGEÇMİŞ.....	149

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın virulans etmenleri	9
Şekil 2: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın metabolik yolları	12
Şekil 3: <i>In vitro</i> yüzeye tutunmuş <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biyofilm yapısının oluşumu. ...	15
Şekil 4: <i>Vibrio fischeri</i> 'deki Çoğunluğu Algılama.	17
Şekil 5: <i>P. aeruginosa</i> aljinat üretimindeki sentez ve polimerizasyon mekanizması:	21
Şekil 6: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da tanımlanan Çoğunluğu Algılama Sistemleri	25
Şekil 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da denitrifikasyonun oksijen konsantrasyonu, nitrik oksit molekülleri ve çoğunluğu algılama molekülleri ile birlikte düzenlenmesi	28
Şekil 8: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da antibiyotiklere karşı direnç gelişimi	32
Şekil 9: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumuna bağlı gelişen direnç	34

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Bakteri Yanıtının Değerlendirildiği Deneysel Modellemenin Akış Şeması	44
Tablo 2: Hücre Yanıtının Değerlendirildiği Deneysel Modellemenin Akış Şeması	47
Tablo 3: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde çoğunluğu algılama sistemlerinin yanıtları.....	50
Tablo 4: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 0 ve 18. saatlerde proteaz ve jelatinaz üretimi	52
Tablo 5: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 6. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi	53
Tablo 6: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 9. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi	54
Tablo 7: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 12. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi	55
Tablo 8: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 0. saatte <i>las</i> , <i>rhl</i> , proteaz ve jelatinaz yanıtları	62
Tablo 9: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 6 ve 18. saatlerde <i>las</i> , <i>rhl</i> , proteaz ve jelatinaz yanıtları.....	63
Tablo 10: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 9 ve 12. saatlerde <i>las</i> , <i>rhl</i> , proteaz ve jelatinaz yanıtları.....	64
Tablo 11: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri.....	76
Tablo 12: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri.....	79
Tablo 13: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri	81

Tablo 14: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri	85
Tablo 15: K1 ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri.....	87
Tablo 16: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri	89
Tablo 17: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri	93
Tablo 18: K2 ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri.....	95
Tablo 19: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri	97
Tablo 20: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi.....	104
Tablo 21: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi.....	107
Tablo 22: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi.....	110

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu	58
Grafik 2: K1 suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu	59
Grafik 3: K2 suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu	60
Grafik 4: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu	67
Grafik 5: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu...	68
Grafik 6: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu...	69
Grafik 7: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği.....	73
Grafik 8: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği	83
Grafik 9: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği	91
Grafik 10: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği	99
Grafik 11: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği	100
Grafik 12: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği	101
Grafik 13: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği	112

Grafik 14: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 10 ve IL- 12 yanıtlarının kinetiği.....	114
Grafik 15: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği ...	116
Grafik 16: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 10 ve IL- 12 yanıtlarının kinetiği	117
Grafik 17: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği ...	119
Grafik 18: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 10 ve IL- 12 yanıtlarının kinetiği	120

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Sağlıklı (canlı) hücre, apoptoz ve nekroz görülen hücreler.....	70
Resim 2: Standart ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerinde apoptoz/ nekroz görüntüleri. A: sıfırıncı saat, B: altıncı saat, C: dokuzuncu saat, D: onikinci saat	71
Resim 3: Onsekizinci saatte ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşunun HEp-2 hücresinde görülen bağlanma- aljinat üretimi (gentamisin %6,2 MİK yoğunluğu)	75

KISALTMA DİZİNİ

AckA: Asetat Kinaz

AHL: Açıl Homoserin Lakton

AI: “Autoinducer” (Kendi Kendini Uyarıcı,)

AK: Amikasin

Alg A-D: Aljinat üretim genleri

aprA: Alkalen proteaz

AQ: Alkilkinolon

ArcA: Arjinin deaminaz

ArcB: “Ornithine carbamoyltransferase

ArcC: Karbamat Kinaz

Arr: “Aminoglycoside Response Regulator”

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CRP: “Catabolite Repressor Protein”

CRP: “catabolite repressor protein”

ÇA: Çoğunluğu Algılama

di c-GMP: “bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate”

eDNA: Ekstrasellüler DNA

EN: “European Norm”

EPS: Ekzopolisakkarit

FDA: “Food and Drug Administration”

GN: Gentamisin

IFN- γ : İnterferon gama

IL: İnterlökin

IQS: “Integrated Quorum Sensing”

ISO: “International Organization for Standartization”

las B: Elastaz B

las I: *las Inducer* (3- oxo- C12 – HSL- L, Uzun Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni)

las R: *las Regulator* (“Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen)

LBA: Luria Bertani Agar
LBB: Luria Bertani Broth
LdhA: Laktat dehidrogenaz
LPS: Lipopolisakkarit
McF: McFarland
MHB: Mueller Hinton Broth
MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NET: Netilmisin
NO: Nitrik Oksit
NOR: Nitrik Oksit redüktaz
Opr: “The Outer Membrane Porin”
PBP: Penisilin Bağlayan Protein
PBP: Penisilin Bağlayan Protein
Pdh: Pirüvat dehidrogenaz
Pts: Fosfat asetil tranferaz
R: “rough”
rhl I: C4 – HSL, AI Sentaz Geni, Kısa Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni
rhl R: “Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen
RPMI: “Rosewell Park Memorial Institute Medium”
RpoS: Sigma Faktör
S: “smooth”
Sub-MİK: Subminimal İnhibitör Konsantrasyon
TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
tox A: ekzotoksin A
TS: Türk Standartı
TSE: Türk Standartları Enstitüsü
TÜRKAK: Türk Akreditasyon Kurumu
VgsR: “virulence quorum sensing regulator”

TESEKKÜR

Eğitimimde ve bu tezin hazırlanmasında tüm bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana destek olan başta danışmanlarım Sayın Prof Dr. İ. Hakkı Bahar ve Sayın Prof. Dr. A. Hüseyin Baskın' a, tezime farklı bir bakış açısı getirerek, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Ayşe YÜCE' ye, eğitimimde katkıları olan bölüm hocalarıma, , her konuda bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*' DA; AMİNOGLİKOZİDLERİN (GENTAMİSİN,
NETİLMİSİN, AMİKASİN) ETKİSİNDE “QUORUM SENSİNG”- SİTOKİN
İLİŞKİSİ: KONAK CEVABININ KİNETİĞİ**

Vahide BAYRAKAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-mail: vahide.bayrakal@deu.edu.tr

ÖZET

Bakterilerin, ökaryotik bir özellik olan, “birbiri ile iletişim halinde yaşama” özelliğini sergileyebildiği gösterilmiştir. Patojenik bakteriler; topluluk halinde yaşadıklarında, virülans faktörlerini çok daha etkili kullanabilmektedir. Topluluk düzeyindeki virülans özellikler olarak bilinen biyofilm oluşumu ve hücreden hücreye iletişim sistemini (quorum sensing: çoğunluğu algılama) açıklamak için *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) önemli bir bakteriyel modeldir. Başarılı bir bakteriyel eradikasyonun birçok biyoaktif bileşenin sinerjisine bağlı olduğu görülmektedir. Antibakteriyel yoğunluğunun azaldığı zaman dilimlerinde (subminimal inhibitör konsantrasyon), *P. aeruginosa*'nın konak hücre ile girdiği etkileşim bakteriyel eradikasyonu etkiler görünmektedir. Bu noktada; bu zaman dilimlerindeki *P. aeruginosa* konak etkileşiminin *in vitro* ve canlı hücre dizisinde enfeksiyon modeli kinetiği; enfeksiyonun gelişim süreci ve antibiyotiklerin konsantrasyonlarının, tedavi ölçütlerini belirlemedeki etkisi üzerine önemli fikirler verecektir.

Bu amaçla; önce *in vitro* olarak aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki klinik *P. aeruginosa* suşlarının gentamisin, netilmisin, amikasin antibiyotiklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen bu konsantrasyonların etkisinde zamana bağlı olarak çoğunluğu algılama yanıtları, bağlanma-aljinat üretimi, biyofilm oluşumları, alkalen proteaz ve jelatinaz enzimlerinin üretimleri hem *in vitro* koşullarda hem de hücre kültür dizisi (enfeksiyon modeli) koşullarında araştırılmıştır. Enfeksiyon modeli, HEp- 2 hücre dizileri standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki klinik *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilerek oluşturulmuştur. Daha sonra enfekte hücrelere aminoglikozidler belirlenen MİK ve sub- MİK yoğunlukları eklenerek;

zaman bağı apoptoz/ nekroz, sitokin ve nitrik oksit yanıtları ve hücreler steril distile su ile patlatıldıktan sonra alınan bakterilerde zamana bağı olarak bağlanma-aljinat üretimi, biyofilm oluşumu, alkalen proteaz, jelatinaz enzimlerinin üretimi ve çoğunluğu algılama sistemleri yanıtları arasındaki olası ilişki zamana bağı olarak sorgulanmıştır. *In vitro* koşullarda ve hücre kültür dizilerinde zamana bağı olarak, aminoglikozidlerin etkisindeki suşların bağlanma-aljinat üretimi, biyofilm oluşumu, apoptoz-nekroz yanıtları, nitrik oksit yanıtları ANOVA yöntemiyle analiz edilmiştir. Son değerlendirmeler elde edilen bu sonuçların, antibiyotik uygulanmayan bakteri yanıtları (kontrol) ile “Tukey’ s comparison test” ile karşılaştırılarak yapılmış ve istatistiksel anlamlılıkları belirlenmiştir.

Bütün suşlarda aminoglikozidler etkisinde; **1.** Sıfır, dokuz ve 12. saatlerde her iki çoğunluğu algılama sisteminin çalışmadığı, ancak **2.** Altıncı ve 18. saatlerde her iki çoğunluğu algılama sisteminin de çalıştığı saptandı. **3.** Bağlanma- aljinat üretiminin; *in vitro* da 12. saatte başladığı ve 18. saatte devam ettiği belirlendi. **4.** Enfeksiyon modelinde ise standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*; suşunun 9, 12 ve 18. saatlerde bağlanma- aljinat üretiminin olduğu görüldü. **5.** K1 ve K2 suşlarının 9. saatte bağlanma- aljinat üretimlerinin olduğu 12. saatte biyofilm oluşturdıkları görüldü. **6.** Onsekizinci saatte ise aminoglikozidlerin tüm suşların bağlanma-aljinat üretimi ve biyofilm oluşumunu baskıladığı belirlendi. **7.** Sıfırıncı saatten itibaren enfekte hücrelerde artarak görülen nitrik oksit yanıtının, 18. saatte azaldığı görüldü. **8.** Aminoglikozidlerin etkisinde enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü ($p<005$). **9.** Suşa ve zamana bağı olarak artan apoptoz/ nekroz hücrelerinin 18. saatte bütünlüğünü kaybettiği görüldü. **10.** Enfekte hücrelerde 18. saatte sitokin yanıtının olmadığı görüldü.

Sonuç olarak; antipseudomonal aminoglikozidlerin etkisi altında bile, *P. aeruginosa*’nın konak bağışık sistemine etkide bulunabildiğini ve bağlanma-aljinat üretiminin, biyofilm oluşumunun da bu etkileşimde rolünün olabileceğini anlaşılmıştır. Hastadan izole edilen bakterinin önce bağlanma- aljinat üretimi/ biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi ve daha sonra bu özellik dikkate alınarak, “biyofilm temelli duyarlılık testi” klinik açıdan yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, “Quorum Sensing”, subminimal inhibitör konsantrasyon, nitrik oksit, sitokin yanıtı

**THE RELATION BETWEEN QUORUM SENSING AND CYTOKINES IN
PSEUDOMONAS AERUGINOSA FOLLOWING EXPOSURE TO
AMINOGLYCOSIDES (AMIKACIN, NETILMICIN, GENTAMICIN): KINETICS OF
HOST RESPONSE**

Vahide BAYRAKAL

**Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Microbiology and Clinical Microbiology**

e-mail: vahide.bayrakal@deu.edu.tr

SUMMARY

It was shown that bacteriae may show similar characteristics like “living in a coordinative manner” as in eukaryotes. Pathogenic bacteriae may use their virulence characteristics in more effective way when living in a community. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is an important bacterial model in order to explain the biofilm formation and cell to cell communication systems (quorum sensing; QS) which are the community level virulence characteristics.

A successful bacterial eradication depends on the synergy of many bioactive components. *P. aeruginosa* - host relation during the periods of the decreased antibacterial concentrations (subminimal inhibitory concentration) seems to affect the bacterial eradication. At this point; *in vitro* and in living cell kinetics of the *P. aeruginosa* host relation may give important ideas in determining the therapy measures by the process of infection progress and antibiotic concentrations.

For this purpose, first of all, minimum inhibitory concentrations of aminoglycosides (gentamicin, amikacin, and netilmicin), standard ATCC 27853 *P. aeruginosa* strain and two clinical strains were determined. Time depended QS response, production of gelatinase, alkalene protease enzymes, binding- aliginat production, biofilm production, were studied under these concentrations kinetically at *in vitro* and in cell culture conditions. Infection model was established by two clinically isolated strains and standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* strain’s cell line of HEp- 2 cells. Then determined MIC and sub- MIC concentrations of aminoglycosidases were added to infected cells. The possible relation between time dependent apoptosis/ necrosis, cytokine and nitric oxide responses, and time

dependent QS responses and alkaline protease, gelatinase enzymes production, binding-alginate production, biofilm formation of bacteria which were harvested from blasted cell lines by distilled sterile water were questioned. Under the effect of aminoglycosides; time dependent binding-alginate production, biofilm formation, apoptosis-necrosis and nitric oxide responses of strains *in vitro* and in cell culture conditions were analyzed by ANOVA. Final evaluations were done by comparison of nontreated bacterial responses by Tukey's comparison test, and statistically significant values were determined.

In all strains under the effect of aminoglycosides; **1.** At the 0, 9 and 12th hours both two QS systems did not work, but **2.** At the 6 and 18th hours did work. **3.** Binding-alginate production started at 12th hours and continued at 18th hours *in vitro*. **4.** At 9, 12 and 18th hours binding-alginate production of standard ATCC 27853 *P. aeruginosa* were observed. **5.** At 9th hour binding-alginate production of K1 and K2 strains was determined, biofilm formation was observed at 12th hour. **6.** At 18th hour it was found that aminoglycosides were inhibited binding-alginate production and biofilm formation in all strains of bacteria. **7.** Since the 0. hour nitric oxide responses were increased but decreased at 18th hour at infected cells **8.** Nitric responses of infected cells were decreased under the aminoglycosides effect compared to control ($p < 0.05$). **9.** It was found that integrity of apoptotic-necrotic cells were lost at 18th hour depend on strains and time. **10.** It was found that there was no cytokine response of infected cells at 18th hour.

As a result it was found that *P. aeruginosa* may affect the immune system of the host, and binding-alginate production, biofilm formation may take part in this relation even if there is an aminoglycoside effect. Determination of the biofilm production characterization of isolated bacteria from the patient and when binding-alginate production/ biofilm formation was found positive then "biofilm based susceptibility testing" application may be useful clinically.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, "Quorum sensing", subminimal inhibitory concentration, nitric oxide, cytokine response.

1. GİRİŞ ve AMAC

“Patojenite”, konaktaki mikroorganizmanın, türüne ve / veya bulunduğu yere göre hastalığa neden olması olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlamaya göre konağın immun sisteminden kaçış ve antimikrobiyal ürün ile karşılaşınca konağa zararın devam etmesi veya uzaması olarak tanımlanan “virülans” insan sağlığı açısından önemlidir. Virulans ve patojenite sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılan terimlerdir ve hastalığın şiddetini belirleyen süreçler bütünüdürler. Antimikrobiyal ajan(lar)a karşı direnç, virülan bir mikroorganizmanın, antimikrobiyal ajan(lar)ın ve / veya konağın oluşturduğu mikroçevreye karşı geliştirdiği yanıtlardan biridir. İnsan sağlığı açısından bir patojenite kriteridir. Bakteriyel virülans faktörleri sıklıkla flajella ve pili ile hareket yeteneğine, toksin ve proteaz enzimlerinin üretimine, invazyona, konağa tutunmaya, planktonik formdan biyofilm oluşumuna geçerek, “persistant” hale gelmesine ve antibiyotiklere direncine bağlı olarak gelişmektedir.

Virülans ve patojenik özelliklerin incelenmesi çalışmaları için bakterinin hem planktonik hem de biyofilm formları değerlendirilmelidir. Planktonik ve biyofilm formlarının incelenmesi ile bakterilerin bakteri sayısı ile ilgili virülans özelliklerinin çeşitleri belirlenmeye başlamıştır. İlk belirlenen bakteri sayısı ile ilgili virülans özelliği, biyofilm ile ilgili antimikrobiyal duyarlılıkların değişmesidir. Bakteriler, planktonik dönemdeyken (çevresel mikrobiyolojik örnekler, akut dönemde klinik örnekler,...) antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarına duyarlı olmalarına karşın; biyofilm içinde üreyen bakteriler (kronik dönem klinik örnekler, klima tank suyu örnekleri,..); antibiyotik ajanların penetrasyonunu engelleyerek, metabolizmalarını yavaşlatarak, geniş spektrumlu antibiyotiklere direnç kazanırlar. Biyofilm oluşturarak çoğalan bakteriler, planktonik dönemde görülmeyen patojenite özellikleri kazanarak kronik enfeksiyonlara (persistan) neden olurlar.

Bakteriler biyofilmler oluşturarak çoğaldıkları ve çoğunluğu algılama sistemleri ile birbirleri ile iletişim sağladıklarında, çok hücreli organizma özelliği göstermektedirler. Bakteri sayısı ile ilgili bu davranışlar; planktonik çoğalan bakterilerin oluşturamadıkları, çoklu (multi) virülan etkinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerin virulans özellikleri kronik enfeksiyon, planktonik çoğalan bakterilerin ise akut enfeksiyon ile ilişkilidir denebilir. Akut ve kronik enfeksiyon oluşumlarının bu şekilde ikiye ayrılması, tedavi yöntemlerinde başarıyı etkilemektedir. Kronik bakteriyel patojenlerin biyofilm yapısı

ve çoğunluğu algılama sinyalleri ile genotipik ve fenotipik değişikliğe uğradığının bilinmesi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) oldukça değişken bakteriyel patojenite gösterebilen, bitki ve protozoonlar için doğal üye olarak kabul edilebilen fakat memelilerde, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış memelilerde, fırsatçı patojen olabilen gram olumsuz bir bakteridir. *P. aeruginosa* iki farklı formda çoğalabilir:

1. Enfeksiyonunun başlangıcında daha sıklıkla görülen hareketli “planktonik” çoğalma,
2. Bakterilerin konak bağışık yanıtından korunmasını sağlayan “biyofilm” yapısı oluşturarak çoğalma.

Bakterinin antibiyotik uygulamalarından korunmasını sağlayan “bakteri kentleri şeklinde çoğalma” olarak da tanımlanan biyofilm oluşturarak çoğalma şekli *P. aeruginosa*’nın mukoid fenotiplerinde daha sıklıkla görülmektedir.

Her iki çoğalma şeklinde bakteri metabolizması ve bakterinin mikroçevreye uyumu farklıdır. Değişen mikroçevreye adaptasyonda meydana gelen fenotipik değişiklikler ve antimikrobiyal bileşiklere karşı direnç gelişimlerinin, *P. aeruginosa*’nın meydana getirdiği biyofilm oluşumları ile başladığı bilinmektedir. Biyofilm yapısında üreyen bakteriler antibiyotiklere karşı daha dirençlidir ve direnç gelişimi eski biyofilmlerde (kronik) (7 günlük) 100- 1000 kat daha fazla olabilirken, yeni biyofilmlerde (akuttan kronikliğe geçiş) (1 günlük) bu direnç oranı daha düşüktür. Biyofilm yapısı içinde üreyebilen *P. aeruginosa* mikroçevreye uyum göstererek enfeksiyon odağı olan doku/ organlarda canlı kalabilmektedir. *P. aeruginosa*’nın olası patojenik çeşitliliğinin çözülmesi bu noktada oldukça önemlidir.

Mikroorganizmalar virülans özelliklerini birbirleri ile iletişim halinde iken değiştirirler (“upregulation/ downregulation). Mikroorganizma toplulukları özellikle değişen mikroçevreye uyumda (antibiyotik tedavisi gibi) oldukça etkindir. *P. aeruginosa*’nın dirençli ve virulan tiplerinin birçoğu mikroçevre sinyallerini kullanan “Çoğunluğu Algılama” sistemleri ile genotiplerini ve fenotiplerini yeniden düzenlenmektedir.

P. aeruginosa enfeksiyonlarının klinik belirtileri (i) *P. aeruginosa* ‘nın adaptasyonu ve patojenitesi, ve (ii) konağın savunma sistemi eksikliğine bağlı kronikleşme ve eksiklik olmak üzere iki ayrı başlık altında açıklanabilmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında “Translasyonel Tıp” (from benchside to bedside-from bedside to benchside) kavramına uygun şekilde, “klinisyenin hasta başındaki sorunlarına

katkıda bulunmak” amacı güdülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* fırsatçı bir patojendir, *in vitro* yaşam döngüsü ile konaktaki yaşam döngüsü birbirinden farklıdır. Tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı (tezin kapsamında belli başlı 3 anti-pseudomonal aminoglikozid değerlendirilmiştir), özellikle konaktaki yaşam döngüsünde, bakterinin ve konağın nasıl davrandığı, bu davranış(lar)ın tedaviyi nasıl etkileyebileceği üzerinde durulmuştur. Bu amaçla da klinikten izole edilen suşlar ve standart bir suş yanında, konak mikroçevresi olarak HEp-2 (HeLa bulaşı epitel hücre dizisi; larinks epidermoid karsinoma) hücre dizisi kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Pseudomonas aeruginosa' nın Genel Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) farklı mikroçevre koşullarında canlılığını koruyan, toprakta ve suda sıklıkla bulunan fakat insan için fırsatçı patojen olan hareketli, non-fermentatif, Gram olumsuz bir bakteridir. Fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*; solunum sistemi enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, keratitisi, otitis media ve kanser, HIV gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Nguyen ve Singh, 2006; Twining ve ark,1993).

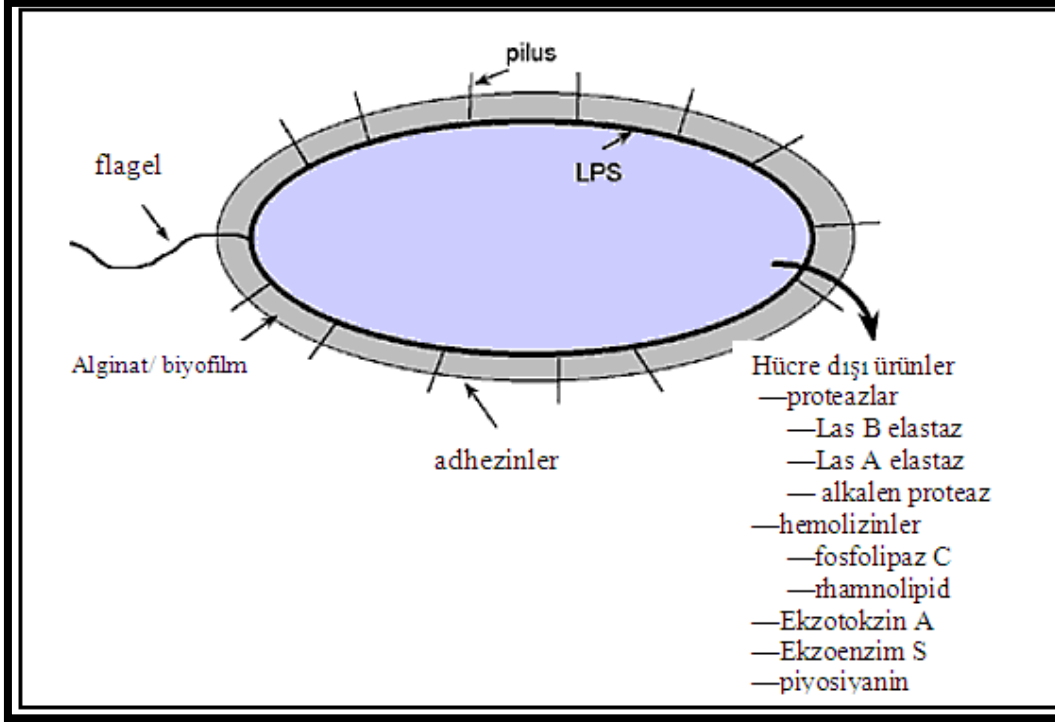
P. aeruginosa farklı mikroçevrelerde kolonize olup, aerobik ve anaerobik yolları kullanarak, virulans faktörlerinin sunumu ile antimikrobiallere direnç kazanabilmektedir (Toyofuku ve ark, 2012):

1. Dış membran bariyeri,

2. Doğal antimikrobiyal inaktivasyonu,

3. Çoklu ilaç efluks pompaları nedeniyle *P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe doğal direnç göstermektedir (Poole, 2011). *P. aeruginosa'* nın antimikrobiallere yanıtında interensek direnç ve kazanılmış (ekstresek) direnç mekanizmaları etkili olmaktadır (Aminov, 2013). Karbapenemler gibi yeni anti-pseudomonal ajanlar geliştirilmesine karşın, *P. aeruginosa* kromozomal mutasyon ve lateral gen transferi ile bu yeni ajanlara hızla direnç geliştirmektedir (Poole, 2011).

P. aeruginosa; türe özgü hücre dışı virulans bileşenleri olan elastaz, alkalin proteaz, ekzoenzim S ve ekzotoksin A gibi birçok proteaz ve toksin üretir (Şekil 1) (Delden ve Iglewski, 1998).



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulans etmenleri

(Delden ve Iglewski, 1998).

P. aeruginosa'da hem hücre ile ilişkili flagel, pilus, adhezinler, aljinat/ biyofilm, lipopolisakkarit (LPS) hem de proteaz, hemolizin, ekzotokzin A, ekzoenzim S, piyosiyenin gibi hücre dışı virulans bileşenleri bulunmaktadır (Delden ve Iglewski, 1998).

P. aeruginosa planktonik çoğalma ve "antibiyotik uygulamalarından korunmasını sağlayan bakteri toplulukları şeklinde çoğalma" olarak da adlandırılan biyofilm formunda çoğalma şeklinde olmak üzere iki şekilde çoğalmaktadır (Morita ve ark, 2014; Rybtke ve ark, 2011). Biyofilm oluşturarak çoğalma şekli *P. aeruginosa*'nın mukoid fenotiplerinde daha sıklıkla görülmektedir. Kronik olarak mukoid bakteri ile enfekte kistik fibrosisli bireylerin tedavilerinin biyofilm yapısının oluşması nedeni ile zor olduğu gözlenmiştir (Stickler, 2002; Drenkard, 2003).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri

Sporsuz, 0,5- 0,8 µm kalınlığında ve 1,5- 3,0 µm boyunda, mikroskop altında düz veya hareketli yapısı nedeniyle kıvrık görülen Gram olumsuz bakterilerdir. Hareket özelliğini polar flajeli ile sağlarken, bazı suşları hücre dışı polisakkarit olan aljinat sentezi

yapabilmektedir. Hem konak dokuya adezyonda hem de biyofilm oluşumunun ilk evresi olan tutunmada etkili olan pili yapısı bulunmaktadır. Epitel hücrelere adheransda etkin olan nörominidaz enzimi üretimi görülmektedir (Delden ve Iglewski, 1998).

P. aeruginosa çeşitli karbon kaynaklarını kullanabildiğinden, zengin besiyerlerinin yanı sıra basit besiyerlerinde de üreyebilmektedir. En iyi 37⁰C’ de üreyebilmesine karşın 42⁰C’ de üreyebilme özelliği ile *P. fluorescens* ve *P. putida*’ dan ayırt edilebilmektedir. Aerop olan *P. aeruginosa* nitrat bulunan mikroçevrede nitratı son elektron alıcısı olarak kullanabildiği için anaerop koşullarda üreyebilmektedir (Henry Y ve ark, 1984;; Schobert ve ark, 2010).

Katı besiyerlerinde değişik koloni morfolojileri göstermektedirler. Bazı suşlarının sentezlediği hücre dışı polisakkarit olan aljinat koloniye mukoid (M) özellik kazandırmaktadır. Katatere bağlı kronik enfeksiyonlardan ve kistik fibrozisli hastalardan izole edilen suşlar genellikle mukoid özellik göstermektedir (Mann E ve ark, 2010) . Özellikle kistik fibrosisli hastalardan izole edilen mukoid özellikteki *P. aeruginosa* suşlarının özellikleri ve konak- etken etkileşimleri mukoid olmayan suşlardan farklılık göstermektedir (Hioby, 2011) (Tablo 1). Mukoid özellik göstermeyen suşlar “rough” (girintili-çukıntılı kenarlı) (R) koloni veya kanlı agar besiyerinde β - hemolizli “smooth” (düzgün yüzeyli) (S) koloni özelliği göstermektedir.

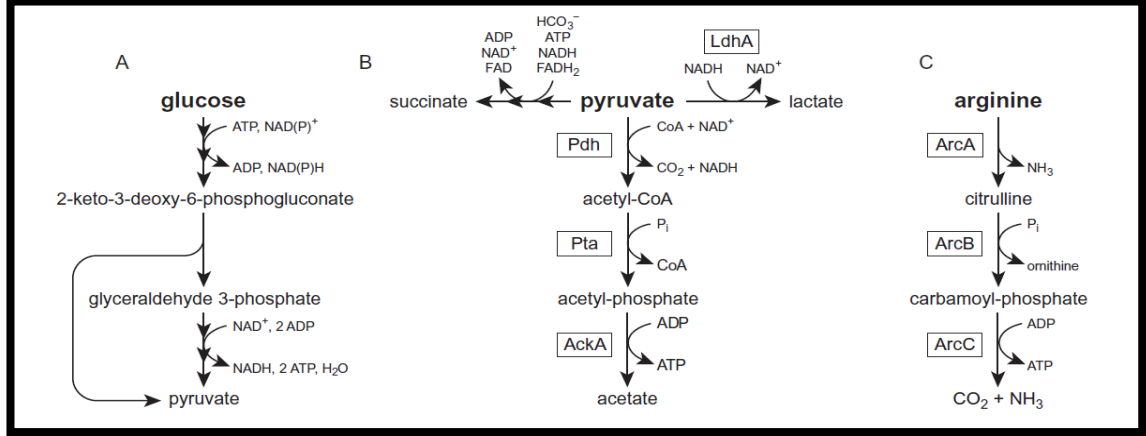
Tablo1: Mukoid (biyofilm oluşturarak çoğalma gösteren) ve non mukoid fenotip farklılıkları (Hioby, 2011)

<i>Özellikler</i>	<i>Mukoid fenotip</i>	<i>Mukoid olmayan fenotip</i>
<i>Akciğerlerdeki yerleşim</i>	<i>Solunum zonu ve balgamdaki geçirgenlik zonu</i>	<i>Balgamdaki geçirgenlik zonu</i>
<i>In vitro biyofilm oluşumu</i>	<i>Evet</i>	<i>Evet</i>
<i>In vivo biyofilm oluşumu</i>	<i>Evet</i>	<i>Hayır</i>
<i>Geleneksel mekanizmalar nedeniyle çok antibiyotik direnci</i>	<i>Nadiren</i>	<i>Sıklıkla</i>
<i>Biyofilm özelliği nedeniyle direnç (tolerans)</i>	<i>Evet</i>	<i>Hayır</i>
<i>Akciğer doku hasarı</i>	<i>Evet</i>	<i>Hayır</i>
<i>Belirgin antikor yanıtının indüklenmesi</i>	<i>Evet</i>	<i>Hayır</i>

Isıya duyarlı fosfolipoaz C ve ısıya dirençli rhamnolipid olmak iki tip hemolizin üretmektedir. *P. aeruginosa* suşları mavi pigment oluşturan **piyosiyanin**, siyah pigment oluşturan **piyomelanin**, kırmızı pigment oluşturan **piyorubin** ve yeşil pigment oluşturan **piyoverdin** pigmentlerini üretmektedir. Piyosiyanin hidrojen peroksit ve süperoksit gibi oksijen radikallerini üreterek, özellikle akciğerdeki epitel ve endotel hücre hasarına neden olmaktadır. Piyoverdin demir alımında etkili bir pigmenttir.

Karbonhidratları fermente etmeyen *P. aeruginosa*, glikoz, fruktoz ve ksiloz gibi bazı karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalamasına karşın laktoz ve sakkarozu kullanmamaktadır. *P. aeruginosa* Entner- Doudoroff yolağını kullanarak bir glukoz molekülünü iki piruvat molekül dönüştürmektedir. Bir molekül glikozdan net iki mol ATP

elde edilmektedir. Anaerobik glikozisi sürdürmek için *P. aeruginosa* piruvat ve asetat sentezi süresince NAD^+ ve NADP^+ gibi oksidantları yeniden üretmelidir (Eschbach M. ve ark, 2004)



Şekil 2: *Pseudomonas aeruginosa*'nın metabolik yolları.

A: Entner-Doudoroff yolu ile glukoz oksidasyonu.

B: Piruvate fermentation **LdhA**, "lactate dehidrogenase"; **Pdh**, "pyruvate dehidrogenase"; **Pta**, "phosphate acetyltransferase"; **AckA**, acetate kinase.

C: "Arginine deaminase" yolu. **ArcA**, "arginine deaminase"; **ArcB**, "ornithine carbamoyltransferase"; **ArcC**, "carbamate kinase" (Glasser ve ark, 2014)

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Laboratuvar Tanısı

TS EN ISO 15186 Tıbbi Laboratuvarlar- Kalite ve Yeterlilik İçin Özel Şartlar standartının 5.4.5 maddesine göre, yoğun bakımlarda hastane enfeksiyonu oranlarının yüksek olması nedeniyle, yoğun bakımda yatan hastalardan alınan kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), biyofilm oluşumu olasılığı yüksek olan katater, diğer hasta gruplarından invaziv işlem ile alınan kan ve BOS klinik örneklerin "kritik numune" olarak adlandırılması hızlı tanı-tedavi ve bakım için yardımcı olacak önemli bir ölçüttür. Klinik örneklerden *P. aeruginosa* suşlarının izolasyonunda % 5 koyun kanlı agar, çukulata agar ve MacConkey agar gibi katı besiyerleri kullanılmaktadır. Karakteristik olarak besiyerine yayılan pigmentleri, üzüksü kokuları ile ayırt edilebilmektedirler. Mukoid, düzgün ve cüce koloni gibi değişik koloni morfolojileri görülebilmektedir (Von Gotz ve ark, 2004).

“Food and Drug Administration” (FDA) onaylı ileri düzey moleküler tanımlama testi olan yağ asidi profillerine göre gaz kromatografisi ile mikrobiyal identifikasyon yapıldıktan sonra, “*P. aeruginosa*” veya “*P. aeruginosa mucoid*” suşlarının tanıları özellikle belirtilerek, ilgili hekime bildirimnin yapılması tedavi ve bakım uygulamalarının etkinliğini arttıracaktır. **TS EN ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar- Kalite ve Yeterlilik İçin Özel Şartlar standartının 5.7.8 maddesine** göre laboratuvar analiz sonuçlarının “kritik” aralıklar içinde olması durumunda ilgili hekime sonucun bildirilmesi, onaylatılması ve gerekli durumda not alınmasının sağlanması (kişisel hataları önlemek için) gereklidir.

Oksidazın olumlu olması, nitrat redüksiyonunun olması, nitrattan gaz oluşumu, arjinin dihidrolazın olması, üç şekerli demirli besiyesinde alkale renk değişimi görülmesi tanıyı doğrulayan biyokimyasal testlerdir.

2.4. Biyofilm Oluşumu

İlk kez onyedinci yüzyılda Van Leeuwenhoek kendi dişleri üzerindeki plaklarda biyofilm tabakası tanımlamıştır. Ancak 1978’e kadar genel biyofilm teorisi tanımlanmamıştır. Tanımlamada, yüzeye tutunmuş matriks ile kaplı biyofilm yapılarında üreyen bakterilerin planktonik formlarından farklı olduğu yüzyıllar boyunca insanlar planktonik bakterilerin neden olduğu akut enfeksiyonlar ile karşı karşıya kalmıştır. Geliştirilen aşı ve antibiyotikler ile bu akut enfeksiyonlar büyük ölçüde kontrol edilebilir hale gelmiştir. Ancak çevresel koşullarda uzun yıllar canlı kalabilen *Pseudomonas* ve *Legionella spp* gibi bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar büyük bir sağlık sorunudur. Biyofilm oluşturabilen bu bakteriler doğal antibiyotiklerin de dahil olduğu antibakteriyel kimyasallar, çevresel bakteriyofajlar ve konak savunmasından korunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, kronik biyofilm enfeksiyonlarının antibiyotik tedavisine direnç göstermesi ve antikorlar gibi konak immun sisteminden korunması şaşırtıcı değildir (Donlan ve ark, 2002).

Biyofilm yapısının tanımlanması 1976 yılında Marshall’ ın yüzeydeki bakterilere sarınmış “çok ince hücre dışı polimer fibrilleri” tanımlamasına atıfla başlar (Donlan ve ark, 2002). Costerton ve arkadaşları tutunan bakterilerin doğadaki polisakkarit yapısına benzer yapıda olan bir glikokaliks yapı ile kaplı olduğunu gözlemlemiş ve bu yapının tutunmaya aracılık ettiğini göstermişlerdir (Costerton ve ark, 1978). Costerton ve arkadaşları 1987 yılında biyofilm yapısının, oldukça yüksek oranda hidrate ve baskın olarak anyonik eksopolisakkarit yapıya gömülü bakteri ve mikrokolonilerden oluştuğunu göstermişlerdir

(Costerton ve ark, 1987). Adezyon biyofilm için gerekli genlerin sunumunu tetikler ve biyofilm oluşum basamakalarını düzenler (Donlan ve ark, 2002).

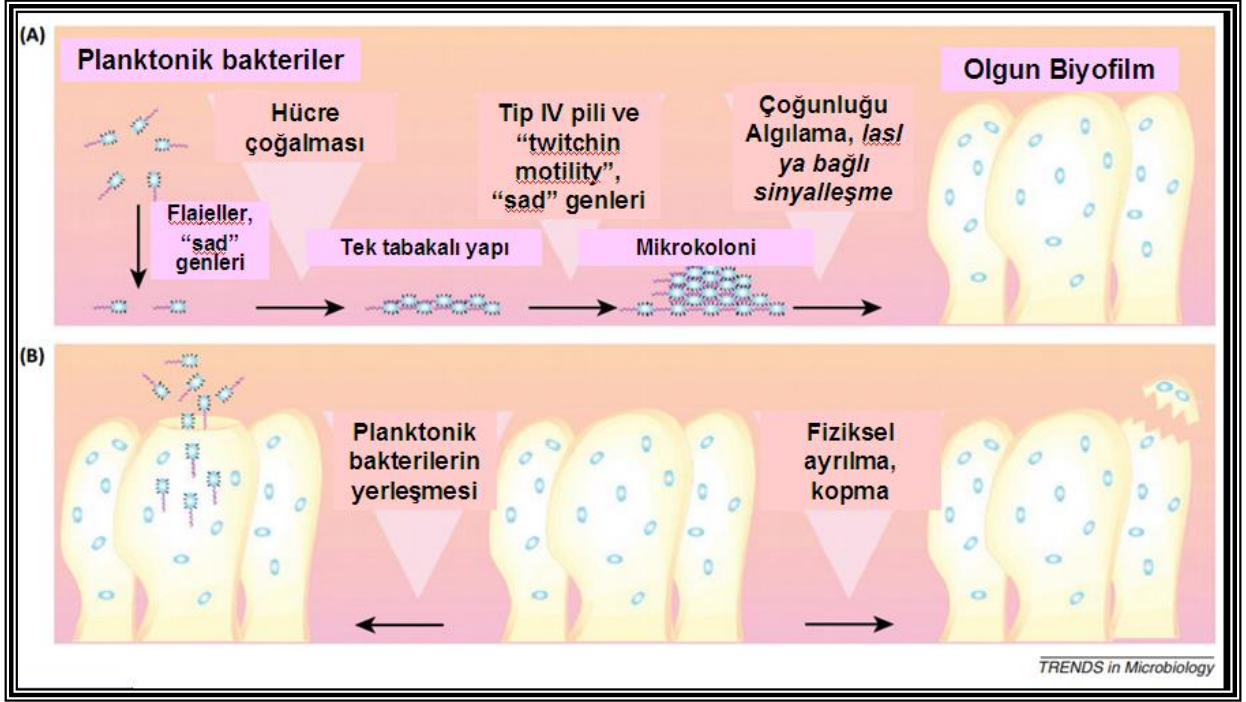
Biyofilm yapısı bileşenleri:

1. Yüzey,
2. Yüzeğe veya yapıya geri- dönüşümsüz tutunan bakteriler,
3. Bu bakterilerin ürettiği polimerik yapıdır.

Biyofilm oluşturan bakterilerin, üreme oranı gibi fizyolojik özellikleri ve gen sunumu değişmiştir. Bazı bakteri popülasyonları biyofilmin ilk oluşum evreleri olan tutunma ve polimerik yapı üretme özelliği göstermesine karşın, “biyofilm fenotipi” olarak tanımlanmamaktadır. Bu yapı gerçek biyofilm yapısının direnç özelliklerini göstermemektedir (Donlan ve ark, 2002).

Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi ve fimbriyalar ile biyotik ve / veya abiyotik yüzeğe tutunmayla başlayan biyofilm yapısı, yüzeğe tutunan bakterinin yeni EPS sentezlemesi ile olgunlaşır (Bjarnsholt ve ark, 2013; Costerton, 1999). Planktonik bakteriden farklı fenotipe dönüşüm için EPS sentezinin artışı yanında, mikroçevreye uyum proteinlerinin salınımı da önemli rol oynar (Costerton, 1999, Favre- Bonté ve ark, 2007).

Genel olarak biyofilm oluşumu bakterinin biyotik ve/ veya abiyotik yüzeğe geri- dönüşümsüz olarak tutunması ile başlar. Geri- dönüşümsüz tutunmadan sonra bakteri EPS üreterek ve aynıda çoğalmaya devam ederek mikrokoloni oluşturur. Mikrokoloni oluşması ile birlikte bakteriyel sinyal sistemi olan “Çoğunluğu Algılama” sistemi ile bakteriler arası “haberleşme” başlar ve bakterilerin genetik sunumları değişmesi ile fenotipik değişiklikler meydana gelir. Tüm bu değişiklikler ve yeniden yapılanmalar ile olgun biyofilm yapısı oluşur. Son olarak da dağılma evresinde bakteriler fenotipik olarak farklılaşır ve biyofilm yapısından ayrılır (Lebeaux ve ark, 2014; Bjarnsholt ve ark, 2013) (Şekil 3).



Şekil 3: *In vitro* yüzeye tutunmuş *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm yapısının oluşumu.

Geri-dönüşümlü tutunmayı takip eden geri dönüşümsüz tutunma “mikrokoloni” oluşumunun temelini oluşturmaktadır (Katı besiyerinde “cüce koloni” görüntüsü). Mantar şeklinde yapıların oluşması ile “olgun biyofilm” yapısı gelişir. Bakteriyel sinyal sistemi düzenlenmeye başlamaktadır. Son olarak, fiziksel ayrılma veya genetik düzenlemeler ile yeniden hareket özelliği kazanan planktonik hücreler ile olgun biyofilmler, yeni biyofilmler oluşturmak üzere dağılabilmektedir (Bjarnsholt ve ark, 2013).

Tek veya birçok bakteri türü birlikte; kateter, kontak lens, proteaz gibi birçok tıbbi gereç yüzeylerinde biyofilmler oluşturabilir (Fonseca 2007; Hall- Stabley ve ark; 2005). Biyofilm mimarisi antibiyotik direncindeki en önemli nedenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler biyofilm oluşturduğu zaman, antibakteriyel ajanlara daha dirençli hale gelmeleriyle, sağaltım güçlükleri ortaya çıkmaktadır (Stewart ve ark, 2001; Fux ve ark, 2005; Stewart, 1994).

Biyofilm yapısının oluşması ile birlikte antibiyotiklere direnç meydana gelmektedir. Meydana gelen bu direncin mekanizmaları:

(i) biyofilm yapısı içindeki bakterilere antibiyotik etkisinin fiziksel ve kimyasal olarak engellenmesi,

(ii) biyofilm yapısı içinde bakterilerin farklı metabolik hızlarda çoğalması,

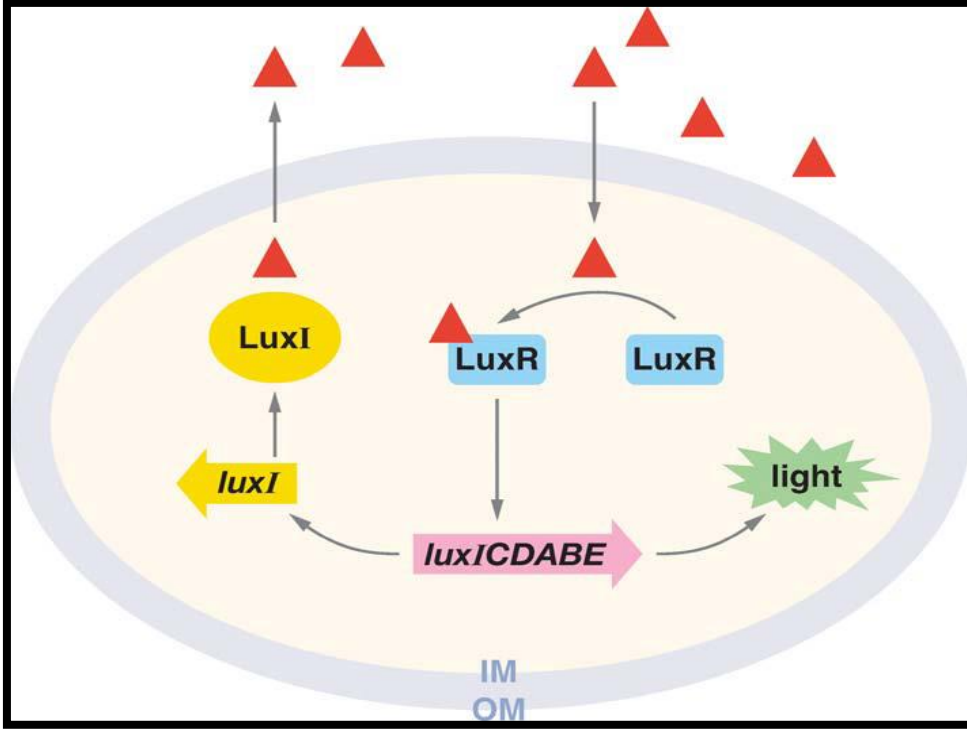
(iii) biyofilm oluşumu ile birlikte bakteride fenotipik değişiklik oluşması,

(iv) biyofilm mimarisi içinde oksijen basıncı, karbohidrat, protein farklılığı gibi nedenlerden dolayı bakterinin metabolizmasının bu değişen mikroçevreye uyum sürecinde değişmesi olarak sınıflandırılmaktadır (Stewart, 2003; Lambert, 2002).

2.5. Çoğunluğu Algılama

Bakteriler iletişim sinyalleri ile buldukları yerdeki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler. Bu davranış, "Çoğunluğu Algılama" ("Quorum Sensing") olarak adlandırılmaktadır. Bakteriler arasında çoğunluğu algılama sinyal iletim sisteminin tanımlanması ile birlikte bakterilerin sınırlı ölçüde de olsa çok hücreli organizmalar gibi organize olabildiği gösterilmiştir (Kievit ve ark, 2000). Bakteri plazmid konjugasyonu, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu ve çeşitli virulans etmenlerinin üretimi gibi birçok fizyolojik etkinliği çoğunluğu algılama sinyalleri ile düzenlemektedir (Pappas ve ark, 2004; Dong ve ark, 2005; Joint ve ark, 2007).

Çoğunluğu Algılama kavramı ilk kez, *Euprymna scolopes*' in (Hawaai mürekkep balığı) ışık organına yerleşerek simbiyoz yaşayan bir biyoluminesans deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*)' de tanımlanmıştır. *V. fischeri*, *Euprymna scolopes*' in ışık organında yüksek yoğunluklarda üreyebilmektedir. Belli bir eşik değer üzerinde yoğunluğa kadar ürediklerinde, lux CDABEGH genleri ile lusiferaz enzimini üretilmekte ve bunun sonucunda bir ışımaya gerçekleşmektedir (Waters ve Bassler, 2005). Gram olumsuz bakterilerde de çoğunluğu algılama sistemleri, *V. fischeri*'de ilk defa açıklanan LuxIR dizgesi aracılığıyla olabilmektedir. LuxIR dizgesi, LuxI proteinini kullanarak "kendi kendini uyarıcı" ("autoinducer", AI) ve buna bağlanarak gen sunumunu düzenleyen LuxR' yi birleştirir (Fugua ve ark; 2001) (Şekil 4). Bakteri tarafından üretilen AI' lar, türe özgül olmakla birlikte nadiren diğer türlerin LuxR tipi düzenleyicileri ile birbirlerini etkiler (Lynch ve ark; 2002).



Şekil 4: *Vibrio fischeri*' deki Çoğunluğu Algılama.

Kırmızı ile işaretli olan moleküller LuxI tarafından üretilen “kendi kendini uyarıcı” lar olarak gösterilmiştir (Waltersve ark, 2005).

Çoğunluğu algılama sinyal iletim sistemi “kendi kendini uyarıcı” (AI) sentaz genini kodlayan I geni ve transkripsiyonal etkinleştirici protein olan R geni olmak üzere iki gen bileşeninden oluşur. AI molekülünün sentezlenmesi ile R proteini ile bileşik oluşturarak hedef geni etkinleştirir ve hücre zarından çıkarak hücre dışı haberleşmede sinyal molekülü olarak kullanılır (Delden ve Iglewski, 1998). Bakteri a sinyal molekülünü kullanarak bulunduğu mikroçevredeki bakteri yoğunluğuna göre fenotipik özelliğini değiştirebilmektedir (Mayer-Hamblett ve ark, 2014).

Çoğunluğu algılama sinyal iletim sistemi patojenik bakterilerin virülans faktörlerinin üretimini kontrol eder ve bakterinin bulunduğu mikroçevreye göre metabolik aktivitesini düzenlemektedir (Wagner ve ark, 2003).

Çoğunluğu algılama sinyal iletim sisteminin çalışma basamakları: bakterinin sinyal molekülü üretmesi, ürettiği sinyal moleküllerinin belli bir eşik değerden sonra bakteri dışına salınarak mikroçevreyi tanımlamada kullanılması, bu tanımlamaya ve/ veya çevreden gelen sinyal molekülü yoğunluğuna göre transkripsiyonel yanıtları tetiklenmesi ile virülans faktörlerinin yeniden düzenlenmesi şeklinde özetlenebilir (Bjarnsholt ve ark, 2007).

Gram olumlu bakteriler; sinyal molekülleri olarak peptidleri kullanırlar. Bu AI peptidler sitoplazmada öncül peptidler olarak üretilir, yıkılır, değiştirilir ve taşınır. Bu hücre dışı AI polipeptidler; iki bileşenli bir dizge ile çalışır. (Yarwood ve Schlievert, 2003).

AI-2 hem Gram olumlu hem de Gram olumsuz bakterilerde kullanılan çoğunluğu algılama sinyal iletim sistemi sinyal molekülleridir. AI- 2, çevre koşullarında LuxP / LuxQ adı verilen iki bileşenli dizge ile tanımlanır ve bunun sonucunda oluşan fosforlanma zinciri gen kopyalanmasının düzenlenmesi ile sonuçlanmaktadır (Baskın, 2006; Sztajer ve ark, 2007).

Gram olumsuz bakteriler, AI olarak adlandırılan “N-acyl-homoserine lactone” u hücreler arası sinyal molekülü olarak kullanır. Bakteriden difüzyon ve/ veya transport yolu ile salınan AI sinyal moleküller, eşik değerdeki yoğunluğa ulaşana kadar bakteri dışında birikir. Mikroçevredeki bakteri içine girer, transkripsiyonal aktivatörleri etkiler ve genlerin transkripsiyonunu tetikler (Murray ve ark, 2007). Tüm bakterilerin AI molekülleri kendi yağ asitlerinin modifikasyonunun farklılığı nedeniyle türe özgüdür. Ancak değişik türdeki birçok bakterinin ortak AI moleküllerini kullandığı gösterilmiştir (Williams ve ark,2007; Rumbaugh ve ark, 2000).

2.6. *Pseudomonas aeruginosa* – Biyofilm ilişkisi

P. aeruginosa, biyofilmlerin gelişim basamaklarının anlaşılması için en çok araştırılan mikroorganizmadır. Büyük bir çoğunluğunun *in vitro* laboratuvar çalışmalarının oluşturduğu bu araştırmalar biyofilm yapılarının oluşum evrelerini, bu evrelerdeki mekanizmaların açıklanması üzerine yapılmıştır (Costerton ve ark, 1999; Sauer ve ark,2002)

P. aeruginosa'nın biyofilm oluşumu; tutunma evresi, mikrokoloni oluşması, olgunlaşma ve ayrılma evrelerinden oluşmaktadır (Costerton ve ark, 1999).

P. aeruginosa'daki tip IV pili yüzeye tutunmayı sağlamaktadır. Makin ve arkadaşları *P. aeruginosa* PAO1 suşu ile yaptıkları çalışmada, mikroçevre şartlarına bağlı olarak tutunmayı arttıran fenotipik polisakkarit yapılarını değiştirebildiklerini belirlemişlerdir. *P. aeruginosa*'nın çeşitli mikroçevre koşullarında biyofilm oluşturarak üremeye devam ettiğini göstermişlerdir. Kimyasal ve immünolojik olarak birbirinden farklı olan A ve B bandlarını taşıyan iki polisakkarit ile birlikte tip IV pili başlangıç tutunmasında etkindir. Lipopolisakkarit A üretimi, bakteri yüzeyindeki hidrofobiteyi arttırarak polistren gibi hidrofobik yüzeylere tutunmayı kolaylaştırır. Lipopolisakkarit B ise hidrofilik yüzeylere tutunmayı arttırır. Tutunmanın başlamasından sonra tutunma yüzeyinde *P. aeruginosa*

üreyerek tek tabakalı bir yapı oluşturmaktadır (Makin ve ark, 1996). Bakterinin hareketi tip IV pili ile gerçekleştirdiği seğirme hareketi (twitching motility) ile olmaktadır. Biyofilm mimarisi bakterinin tip IV pili hareketi ile meydana gelmektedir.

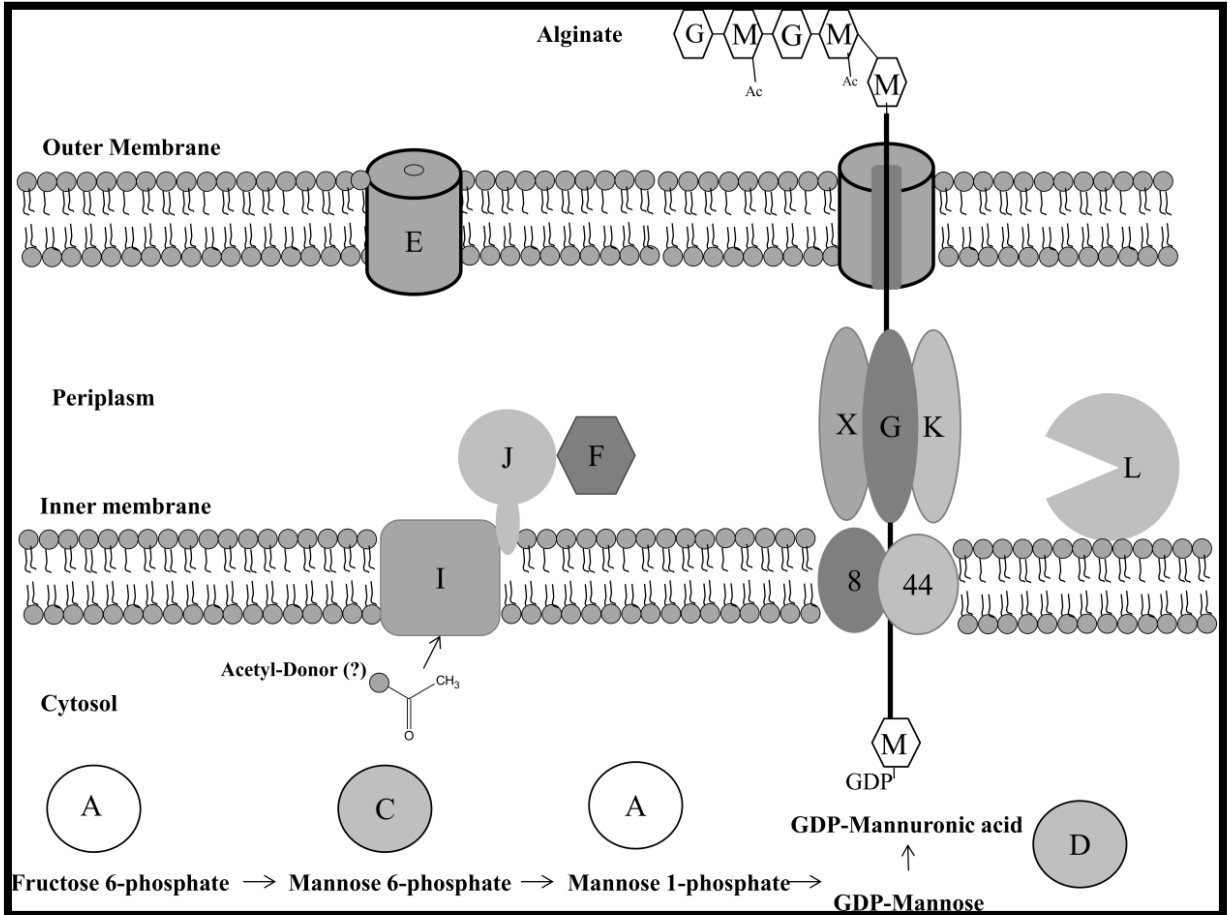
Bakteri biyofilm oluşturmak üzere tutunmaya başladığı zaman, bakterileri örten ve koruyan hücre dışı yapıyı oluşturmaya başlar. Bu hücre dışı yapı tutunma, bakteriler arası hücre- hücre iletişimi, direnç gelişimi ve genetik materyalin değişimi gibi birçok önemli mekanizmada anahtar rol oynamaktadır. Bu hücre dışı yapı temel olarak Pel, Psl ve aljinat polisakkaritleri, proteinler ve eDNA olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır. *P. aeruginosa* nın Psl, Pel ve aljinat olmak üzere türler arasında oranları değişen üç tip polisakkarit ürettiği gösterilmiştir. Bu bileşenlerin oranı biyofilmi oluşturan suş ve çevresel şartlar gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Molin ve Tolker-Nielsen, 2003; Pamp ve Tolker-Nielsen; 2007).

Tutunma, mikrokoloni oluşması, olgunlaşma ve biyofilm mimarisinin oluşması Psl ve Pel eksopolisakkaritlerinin üretimine bağlıdır. Pel glukozdan zengin polimerlerden oluşur. Pel üretimini kodlayan genlerin tüm *P. aeruginosa* suşlarında bulunduğu gösterilmiştir (Friedman ve ark, 2004). Psl özellikler mannoz ile glukoz, galaktoz, ramnoz ile zengin şekerlerden oluşur (Byrd ve ark, 2009) Bazı suşlarda pslA-G gen lokusu bulunurken bazılarında bulunmaz. Örneğin *P. aeruginosa* PAO1 de bulunurken, PA14 suşunda bulunmaz (Friedman ve ark 2004). Psl biyofilm yapısının periferel bölgesinde bulunmaktadır. Serbest hareket eden planktonik bakterileri biyofilm yapısına çektiği gösterilmiştir (Branda ve ark, 2005; Ma ve ark, 2007).

P. aeruginosa' nın mukoid suşlarındaki slime üretimi kistik fibrosisli hastaların akciğerleri gibi hücre yüzeylerine ve medikal aletlere kolonizasyonda oldukça önemlidir (May ve ark, 1991). Slime oluşumu biyofilm yapısı boyunca antimikrobiallerin ve konak savunma mekanizmalarından *P. aeruginosa*' yı koruyan aljinik asitten oluşur (Kumon ve ark, 1994). Genellikle aljinat olarak bilinen aljinik asit sentezi *P. aeruginosa*' da bulunan *algACD* operonu ile kontrol edilir. Aljinat ile ilgili genlerin "upregülasyonu" yüksek oksijen yoğunluğu, yüksek osmolarite, nitrojen eksikliği ve ortamda etanol bulunması gibi birçok mikroçevre koşuluna bağlı olarak görülmektedir (DeVault ve ark, 1990; Zielinski ve ark, 1992). Aljinat üretimi *algA*, *algC* ve *algD* genleri ile kontrol edilir. Bu genlerin aktive olabilmesi için aljinat öncülü olan guanosin difosfat (GDP)- mannuronik asitin üretimi gereklidir (Gacesa, 1998). Mukoid olmayan *P. aeruginosa* suşlarında aktive olmayan Alg44

ve Alg8 transmembran taşıyıcı proteinleri, polimerizasyon için aljinat öncülünü iç membrana taşır (Maharaj ve ark,1993). AlgA- X aljinat enzimleri aljinatın biyosentezini ve polimerizasyonunu yapar. AlgG, AlgK ve AlgX ile etkileşimdedir. Bunlar aljinat polimerini periplazmik boşlukta sararak korunmasını sağlar (Robles-Price ve ark, 2004). Polimerize mannurat rezidüsünün epimerizasyonu AlgG ile kontrol edilir (Douthit Sve ark, 2005). Bu mannurat rezidülerinin asetilasyonu da AlgF, AlgJ ve AlgI enzimleri ile olmaktadır. AlgF periplazmada bulunur (Franklin ve ark, 2004) Asetilasyon olduğunda, hücre dışına aljinat taşınımı AlgE aracılığı ile olur. AlgE mukoid *P. aeruginosa* 'nın hücre dışı polimerik yapısının temeli olan dış membranda bulur (Rehm ve ark, 1997).

AlgA, AlgC ve AlgD GDP- manuronik asidin üretimi için gerekli enzimlerdir. AlgA aljinat biyosentezinde mannoz-1- fosfattan GDP mannozün ve fruktoz-6 fosfattan mannoz-6- fosfatın üretimini katalize eder (Shinabarger ve ark,1991). AlgC mannoz-1-fosfattan mannoz-6 fosfatın üretimini katalizler. (Şekil 5).



Şekil 5: *Pseudomonas aeruginosa* aljinat üretimindeki sentez ve polimerizasyon mekanizması:

AlgA, AlgC ve Alg D aljinat öncülü olan GDP manuronik asidin üretimini kontrol etmektedir. Alg8 ve Alg44 periplazmadaki polimerizasyon için bu molekülü taşımaktadır. Aljinat “lysase” (AlgL) polimerizasyon için kısa oligomerleri üretir. AlgG ile etkileşimde olan AlgK ve AlgX aljinat polimerinin üretiminde yapıyı periplazmada korur. Alg G ile polimerize mannurat öncüllerinin epimerizasyonu kontrol edilir. AlgF, AlgJ ve AlgI enzimleri ile bazı mannurat öncüllerinin asetilasyonu meydana gelir. AlgE ile de oluşan aljinat hücre dışına taşınır (Lavert ve ark, 2014)

Tutunma evresinden sonra olgun biyofilmleri oluşturacak olan mikrokoloni yapısındaki bakteriler Psl, Pel ve aljinat eksopolisakkaritleri üretirler. Daha sonra yapıya

hücre dışı DNA (eDNA) bileşenleri katılmaktadır (Chiang ve Burrows, 2003; Vallet ve ark, 2001; Ma ve ark, 2009). *P. aeruginosa* biyofilmleri karbon kaynaklarına ve karbon miktarına, ürettikleri polisakkaritlerin, protein yapılarının (fimbria gibi) ve eDNA yapılarının dağılımına bağlı olarak farklı mimaride olabilmektedir (Barken ve ark, 2008).

Bakteri tutunarak mikrokoloni oluşturmaya başladığında, değişen mikroçevre koşullarına uyum için metabolizmasını yavaşlatmaya başlamaktadır. Biyofilmlerin en önemli özelliklerinden biri antimikrobiyal ajanlara ve konak immün sisteminin bileşenlerine karşı direnç gelişimine yardımcı olmasıdır. Klinik uygulama, tedavi ve bakımda biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğinde güçlükler yaşanmaktadır. (Hoiby, 2011).

İkincil mesajcı molekül olan “bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate” (c-di-GMP)' in üretimi biyofilmlerin olgunlaşması ve birçok bakteri türünde eksopolisakkaritlerin üretimi ile ilişkilidir. C- di GMP, iki guanosin trifosfat molekülünden oluşmaktadır. Üretimleri diguanilat siklaz enziminin aktivasyonu ile olmaktadır. C-di GMP üretimi, virülans ve hareket faktörlerinin ekspresyonu ile ilgilidir (Christen ve ark, 2006; Kulasakara ve ark, 2006). Yüksek seviyelerdeki c-di- GMP tutunma ve birikme gibi biyofilm ile ilgili özelliklerin artması ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Belas, 2014). c- di- GMP' nin bağlanma bölgesi sitosolik iç membran proteini PelD olarak tanımlanır. Bu nedenle *P. aeruginosa*' da Pel sentezinin c-di GMP molekülü ile ilişkili olduğu düşünülür. (Byrd ve ark,2009).

Polisakkaritlerin üretimi ile mikroçevrede oksijen basıncı düşer. Anaerobik solunum ile ilgili proteinlerin yapımı artar ve biyofilm yapısının mimarisi şekillenir. Oksijen ve besin yoğunluğu, biyofilm merkezine doğru azalır. Bu nedenle bakteriler metabolizmalarını yavaşlatır (Sauer ve ark, 2002; Matsukawa ve ark 2004; Schaber ve ark, 2007). Olgun biyofilmlerde meydana gelen çoğalmanın yavaşlaması, antibiyotiklere direnç neden olur.

P. aeruginosa biyofilm yapıları için polisakkaritler kadar önemli eDNA yapıları bulunur. Witchurch ve arkadaşları *P. aeruginosa* biyofilm DNaseI ile inhibe edilebildiğini göstermişlerdir (Witchurch ve ark, 2002). DNaseI ile tedavi edildiğinde “genç” *P. aeruginosa* biyofilmlerinde dağılmayı sağlarken, olgun biyofilmlerde diğer yapı bileşenleri de üretildiği için aynı etki görülmemiştir (Witchurch ve ark, 2002). Biyofilm oluşumunun ilk evrelerinde az miktarda gerekli olan eDNA düşük seviyelerde üretilirken, mikrokoloni oluşumu ve olgunlaşma evresi süresince büyük miktarlarda üretilmektedir (Yang Lve ark,2007; Allesen-

Holm M ve ark, 2006). Nemoto ve arkadaşları biyofilmlerin oluşumunda sadece laboratuvar suşlarının değil aynı zamanda klinik *P. aeruginosa* izolatlarının eDNA' yı kullandıklarını göstermişlerdir (Nemoto ve ark, 2003).

Hareketin önemli olduğu ayrılma evresinde ise; olgun biyofilm yapısından ayrılan bakterilerin hareketli olduğu, biyofilm yapısında kalan bakterilerin hareketsiz oldukları gösterilmiştir (Singh ve ark, 2000). Ortam koşulları düzeldiğinde hareket özelliği kazanan bakteriler biyofilmden ayrılmaya başlamaktadır. Biyofilm oluşumunda; aerobik ve anaerobik solunumda önemli olan proteinlerin yapımı değişmektedir. Protein yapısı ve hareket özelliği değişen biyofilm yapısındaki bakteriler bu evrede tekrar planktonik fenotipe dönmektedir (Hall-Stoodley ve ark, 2005).

2.7. *Pseudomonas aeruginosa* - Çoğunluğu Algılama İlişkisi

P. aeruginosa' da 4 tane çoğunluğu algılama sistemi tanımlanmıştır. Bunlar:

1. *lasRI* gen lokusu nun üretimini kontrol ettiği “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone” (OdDHL) sinyal molekülü ile kontrol edilen **las sistemi** (Williams ve ark, 2007);
2. *rhlRI* operonu ile üretilen “N-butyryl-homoserine lactone” (BHL) ile düzenlenen **rhl sistemi** (Waters ve ark, 2005);
3. “2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone” (PQS) üretimi ile *las* ve *rhl* sistemlerini kontrol eden *pqs* sistemidir (Diggle ve ark, 2006).
4. “2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde” sinyal molekülünü kullanan yeni bir çoğunluğu algılama sistemi de “Integrated Quorum Sensing” (IQS)' dir (Lee ve ark, 2014).

Mikroorganizmalar bu sinyalleri virülans, biyofilm oluşumu ve antimikrobiyallere direnç gibi fenotipik özelliklerin kontrolünde kullanır (Wagner ve ark, 2003). *P. aeruginosa*' da çoğunluğu algılama sistemleri biyofilm oluşumunu, elastaz ve eksotoksin A gibi salgılanan toksinleri ve alkalin proteaz gibi hücre dışı enzimlerin üretimini kontrol etmektedir (Davies ve ark, 1998).

Eksopolisakkarit ile ilgili *pelA-G* lokuslarının transkripsiyonu *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemleri ile kontrol edilir (Sakuragi ve ark, 2007). Çoğunluğu algılama sistemlerinin *P. aeruginosa* biyofilmlerindeki eDNA üretimini de kontrol ettiği gösterilmiştir (Allesen-Holm ve ark, 2006).

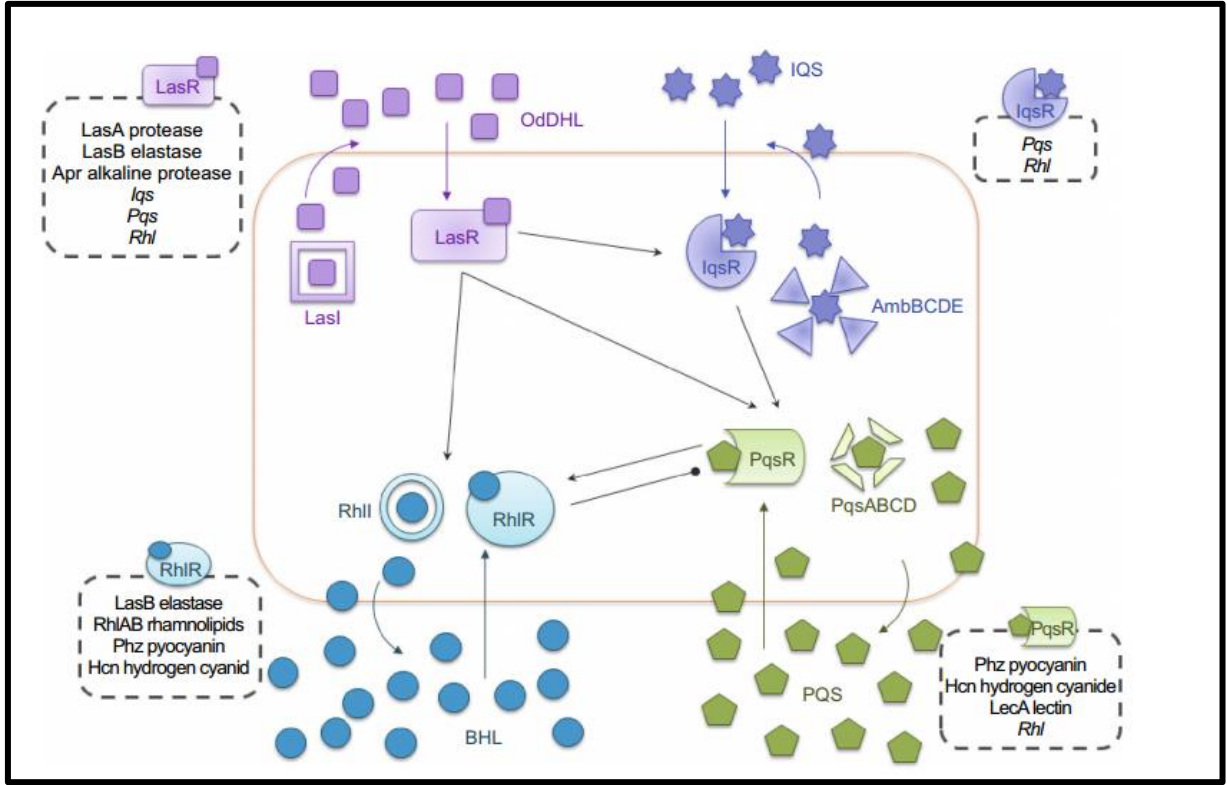
Las sistemi *lasR* ile kodlanan transkripsiyonel aktivatör protein *LasR* ve *lasI* ile kodlanan kendi kendini uyarıcı sentaz enzimi *LasI*' dan oluşmaktadır. *LasI*' nin transkripsiyonu ile “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone” (“autoinducer III, AI-III) nun

sentezini sağlayan *LasI* enziminin oluşumunu sağlamaktadır (Fugua ve ark, 2001). *P. aeruginosa* nın artan hücre yoğunluğu ile AI-III yoğunluğunun artması ilişkilidir. Eşik değere ulaştığı zaman AI-III özgül hedef protein *LasR*'ye bağlanır ve böylece *las* sisteminin kontrol ettiği virülans faktörlerinin ve biyofilm ile ilişkilili genlerin transkripsiyonu başlar. Bu genler eksotoksinA (*toxA*), elastaz (*lasB*), lasA proteaz (*lasA*) ve alkali proteaz (*aprA*) gibi birçok enzimin üretimini kontrol eder (Davies ve ark, 1998; Sandoz ve ark, 2007; Köhler ve ark, 2007).

LasR' ye AI-III' ün bağlanması ile aktive olan *las* sistemi aynı zamanda *rhl* sistemini aktive eder ve ikinci sinyal molekülü “*N*-butyryl-homoserine lactone” üretimi başlar (Ochsner, ve ark, 1995; Pesci ve ark, 1997) *rhl* sistemi “*N*-butyryl-homoserine lactone” üretimini kontrol eden *RhlI* sentaz ile transkripsiyonel aktivatör protein *RhlR*' den meydana gelmektedir (Latifi ve ark, 1996). Rhamnolipid üretimi, piyosiyenin, hidrojen siyanid ve piyoverdin gibi ikincil metabolitlerin üretimini *rhl* sistemi kontrol eder (Williams ve ark, 2009, Davies ve ark, 1998; Sandoz ve ark, 2007).

P. aeruginosa ' da tanımlanan üçüncü çoğunluğu algılama sistemi “2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone” sinyal molekülünü kullanan *pqs* sistemidir. *Pseudomonas* kinolon sinyali olarak da adlandırılmaktadır. Üremenin stasyonier fazının başlangıcında *rhl* sisteminin kontrol ettiği virülans faktörlerinin üretimi için *pqs* sistemi oldukça önemlidir. “2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone” üretimi *LasR*'nin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle *las* ve *rhl* sistemleri arasında çalıştığı düşünölmektedir (McKnight ve ark, 2000.) (şekil 6).

Çoğunluğu algılama kontrol baskılayıcısı (“quorum sensing control repressor” (QscR)) ve virülans çoğunluğu algılama düzenleyici (“virulence quorum sensing regulator “(VqsR)) ile *las* sisteminin çalışması kontrol edilmektedir (Juhas ve ark, 2004). Sinyal molekülleri yoğunluklarının çoğunluğu algılama aktivasyonu için eşik değerde olmadığı zaman, *lasI* transkripsiyonunun baskılaması ile QscR' ün *las* sistemini negatif yönde etkilediği gösterilmiştir (Ledgham ve ark, 2003). Vqs ise *las* sistemini pozitif yönde kontrol etmektedir. *vqsR* geni olmayan mutant *P. aeruginosa* suşlarında AHL üretimi olmadığı için virülans ve patojenitesinde azalma olduğu görölmüştür (Juhas ve ark, 2004).



Şekil 6: *Pseudomonas aeruginosa*’ da tanımlanan Çoğunluğu Algılama Sistemleri (Lee ve ark, 2014)

P. aeruginosa’ da tanımlanan lipaz ve proteaz, enfeksiyon süresince yüzeye tutunmayı sağlayarak, biyofilm oluşumu için gerekli olan Tip IV pili gibi virülans etmenlerinin düzenleyicisi; *Esheria coli*’ de tanımlanan “catabolite repressor protein” (CRP) ile homolog olan “Vfr” dir. Virülans etmenlerinin genel düzenleyicisi olarak tanımlanan Vfr, lasR ‘ nin kopyalamayı başlatan bölgesine özgün bağlanarak, dolaylı yoldan çoğunluğu algılama sistemlerinin kontrolünü yapmaktadır. Değişik sinyaller ile birçok geni harekete geçiren Vfr; LasR’ yi harekete geçirerek elastaz ve piyosiyanın üretimini sağlamaktadır (Beatsonve ark, 2002; Fox ve ark, 2008).

2.8. *Pseudomonas aeruginosa* – Proteaz Enzimleri

Akut *P. aeruginosa* enfeksiyonu boyunca proteaz üretiminin etkin olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*; LasB elastaz, Las A elastaz ve alkale proteazın bulunduğu birçok proteaz üretir. Alkale proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki etkisi

tam olarak açıklanmamakta birlikte korneal enfeksiyonlarda etkisi olduğu bilinmektedir (George ve ark, 2005; Caballero ve ark, 2004).

2.9. *Pseudomonas aeruginosa*- Konak Savunması

Tümör Nekroz Faktör Alfa ((TNF- α) proenflamatuvar sitokindir. TNF- α , *P. aeruginosa*'nın dahil olduğu bir uyarıcı enfeksiyonda akciğerlerdeki epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen bir reaktandır. Birçok çalışmada TNF- α 'nın pseudomonal temizlenmede önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Hoiby ve ark, 2001)

Sitokinlerin IL- 1 süperailisi makrofajlar tarafından üretilir ve enfeksiyöz uyarılara İnterferon gama (IFN- γ) / Th1 bağımlı yanıtı neden olmaktadır. *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonlarında IL- 1 ve IL- 18' in akut pnömoni modellerinde yarardan çok zarara neden olduğu görülmektedir. Doku kültürlerinde *P. aeruginosa* ile muamele edilen insan korneal epitel hücrelerinde ilk üretilen sitokinin IL-1 beta olduğu bilinmektedir (Wu ve ark, 2005).

IL- 4 Th2 lenfosit popülasyonunun bir ürünüdür, antikor yanıtlarında ve B hücre uyarılmasına neden olur. CD+4 farklılaşmasında miktarı artmaktadır. Persistent pseudomonal enfeksiyonlu hastaların balgamında IL- 4 seviyeleri yüksektir.

IL-8 ve nötrofiller gibi kemotaktik faktörlerin yüksek seviyeleri kistik fibrosis hastalarında kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonları ile birlikte görülür. Nötrofillerin enfeksiyon bölgesine girişi reaktif oksijen türleri ve elastaz gibi aracı moleküller ile sağlanır. Enfeksiyon çevresi bu ajanlarla dolmasına rağmen, *P. aeruginosa* bu ajanların etkilerine karşı dirençli hale gelir. Gelişen bu direncin mekanizması bilinmemekle birlikte bakterinin oluşturduğu biyofilmin koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca *P. aeruginosa* katalaz ve süperoksid dismutaz üreterek hidrojen peroksit ve oksidatif stresin etkisini nötralize edebilir (Smith ve ark, 2003).

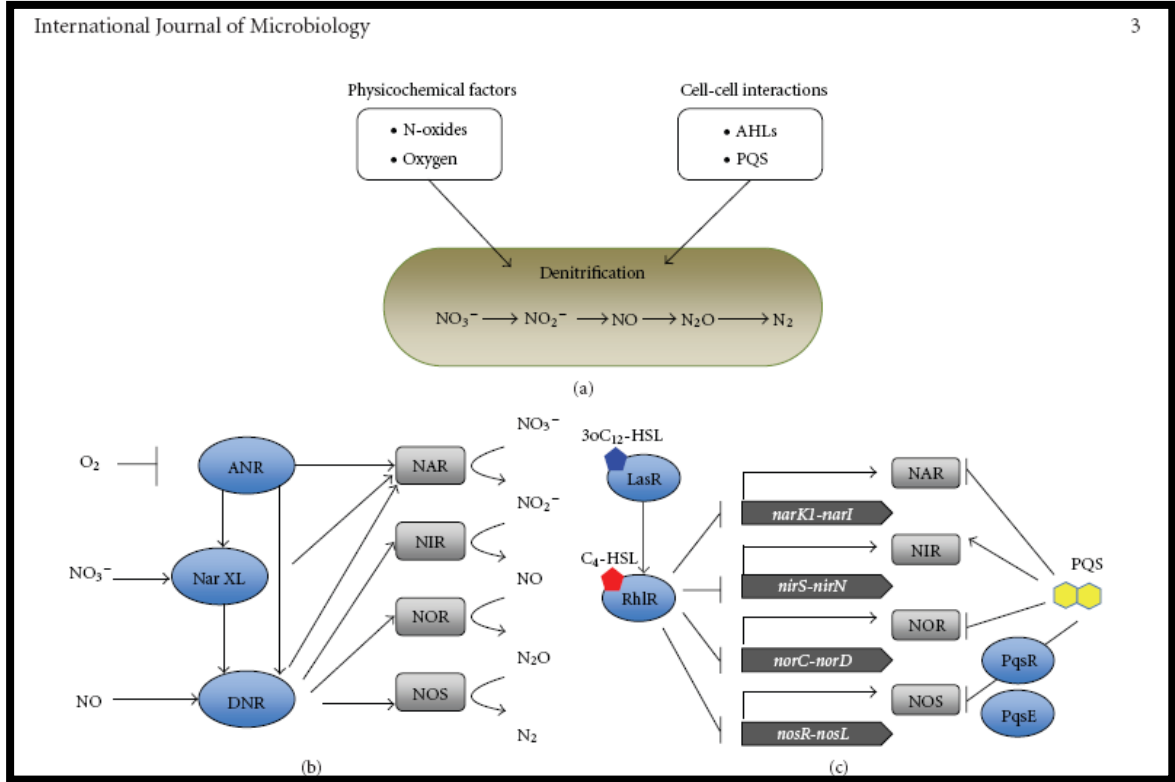
IFN-gama T lenfositler ve NK'lar tarafından sentezlenen ve temel fonksiyonu; hem doğal immünyetede hem de edinsel hücre-aracılı immün yanıtların her ikisinde de makrofajları aktif hale getirmek olan sitokinlerdir (Wagner ve ark, 2006). Wu ve arkadaşları; fırsatçı patojen *P. aeruginosa* 'nın konak immün sistemini ve IFN-gamacevabında virulans faktörlerinin üretimini tetiklediğini göstermişlerdir. Eksojen olarak IFN-gama' nın verilmesi ile rhl sistemi tarafından ekspresyonu düzenlenen lectinA (LecA)'nın üretimini arttırdığını göstererek, rhl sisteminin; eksojen IFN-gama' ya bakteriyel cevapta etkin ve önemli olduğunu göstermişlerdir (Wu ve ark, 2005).

IFN-gama' nın dış kaynaklı uygulanması *P. aeruginosa* hem kronik hem de akut modellerinde bakteriyel temizlenmeyi arttırmaktadır. Buna karşın IFN-gama reseptörü olmayan fareler üzerinde yapılan diğer çalışmalarda bakteriyel temizlenmesinin artmasının aynı zamanda NOS sentezinin artmasına da neden olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler dış kaynaklı IFN- gama yanıtının zararlı olduğunu göstermektedir fakat dış kaynaklı IFN-gama yararlı da olabilmektedir. IL-1 yanıtındaki gibi bu modellerdeki IFN- gama yanıtının dönem ve zamanlamasında farklı yanıtlara olasılıkla neden olabilmektedir (Li ve ark, 2011).

Nitrik oksit sistemleri enflamatuvar sistemde ve bakterilere karşı direkt mikrobisidal etkili olan reaktif nitrojen türlerinin üretiminde önemli bir dercede etkilidir. *P. aeruginosa*' nın "persistant" enfeksiyonları proenflamatuvar olabilen düşük seviyedeki nitrik oksit (NO) ile ilişkilidir. Kronik pseudomonal pnömoninin hayvan modellerinde NO sisteminin inhibisyonunun daha büyük yaralanmalara neden olduğu ve NO sisteminin uyarılmasının da koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Schreiber ve ark, 2007). Benzer şekilde hastalıklarında alevlenmeler görülen kistik fibrosisli hastalarda antibiyotik tedavisi sonrasında dışarı salınan nitrik oksidin az miktarlarda olduğu bulunmuştur. Nitrik oksit sistemi substratı için aktif olarak yarışan balgam arginazının aktifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Toyofuku ve ark, 2012).

Denitrifikasyon basamakları sırası ile NO_3^- redüktaz (NAR), NO_2^- redüktaz (NIR), NO redüktaz (NOR) ve N_2O redüktaz (N_2OR) ile katalize edilmektedir. *P. aeruginosa*' daki denitrifikasyon basamakları " $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ " şeklinde tanımlanmıştır (Şekil 7) (Ju ve ark 2005, Arai, 2011; Williams ve ark, 2009; Toyofuku ve ark, 2012).

Yoon ve arkadaşları *RhlR* mutant suşlarda mutant olmayanlara göre denitrifikasyon enzimlerinin etkinliğinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. (Yoon ve ark, 2002). Wagner ve arkadaşları da yaptıkları mikroarray çalışmalarında denitrifikasyon genlerinin AHL molekülleri ile düzenlendiğini göstermişlerdir (Wagner ve ark, 2003).



Şekil 7: *Pseudomonas aeruginosa*' da denitrifikasyonun oksijen konsantrasyonu, nitrik oksit molekülleri ve çoğunluğu algılama molekülleri ile birlikte düzenlenmesi (Toyofuku ve ark, 2012).

2.10. Antipseudomonal Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Aminoglokozidler ile sinerjik etkilili olduğu belirtilen piperasilin ve tikarsilin gibi penisilinler, seftazidim üçüncü kuşak sefalosporin ve sefepim gibi dördüncü kuşak sefalosporinler, imipenem ve meropenem gibi karbapenemler, aztreonam gibi monobaktamlar, siprofloksasin ve levofloksasin gibi florokinolanlar, gentamisin, tobramisin ve amikasin gibi aminoglikozidler ve kolistin antipseudomonal antibiyotikler olarak kullanılmaktadır (Morita ve ark, 2014).

Penisilinler gibi PBP' ye bağlanarak peptidoglikan sentezini bozması ve hücre zarında bulunan otolitik enzimleri uyarması ile bakterisidal etki yapabilen sefalosporinlerden üçüncü kuşak sefalosporin ve sefepim gibi dördüncü kuşak sefalosporinler antipseudomonal tedavide kullanılmaktadır (Fisher ve ark, 2014).

Gram olumsuz aerop bakteriler için kullanılan aztreonam (monobaktam) PBP 3' e bağlanarak hücre duvar sentezini bozmaktadır. Aztreonam duyarlı suşlar için aminoglikozidler ile kullanımının sinerjik etki gösterebildiği belirtilmiştir (Zhanel ve ark, 2007).

Bakteriyel DNA replikasyonu ve onarımında etkin olan DNA topoizomeraz II ve DNA girazı hedef alan kinolonlardan geniş spektrumlu levofloksasin ve siprofloksasin antipseudomonal antibiyotikler arasında sayılmaktadır (Hurley ve ark, 2012).

Polipeptidler grubunda yer alan ve etki spektrumunu sınırlı ve önemli oranlarda toksisitesi olan antipseudomonal antibiyotiklerden kolistin (polimiksin E) bakteri membranındaki fosfolipidler ile etkileşir ve bakteri geçirgenliğini bozarak bakterisidal etki göstermektedir (Fernandez ve ark, 2010).

2.11. Aminoglikozidler

Bu gruptaki antibiyotikler 1940' larda bulunan streptomisin ile başlayarak *Streptomyces* veya *Micromonospora* türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı sentetik maddeler olan gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, kanamisin, viyomisinidir.

2.11.1. Başlıca Üstünlükleri:

1. Gram- olumsuz aerobik basiller üzerinde; antibiyotiklerin çoğuna göre çok daha güçlü etkinlik gösterirler,
2. Hızlı bakterisid etki yaparlar,
3. Post antibiyotik etkileri belirgindir ve oldukça uzun sürer.

2.11.2. Etki Mekanizmaları:

Bakteri ribozomlarının aminoglikozidlerin birincil etki yeri 30S alt-birimleridir. Bu alt-birimlere geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanarak, ribozomların protein sentezini inhibe ederler. Bu engelleme;

1. Protein sentezinin başlama basamağının engellenmesiyle,
2. mRNA moleküllerinin üzerindeki kodonların yanlış okunması nedeniyle yapıları bozulmuş, bir işlevi olmayan anormal proteinlerin sentez edilmesine neden olarak,
3. Ribozomal kompleksin mRNA' dan erken ayrılması sonucu tamamlanmamış anormal proteinlerin oluşması biçimindedir.

Protein sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösteren diğer antibiyotikler bakteriyostatik oldukları halde, aminoglikozidlerin aynı temel mekanizma ile hızlı bakterisid olmalarının nedenleri;

1. Ribozomlara bağlanmalarının geri dönüşümsüz olması,
2. Yanlış okuma sonucu sentez edilen anormal proteinlerin bakteri hücre membranında birikmesi nedeniyle membran geçirgenliğinin artması,
3. Bunun sonucu yaşamsal öneme sahip maddelerin hücre dışına çıkması ve fazla miktarda ilacın hücre içine girmesidir.

2.11.3. Antibakteriyel spektrum:

Aminoglikozidler esas olarak dar spektrumlu antibiyotiklerdir. Bunlara en duyarlı olan bakteri grubu Gram-olumsuz aerobik basillerdir. Bunlar arasında Enterobacteriaceae türleri (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella* ve *Serratia* türleri), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Brucella* türleri, *Yersinia tularensis* (tularemia etkeni), *Y. pestis* ve *Haemophilus influenzae* bulunur.

Aminoglikozid antibiyotiklerin çeşitli türlerinin duyarlı bakteriler üzerindeki etkinlikleri nicel olarak farklılık gösterir. Bu nedenle *in vitro* minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine veya plazmadaki terapötik doruk konsantrasyonları 4–10 µg/ mL arasında olanlar; gentamisin, tobramisin ve netilmisinidir. MİK'leri 1–16 µg/ mL veya terapötik doruk konsantrasyonları 10 – 30 µg/ mL arasında olanlar; streptomisin, kanamisin ve amikasinidir. Bu konsantrasyon aralıkları içinde bazı üyelerin belirli bakterilere karşı etkinlikleri diğerlerinden fazla olabilir.

2.11.4. Gentamisin:

Micromonospora purpurea ' dan elde edilir. Gerçekte yapıcı birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün (C_1 , C_{1a} ve C_2) karışımından ibarettir. Aminoglikozid ilaçlar içinde amikasinden sonra spektrumu en geniş olan ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır. Duyarlı bakterilerde direncin gelişimi yavaş ve küçük derecededir. Amikasin hariç diğer aminoglikozidlere dirençli olan bakteri suşlarında gentamisin etkin olmakla birlikte gentamisine dirençli bakteri suşları amikasin hariç diğer aminoglikozidlerden pek etkilenmezler.

2.11.5. Amikasin:

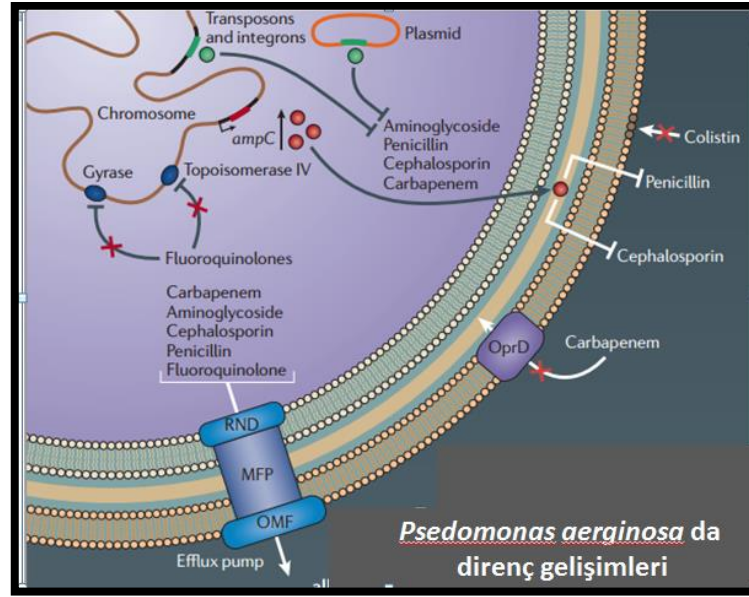
Aminoglikozidler arasında yarı sentetik yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A' dan asilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili olarak gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklı olmasından dolayı en geniş spektrumlu aminoglikoziddir.

2.11.6. Netilmisin:

Yarı sentetik bir aminoglikozid antibiyotiktir. Amikasin gibi, bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklıdır; sadece asetilaz tarafından inaktive edilir. Bu nedenle gentamisine ve tobramisine dirençli *Enterobacteriaceae* grubu bakterilere karşı etkilidir. *Pseudomonas*, *Providencia* ve *Serratia* türlerine karşı etki gücü, gentamisine oranla biraz daha düşüktür (Kayaalp; 2005, sf. 2016: 22). Etki spektrumu amikasin ile benzer olmasına karşın toksisitesi amikasinden daha düşük düzeydedir (Goering ve ark, 2008, sf. 492).

2.12. Anti- *Pseudomonas* Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Birçok antibiyotiğe karşı intrinsik direnç gösteren *P. aeruginosa* aynı zamanda kromozal mutasyon, plasmidler, transpozonlar ile taşınan direnç genlerinin taşınımı ile direnç geliştirmektedir (Şekil 8).



Şekil 8: *Pseudomonas aeruginosa*' da antibiyotiklere karşı direnç gelişimi

(Alan ve Ozer. <http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/posters.pdf>)

2.12.1. İntrensek Direnç

Çeşitli atılım pompaları ve betalaktamaz üretimi (amoksilin, amoksilin kalvunat, ampisilin, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefotaksime dirence neden olan indüklenebilir AmpC betalaktamazlar) olmak üzere iki tür intrensek direnç görülmektedir.

2.12.2.Kazanılmış (Ekstrensek) Direnç

Karbapenemler, aminoglikozidler, kolistin ve kinolonlara karşı direnç gelişiminde geçirgenliğin bozulmasına neden olan mutasyonlar etkili olmaktadır. OprD porininin kaybı düşük oranlarda imipenem direnci ve meropenem direncine neden olabilmektedir.

Hücre içine azalmış oranlarda aminoglikozid girişine neden olan, geçirgenlikteki bozulma tüm aminoglikozidlere karşı direnç gelişimine neden olabilmektedir. Atım pompa sistemleri ile birlikte geçirgenlikteki bozulmaya sebep olan mutasyonlar kistik fibrosisli hastalarda görülen aminoglikozid direncinin temel nedenleri olarak belirtilmektedir. Ayrıca aminoglikozidleri modifiye eden enzimler, geçirgenliğin bozulmasına sebep olan mutasyonlar ile birlikte görülebilmektedir. Bu enzimler genellikle sülfonamidler, beta-laktamlar gibi diğer antipseudomonal antibiyotiklere karşı direnç genlerini taşıyan transpozonlar ve integronlar ile taşındığı için çoklu dirence neden olmaktadır.

P. aeruginosa' da tanımlanan beta- laktamaz genleri, plasmidler, plasmid veya kromozomlardaki integronlar ile taşınmaktadır. Klavulanik asit ile inhibe olan bu enzimler, antipseudomonal penisilinler, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonama karşı dirence neden olmaktadır.

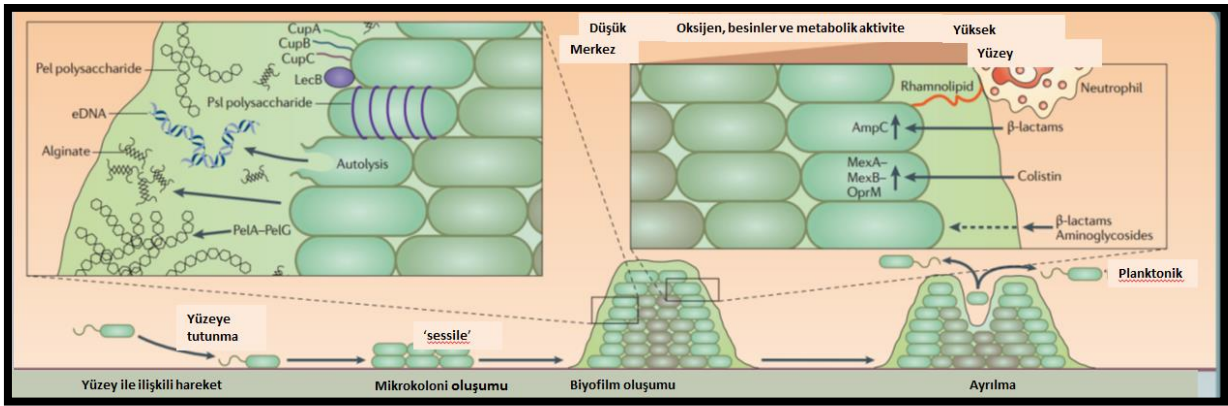
Antipseudomonal penisilinler, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonama dirence neden olan OXA enzimlerin taşınması plasmidleri transpozonlar veya integronlar aracılığı ile olduğu için yayılımı oldukça yüksektir.

P. aeruginosa suşlarının biyofilm oluşturması ile birlikte antipseudomonal antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir. Biyofilm yapısında bulunan ve bakteriyi kaplayan EPS yapısı antibakteriyellerin penetrasyonunu engellemektedir (Şekil 9). Biyofilm oluşumları bakterinin yüzeye tutunması ile başlar, “twitching” (sıçrama, seğirme) hareketi ve olgun biyofilmlere dönüşecek olan mikrokolonilerin oluşması ile devam etmektedir. Biyofilmlerin “mimarisi” biyofilm yapısını oluşturan:

1. PelA- PelG ile sentezlenen Pel, bakterilerin çevresinde helikal şekilde düzenlenen Psl ve aljinat polisakkaritleri,

2. Hücre dışı (ekstraselüler) DNA (eDNA),

3. Biyofilm yapısının başlangıcında bakterinin tutunmasında etkin olan CupA, CupB, CupC fimbria ve lectinB proteinlerinin üretimine bağlı olarak değişmektedir. Bu hücre dışı polimerik yapı aminoglikozidler, beta-laktamlar gibi bazı antibiyotiklerin biyofilm yapısına girişini engellemektedir. Biyofilm yapısı içindeki oksijen ve besin miktarındaki değişim, biyofilm içinde üreyen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını değiştirmektedir. Bu aşamada beta laktam veya kolistin uygulaması AmpC beta- laktamaz ve MexA, MexB, oprM efluks pompaları gibi direnç faktörlerinin üretimini indükleyebilmektedir (Lister ve ark, 2009; Stewart, 2003; Lambert, 2002)



Şekil 9: *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumuna bağlı gelişen direnç (Alan ve Ozer <http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/posters.pdf>)

3. GEREC VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırma tipi

Deneysel model çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma 2008- 2013 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 4044 No' lu Laboratuvar' da gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Materyali

Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki *Pseudomonas aeruginosa* (K1, K2) ve suşları kullanıldı.

***Agrobacterium tumefaciens* (A136):** 6 ile 12 karbonlu N-açil yan zincirini içeren “Açil Homoserin Lakton” (AHL) (uzun zincirli AHL, OdDHL) molekülünü gösteren gösterge suşudur. *P. aeruginosa*' nın birincil çoğunluğu algılama sistemi olan *las* sisteminin çalışmasını göstermek amacı ile kullanılmıştır.

***Chromobacterium violaceum* (CV026):** 4 ile 8 karbonlu N-açil yan zincirini içeren “Açil Homoserin Lakton” (AHL) (kısa zincirli AHL, BHL) molekülünü gösteren gösterge suşudur. Sinyal molekülü olarak kısa zincirli AHL molekülünü kullanan *P. aeruginosa*' nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi olan *rhl* sisteminin çalışmasını göstermek amacı ile kullanılmıştır.

3.4. Veri Toplama Araçları

3.4.1. Sarf Malzemeleri

Tezde Kullanılan Sarf Malzemeler	Kullanım Amacı
Polipropilen (Falcon) Tüp 15 mL (Greiner)	Hücre kültür çalışması
Test Plates 6 Well/Flat (Greiner)	Hücre kültür çalışması
Test Plates 12 Well/Flat (Greiner)	Hücre kültür çalışması
Test Plates 96 Well/Flat (Maxisorb Immunoplate, NUNC)	Hücre kültür çalışması
Flask 25 cm ² (Greiner)	Hücre kültür çalışması
Pipet Ucu Sarı 20-200 mikrolitre (Greiner)	Hücre kültür çalışması ve <i>in vitro</i> çalışmalar
Pipet Ucu Mavi 0-1000 mikrolitre (Greiner)	Hücre kültür çalışması ve <i>in vitro</i> çalışmalar
Tüp 2 mL Dnase Rnase Free (Greiner)	Hücre ve bakteri stoklama

Öze Yuvarlak Uçlu (Greiner)	Bakteri canlandırma ve pasajlama
Pipet Ucu 10-100 mikrolitre Filtreli (Greiner)	Hücre kültür çalışması ve <i>in vitro</i> çalışmalar
Tezde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	Kullanım Amacı
Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)	Bakteri suşlarını canlandırma
Brain Heart Infusion Agar (Oxoid)	Bakteri suşlarını canlandırma
Nutrient Agar (Oxoid)	Alkalen proteaz ve alkalen proteaza bağlı jelatinaz değerlendirme
Skim Milk (Oxoid)	Alkalen proteaz ve alkalen proteaza bağlı jelatinaz değerlendirme
Muller Hinton Agar (Oxoid)	MİK değerlendirme
Gelatine (Oxoid)	Alkalen proteaz ve alkalen proteaza bağlı jelatinaz değerlendirme
Kristal viyole	Biyofilm değerlendirme

DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium] 500 mL (Biochrom)	Hücre kültür çalışması
RPMI 1640 (With 2,0 G/L NaHCO ₃)	Hücre kültür çalışması
Fosfat tamponu (pH: 7.2)	Biofilm değerlendirme, antibiyotiklerin hazırlanması
Penisilin / Streptomisin 100 mL (Biochrom)	Hücre kültür çalışması
Fetal Bovine Serum 100 mL (Biochrom)	Hücre kültür çalışması
L- Glutamin 100 mL (Biochrom)	Hücre kültür çalışması
Hoechst 33342 (HOE) (Sigma)	Apoptoz değerlendirme
Propidium Iodide (PI) (Sigma)	Nekroz değerlendirme
(Antibiyotikler) Amikasin, Netilmisin ve Gentamisin	Mikrodilasyon çalışması, enfeksiyon modeli
A: naphthyethylene-diamine dihydrochloride, %0.1,5 mM;	Nitrikoksit yanıtının değerlendirilmesi
B: o-phosphoric asit içinde sulfanilamide, % 1,5 mM	Nitrikoksit yanıtının değerlendirilmesi

3.4.2. Cihazların Listesi

Tezde Kullanılan Cihazlar	Kullanım Amacı
Laminar Class II / Esco	Biyolojik örneklerin hazırlanması ve işlenmesi
- 80 soğutucu / New Brunswick Scientific U410	Biyolojik örneklerin uzun süreli stoklanması
-20 soğutucu / Ariston	Biyolojik örneklerin uzun süreli stoklanması
+ 4 buzdolabı / Ariston	Biyolojik örneklerin kısa süreli saklanması
Soğutmalı santrifüj /Sigma	Hücrelerin pasajlanması, toplanması
CO ₂ ' li etüv / Thermo	Hücre kültürü, enfeksiyon modeli kültürünün inkübasyonu
Normal etüv /Heraus	Biyolojik örneklerin inkübe edilmesi
Otoklav / Hirayama	Çalışmalarda kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu, besiyerlerinin hazırlanması
Spektrofotometre / Thermo	MİK, sub-MİK, NO yanıtlarının değerlendirilmesi
İnverted Mikroskop / Leica	Hücre büyüme dönemlerinin, apoptoz/ nekroz yanıtlarının değerlendirilmesi

3.4.3. In vitro Yöntemler

3.4.3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki *Pseudomonas aeruginosa* (K1, K2) ve suşları kullanıldı.

***Agrobacterium tumefaciens* (A136):** 6 ile 12 karbonlu N-açıl yan zincirini içeren “Açillenmiş Homoserin Lakton” (AHL) (uzun zincirli AHL, OdDHL) molekülünü gösteren gösterge suşudur (Fuqua ve ark, 1996) *P. aeruginosa*’nın birincil çoğunluğu algılama sistemi olan *las* sisteminin çalışmasını göstermek amacı ile kullanılmıştır.

***Chromobacterium violaceum* (CV026):** 4 ile 8 karbonlu N-açıl yan zincirini içeren “Açillenmiş Homoserin Lakton” (AHL) (kısa zincirli AHL, BHL) molekülünü gösteren gösterge suşudur (McClellan ve ark,1997). Sinyal molekülü olarak kısa zincirli AHL molekülünü kullanan *P. aeruginosa*’nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi olan *rhl* sisteminin çalışmasını göstermek amacı ile kullanılmıştır.

3.4.3.2. Mikro Dilüsyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK’lerinin Belirlenmesi

Her suş için gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin MİK değerleri, mikrodilüsyon yöntemi ile katyon eklenmiş Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde saptandı. Bakteriler McFarland (McF) 0.5 bulanıkta ($1,5 \times 10^8$ bakteri/ mL, $OD_{620}=0.1$ absorbans)’e eşit bulanıklıkta hazırlandı. ELISA mikro plaklarındaki kuyucuklara önce MHB besiyerinden eşit miktarlarda dağıtıldı. Ticari olarak alınan antibiyotiklerin seri dilüsyonları fosfat tamponu (PBS) ile (pH: 7.2) hazırlandı. Antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları ve son olarak da bakteri süspansiyondan dağıtıldı. Plaklar 18 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 620 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirildi (CLSI, 2006).

3.4.3.3. Bağlanma- Aljinat Üretimi ve Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi

McFarland 0.5’ e eşit bulanıklıkta hazırlanan ($1,5 \times 10^8$ bakteri/ mL, $OD_{620}=0.1$ absorbans)) standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki *P. aeruginosa* (K1, K2) suşu; gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin daha önce belirlenen MİK ve % 50, % 25, % 12.5, % 6.2 X MİK yoğunlukları ile birlikte 37°C’de inkübe edildi. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde kristal viyole boyama yöntemi ile bağlanma-aljinat üretimi ve biyofilm değerlendirilmesi yapıldı. İnkübasyon sonunda bakteri süpernatanı boşaltıldıktan

sonra tutunmayan bakterileri uzaklaştırmak için her bir kuyucuk PBS ile (pH: 7. 2) üç kez yıkandı. Her bir kuyucuğa % 1' lik kristal viyole boya solüsyonundan 200 µL dağıtıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi (Kristal viyole sadece bakterilerin salgıladıkları hücre dışı polisakkarit yapıyı boyamaktadır). Bağlanmayan kristal viyole boya solüsyonunu uzaklaştırmak için yine 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra bakteri hücrelerine bağlanan kristal viyolenin serbest kalması için % 95' lik etanolden 200 µL dağıtılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 540 nm' de spektrofotometrik (Thermo) olarak değerlendirildi (O'Toole ve ark, 1998. Kanamaru, 2006). Aynı biyofilm değerlendirmesi, enfeksiyon modeli sonunda elde edilen bakteriler için de yapıldı.

3.4.3.4. Suşların Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Mikro AHL Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Louria Bertani Broth' da 30°C 18 saat inkube edilerek canlandırılan *Chromobacterium violaceum*(*rhl* sistemini görüntülemek (C₄- HSL, BHL) için) ve *Agrobacterium tumefaciens* (*las* sistemini (3- oxo-C12-HSL, OdDHL) göstermek için) suşları McF 0. 5' e eşit bulanıkta (1,5x10⁸ bakteri/ mL, OD₆₂₀=0.1 absorbans) süspansiyon edilmiştir. İki ELISA mikro plağına Louria Bertani Agar dağıtılarak bir gün önce hazırlanmıştır. McF 0. 5' e eşit bulanıkta süspansiyon edilen *Chromobacterium violaceum* suşundan 20 µL hazırlanan ELISA plaklarından birine *Agrobacterium tumefaciens* suşundan 20 µL diğer ELISA plağına dağıtılıp, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Her iki ELISA plağına her suş için ayrı ayrı belirlenen aminoglikozidlerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) MİK, %50, %25, %12. 5, % 6. 2 X MİK değerleri ile karşılanmış standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu, K1 ve K2 suşlarından eşit miktarda ekilerek 37 °C' de 36 saat inkube edilerek değerlendirilmeleri yapıldı. AHL sinyal moleküllerinin varlığı makroskobik olarak değerlendirildi ve “mavi-yeşil” renk görülmesi pozitif olarak kabul edildi (Vivas ve ark, 2004; Bayrakal ve ark, 2008). Aynı çoğunluğu algılama yanıtlarının değerlendirilmesi, enfeksiyon modeli sonunda elde edilen bakteriler için de yapıldı.

3.4.3.5. Alkalen Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Nutrient agar %1,5 skim milk içerecek şekilde hazırlandı ve 105⁰C' de 5 dakika otoklavlanarak plaklara döküldü. Hazırlanmış olan bu skim milk içeren agar besiyerine, antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25, %12. 5, % 6. 2, X MİK değerleri ile karşılanmış standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarından 10 µL ekim yapılarak 37 °C' de inkübe edildi. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18.

saatlerinin sonlarında değerlendirmeleri yapıldı. Koloni evresinde ŐeffaŐlaşma zonunun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Sechi ve ark 2004). Aynı alkalen proteaz değerlendirmesi, enfeksiyon modeli sonunda elde edilen bakteriler için de yapıldı.

3.4.3.6. Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Louria Bertani Agar 30g/L jelatin içerecek Şekilde hazırlandı ve 105⁰C’ de 5 dakika otoklavlanarak plaklara döküldü. Hazırlanmış olan bu besiyerine antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25, %12. 5, % 6. 2, X MİK değerleri ile karŐılaŐmıŐ standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarından 10 μL ekimi yapılarak 37 °C ‘de inkübe edildi. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerinin sonlarında değerlendirilmeleri yapıldı. Koloni çevresinde bulanıklık zonunun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Sechi ve ark 2004). Aynı jelatinaz değerlendirmesi, enfeksiyon modeli sonunda elde edilen bakteriler için de yapıldı.

3.4.4. Enfeksiyon Modeli (Hücre Kültürü Yöntemleri)

3.4.4.1. Hücre dizisi

HEp-2 (HeLa bulaşı epitel hücre dizisi; larinks epidermoid karsinoma) hücre dizisi kullanılmıştır.

3.4.4.2. Enfeksiyon modeli- Hücre kültürü

HEp- 2 hücre hattı RPMI 1640 medium, %5 fetal bovin serum (FBS), %1 L- glutamin, %1 penisilin-streptomisin eklenerek %5 CO₂’li etüvde 37⁰ C’ de inkübe edilecek, ertesı gün tripsinizasyon ile pasajlanan hücreler 96’lık plate’lere %80 yoğunlukta (8x10⁴) kaplayacak Şekilde alınmıştır

Enfeksiyon modeli, için standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları süspansiyonları McFarland 0,5 bulanıklığında (1,5x10⁸ bakteri/ mL, OD₆₂₀=0.1 absorbans) bulanıklığında hazırlandı ve 1/ 20 oranında RPMI 1640 ile sulandırımı yapıldı (1,5x10⁶ bakteri/ mL). Doksanaltı kuyucuklu hücre kültürü plaklarında %80 yoğunlukta hazırlanan hücrelerin üzerine m.o.i 100:1 (multiplicity of infection, bakteri: hücre) olmak üzere bakteri süspansiyonları eklenip %5 CO₂’li etüvde 37⁰ C’ de inkübe edilerek enfeksiyon modeli oluŐturuldu. İki saatlik inkübasyon sonunda hücrelere tutunmayan bakterileri uzaklaştırmak

için hücre süpernatanı boşaltılıp, 3 kez PBS ile hücreler yıkandı. Daha sonra gentamisin, netilmisin ve amikasin antibiyotiklerinin her suş için ayrı ayrı belirlenen MİK ve sub-MİK yoğunlukları eklenerek inkübe edildi. Enfeksiyon modeli bakteri yanıtını ve hücre yanıtını ayrı ayrı değerlendirmek üzere iki plate çalışıldı. Bakteri yanıtının değerlendirilmesi için hazırlanan enfeksiyon modeli hücre kültür plaklarındaki hücreler steril distile su ile patlatılarak bakteriler izole edildi (Bayrakal ve ark, 2009). Hücrelerden izole edilen bakterilerin biyofilm, çoğunluğu algılama yanıtları, alkalen proteaz, jelatinaz enzimlerinin üretimi 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi. Bakteri yanıtının değerlendirildiği deneysel modelleme için kullanılan yöntemlerin özeti Tablo 1' de verilmiştir. Hücre yanıtını değerlendirmek için kullanılan enfeksiyon modeli hücre kültür plağındaki hücrelerin apoptoz, nekroz, nitrik oksit, sitokin yanıtları 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi. Deneysel modelleme için kullanılan yöntemlerin özeti Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 1: Bakteri Yanıtının Değerlendirildiği Deneysel Modellemenin Akış Şeması

ELISA hücre kültür plaklarına alınan hücreler inkübasyon süresi sonunda %80 hücre ile kaplanacak şekilde hazırlandı (8×10^4 hücre/ kuyucuk).



Deneyde kullanılacak olan bakteri süspansiyonları McFarland 0,5 bulanıklığında ($1,5 \times 10^8$ bakteri/ mL, $OD_{620}=0.1$ absorbans) bulanıklığında hazırlandı. 1/ 20 oranında hücre kültür RPMI 1640 ile sulandırımı yapıldı ($7,5 \times 10^6$ bakteri/ mL)



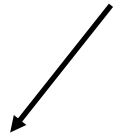
Hücreler hazırlanan Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının süspansiyonları ile enfekte edilip (m.o.i 100:1, bakteri: hücre), 2 saat 37°C de inkübe edildi.



Hücre dışındaki bakterileri (tutunmayan) uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkandı.



Her suş için ayrı ayrı belirlenen gentamisin, amikasin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları eklenip 37°C de inkübe edildi. İnkübasyonun 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerinde hücreler steril distile su ile patlatıldı, serbest kalan bakteriler santrifüjlenerek toplandı.



Alkalin proteaz ve jelatinaz üretimi değerlendirildi.



Bağlanma- aljinat üretimi ve Biyofilm oluşumu “kristal viyole boyama” yöntemi ile değerlendirildi.



Çoğunluğu algılama değerlendirilmesi “mikro AHL” yöntemi ile değerlendirildi.

3.4.4.3. Nukleus Boyası (Hoeschst/ Propidium Iodide) Kullanılarak Hücre Ölümünün (apoptoz/nekroz) Floresans Mikroskopunda Değerlendirilmesi

Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen hücrelerde oluşacak olası apoptoz; Hoechst 33342 (HOE, Sigma) ve propidium iodide (PI, Sigma) ile belirlendi. HOE; çift sarmallı DNA'ların AT'DEN zengin bölgelerine özgün vital bir boyadır. Bu iki boyanın kullanımı, hücre duvarının geçirgenlikleri arasındaki farklılıklara dayanır. Ölü hücreler bu boyalara geçirgendir, ancak canlı hücreler her iki boyayı da dışarı pompalar. Apoptotik hücreler ise PI' i atabilmesine rağmen HOE boyasını atamazlar.

Enfekte hücrelerin inkübasyonu sonunda hücreler 3 kez PBS ile yıkanıp, % 70' lik soğuk etil alkol ile fikse edildi. Fiksasyon işlemi sonunda PBS içinde 5µg/ mL yoğunlukta hazırlanan HOE boyası her bir kuyucuğa 20 µL dağıtılarak 37⁰C' de 15 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda hücreler üç kez PBS ile yıkandıktan PBS içinde 50 µg/ mL yoğunlukta hazırlanan PI boyası PI boyası hemen mikroskopiden önce eklendi. Hücreler eksitasyon dalga boyu 330 nm ve bariyer filtresi olan 420 nm floresan mikroskop (Leica DMIL, Leica Microsystems Type) değerlendirmesi yapıldı. Mikroskopik değerlendirmede her örnek için 3 ayrı 100 hücrelik alan seçilerek sayım yapıldı (Baskın ve ark, 2005). Değerlendirmeler aşağıda listelenmiş boyanma özelliklerine göre yapılmıştır (Shacter ve ark, 2000).

1. Canlı Hücreler: Normal çekirdek, mavi renkli boyanmış kromatin,

2.Apoptotik Hücreler:

Erken Apoptoz: Nukleus içinde kromatin yoğunlaşması ve bütünlüğü bozulmamış nukleus membranı ile parlak maviye boyanmış kromatin

Geç Apoptoz: Membran bütünlüğü korunmuş mavi boyalı kromatinlerin paketlenmesi daha yoğun (**geç apoptoz**)

3. Nekrotik Hücreler:

Erken Nekroz: Bütünlüğü bozulmuş sitoplazmik membran ve nukleus membranı dağılmamış büyük kırmızı boyalı nukleus

Geç Nekroz: Hücre sitoplazması kaybolmuş ve hasara uğramış nukleus membranı ile kırmızı boyalı nukleus.

3.4.4.4. Nitrik Oksit yanıtlarının Değerlendirilmesi

iNOS ile üretilen nitrit, Griess ile ölçülmektedir. Nitrit, nitrit oksitin hızlı oksidasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Hücre yanıtının değerlendirilmesi için hazırlanan standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilip, aminoglikozidlerin her suş için ayrı ayrı belirlenen MİK ve sub-MİK yoğunlukları uygulanıp inkübe edilen HEP-2 hücrelerinin süpernetantlarından 0, 6, 9, 12 ve 18. Saatlerde nitrik oksit yanıtları değerlendirildi. Hücre kültür süpernetanından 100 µL 'lik örnekler alınarak, 100 µL eşit hacimdeki Griess Reagent (A: naphthyethylene-diamine dihydrochloride, %0.1,5 mM; B: o-phosphoric asit içinde sulfanilamide, % 1,5 mM) ile 96'lık mikrotitre plaklarında karıştırılıp (Maxisorb Immunoplate, NUNC) ve 10 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekledikten sonra 540 nm' de plaklar okutuldu (Thermo, spektro model system) Sodyum nitritin iki kat sulandırımı ile de standart eğri çizdirilerek, değerler saptandı (Baskın ve ark, 1997).

3.4.4.5. Sitokin Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Gentamisin, amikasin, netilmisin antibiyotiklerinin seri dilüsyonlarının etkisinde; standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları için belirlenen MİK ve sub-MİK yoğunlukları eklendi. Enfekte edilen hücrelerin süpernetantları 0, 6, 9, 12 ve 18' inci saatlerde toplanarak, bu saatlerdeki IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN-gama yanıtları "Multiplex ELISA" yöntemi ile değerlendirildi (Bu yöntem hizmet satın alınarak gerçekleştirilmiştir).

3.4.4.6. İstatiksel Analiz

Aminoglikozidlerin (gentamisin, amikasin ve netilmisin) etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının *in vitro* biyofilm oluşumlarının kinetiği ve bu suşlar ile enfekte hücrelerin apoptoz, nekroz ve nitrik oksit yanıtlarının kinetiği "One-Way ANOVA" yöntemi ile analiz edilmiştir. Kinetik çalışmasında kontrole (aminoglikozid uygulanmayan) göre aminoglikozidler etkisindeki bakterilerin biyofilm oluşumları ve hücrelerdeki apoptoz/nekroz yanıtları, nitrik oksit yanıtları "Tukey's Multiple Comparison Test" ile karşılaştırılmıştır. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 2: Hücre Yanıtının Değerlendirildiği Deneysel Modellemenin Akış Şeması

ELISA hücre kültür plaklarına alınan hücreler inkübasyon süresi sonunda %80 hücre ile kaplanacak şekilde hazırlandı (8×10^4 hücre/ kuyucuk).



Deneyde kullanılacak olan bakteri süspansiyonları McFarland 0,5 bulanıklığında ($1,5 \times 10^8$ bakteri/ mL, $OD_{620}=0.1$ absorbans) bulanıklığında hazırlandı. 1/ 20 oranında hücre kültür RPMI 1640 ile sulandırımı yapıldı ($7,5 \times 10^6$ bakteri/ mL)



Hücreler hazırlanan K1, K2 ve standart ATCC 27853 *P.aeruginosa* suşlarının süspansiyonları ile enfekte edilip (m.o.i 100:1, bakteri: hücre), 2 saat 37°C de inkübe edildi.



Hücre dışındaki bakterileri (tutunmayan) uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkandı.



Her suş için ayrı ayrı belirlenen gentamisin, amikasin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları eklenip 37°C de inkübe edildi. İnkübasyonun 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerinde hücre yanıtları değerlendirildi.



“Hoeschst/ Propidium Iodide” nukleus boyaları ile apoptoz/ nekroz yanıtları değerlendirildi



iNOS ile üretilen nitrit, Griess ayracı ile ölçüldü.



IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN-gama yanıtları “Multiplex ELISA” yöntemi ile değerlendirildi.

3.5. Araştırma Planı

TARİH	PLANLANAN ÇALIŞMA
Mart 2009- Haziran 2010	Literatür taranması
Haziran 2010- Aralık 2011	<i>In vitro</i> patojenite yanıtlarının değerlendirilmesi
Aralık 2011- Haziran 2012	Hücre kültürü çalışması
Haziran 2012- Aralık 2012	Bakterilerin <i>in vivo</i> patojenite yanıtlarının değerlendirilmesi
Aralık 2012- Haziran 2013	Nitrik oksit, apoptoz, nekroz yanıtlarının değerlendirilmesi
Haziran 2013- Aralık 2013	Sitokin yanıtlarının değerlendirilmesi
Aralık 2013- Temmuz 2014	Sonuçların yorumlanıp, raporların düzenlenmesi ve tezin yazılması

3.6. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda mevcut deney sistemi içinde “Multiplex ELISA” yöntemi hizmet satın alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. Etik Kurul Onayı ve Proje Desteği

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmalı Etik Kurulu’nun 05.10.2007 tarihli 361 sayılı toplantısında 335/ 2007 Protokol Numarası ile araştırmanın etik kurul onayı alınmıştır.

Bu doktora tez projesi Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) SBAG 107S443 No’ lu proje ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. In vitro Bulgular

4.1.1. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının Gentamisin, Amikasin, Netilmisin Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri

Suşların gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotikleri için belirlenen MİK değerleri farklıdır. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu için sırasıyla 2, 8, 2 µg/mL; K2 için 1, 1, 2 µg/mL ve K1 suşu için 1, 2, 0.5 µg/mL' dir. Üç suşta aminoglikozidlere duyarlı bulundu.

4.1.2. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde Çoğunluğu Algılama Yanıtları

Aminoglikozidlerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun *las* çoğunluğu algılama sisteminin çalıştığı belirlendi. Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun *rhl* çoğunluğu algılama sistemi gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında çalışırken, amikasin ve netilmisinin % 50 MİK yoğunluğundan itibaren çalıştığı gözlemlendi. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında K1 suşunun *las* çoğunluğu algılama sisteminin baskılandığı belirlendi. K1 suşunun *rhl* çoğunluğu algılama sistemi gentamisin etkisinde % 12.5 MİK yoğunluğundan itibaren, netilmisinin MİK yoğunluğundan itibaren çalıştığı saptandı. Amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1 suşunun *rhl* çoğunluğu algılama sisteminin çalışmasının baskılandığı görüldü. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K2 suşunun *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin baskılandığı tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 3: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde çoğunluğu algılama sistemlerinin yanıtları

		<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<u>ATCC</u>	<i>las</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>rhl</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u>	<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>rhl</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<u>K2</u>	<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, *las:* *P. aeruginosa*'nın birincil çoğunluğu algılama sistemi, *rhl:* *P. aeruginosa*'nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

4.1.3. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (*Gentamisin*, *Amikasin*, *Netilmisin*) Etkisinde Alkalen Proteaz, Jelatinaz Değerlendirmesi

Sıfır ve 18. saatlerde aminoglikozidlerin (*gentamisin*, *amikasin*, *netilmisin*) MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1, K2 ve standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşlarının proteaz ve jelatinaz enzimlerini üretebildiği belirlendi (Tablo 4).

Altıncı saatte: Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun jelatinaz enzimini, *amikasin*'in MİK ve sub-MİK yoğunluklarında proteaz enzimini üretebildiği saptandı. *Gentamisin* ve *netilmisin*'in MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun proteaz enzimi üretiminin baskılandığı belirlendi. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1 ve K2 suşlarının jelatinaz enzimini üretebildiği saptandı. *Gentamisin*'in MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, *amikasin*'in % 6.2 MİK yoğunluğunda K1 suşunun proteaz enzimini üretebildiği belirlendi. *Gentamisin* ve *amikasin*'in MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K2 suşunun proteaz enzimlerinin üretildiği görüldü. *Netilmisin*'in MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1 ve K2 suşlarının proteaz enzimlerinin üretiminin baskılandığı saptandı (Tablo 5).

Dokuzuncu saatte: Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun proteaz enzimi üretiminin baskılandığı görüldü. *Gentamisin*'in MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1 suşunun proteaz enzimi üretiminin baskılandığı görüldü. *Amikasin* ve *netilmisin*'in tüm yoğunlukları etkisinde K1 suşunun proteaz enzimini üretebildiği belirlendi. Aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde K2 suşunun proteaz enzimini üretebildiği saptandı. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında K1, K2 ve standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşlarının jelatinaz enzimini üretebildiği belirlendi (Tablo 6).

Onikinci saatte. *Netilmisin*'in MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1 suşunun, *amikasin* ve *netilmisin*'in tüm yoğunlukları etkisinde K 2 suşunun proteaz enzimlerini üretebildiği belirlendi. Aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun, *gentamisin* ve *amikasin*'in tüm yoğunluklarında K1 suşunun, *gentamisin*'in tüm yoğunlukları etkisinde K2 suşunun proteaz enzimi üretimlerinin baskılandığı saptandı. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K1, K2 ve standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşlarının jelatinaz enzimini üretebildiği görüldü (Tablo 7).

Tablo 4: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 0 ve 18. saatlerde proteaz ve jelatinaz üretimi

<u>0 ve 18. saatler</u>	<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<u>ATCC</u>																
	<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u>																
	<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K2</u>																
	<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

Tablo 5: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 6. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi

6. saat	<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>	
	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>		
<u>ATCC</u>																	
	<i>Proteaz</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u>																	
	<i>Proteaz</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K2</u>																	
	<i>Proteaz</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

Tablo 6: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 9. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi

<u>9. saat</u>		<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<u>ATCC</u>	<i>Proteaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u>	<i>Proteaz</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K2</u>	<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

Tablo 7: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde, 12. saatte proteaz ve jelatinaz üretimi

<u>12. saat</u>	<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<i>Proteaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ATCC <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K1 <i>Proteaz</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
K1 <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K2 <i>Proteaz</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
K2 <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

4.1.4 Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Amikasin, Netilmisin) Etkisinde Alkalen proteaz, jelatinaz ve Çoğunluğu Algılama Yanıtları (rhl ve las Sistemleri) Değerlendirmesi

Aminoglikozidlerin etkisinde Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının biyofilm ve bağlanma özellikleri kristal viyole boyama yöntemi ile değerlendirildi. Aminoglikozid uygulaması olmadan suşların bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşturması 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi. Bu değer kontrol olarak kabul edildi. Aminoglikozid uygulamasında değerlendirilen bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu “one way ANOVA” yöntemi ile analiz edilip, kontrol ile “Tukey's Multiple Comparison Test” kullanılarak karşılaştırıldı.

Bağlanma (aljinat üretimi) ve biyofilm oluşumu değerlendirilmesi;

$OD_{örnek} \geq 2 OD_{besiyeri}$, bağlanma özelliği olumlu (aljinat oluşumu) (Kanamaro ve ark, 2006)

$OD_{örnek} \geq 1.00$, biyofilm oluşumu olumlu olarak yapılmıştır (Toledo Arana ve ark, 2001).

Spekterofotometrede 540 nm dalgaboyunda $OD_{besiyeri} 0.79 \pm 0.013$ olarak bulundu.

Aminoglikozidlerin etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının 0, 6 ve 9. saatlerde aljinat üretmediği, biyofilm oluşturmadığı görüldü.

Onikinci saatte: OD_{540} absorbansı 0.483 ± 0.025 olarak belirlenen atandart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun aljinat üretiminin olduğu saptandı. Gentamisin MİK yoğunluğu etkisinde (0.573 ± 0.032) bağlanma özelliğinin (aljinat oluşumu) kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.05$). Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda (0.391 ± 0.032) aljinat oluşumunun kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.01$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda (0.641 ± 0.040) aljinat oluşumunun kontrole göre arttığı saptandı ($p < 0.01$). Netilmisin MİK yoğunluğunda (0.372 ± 0.021) ve % 50 MİK (0.348 ± 0.020) aljinat oluşumunun kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$) (Grafik 1).

K1 suşunun aljinat ürettiği belirlendi (Kontrol: OD_{540} absorbansı 0.833 ± 0.050). Gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.01$). Amikasin ve netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.05$) (Grafik 2).

K2 suşunun aljinat ürettiği belirlendi (Kontrol: OD_{540} absorbansı 0.747 ± 0.013). Gentamisin MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunluğunda bağlanma-aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Amikasin ve netilmisin MİK ve sub-MİK

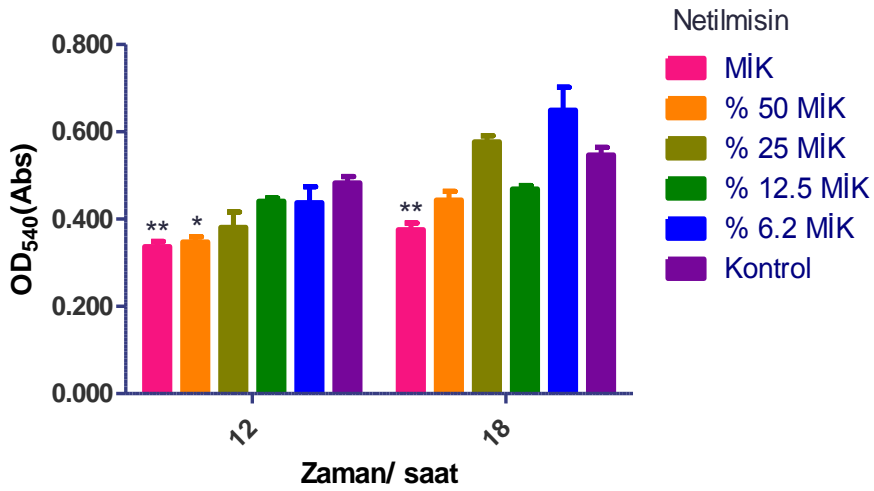
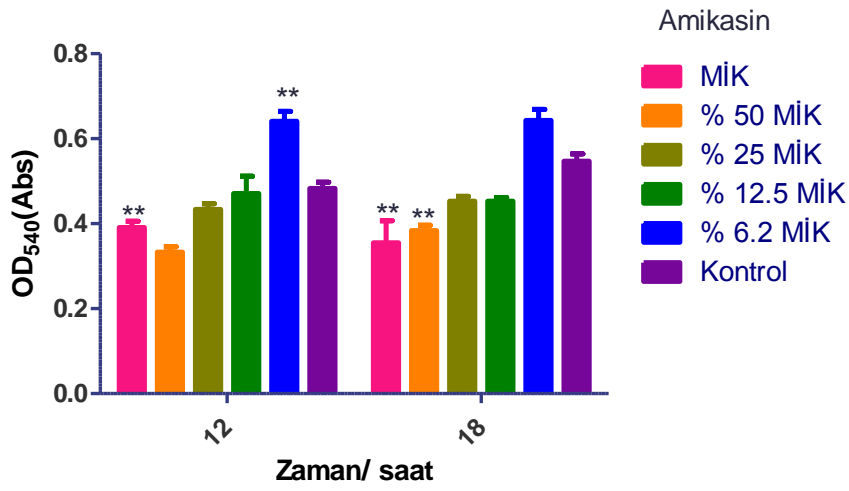
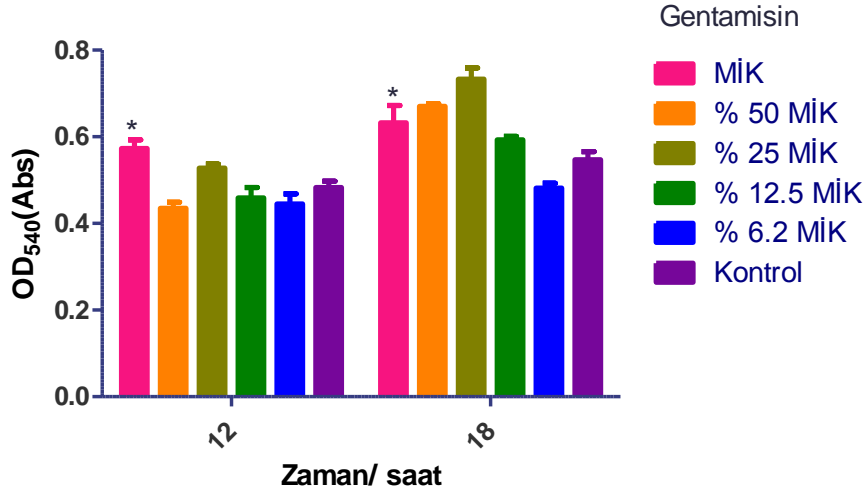
yoğunluğunda görülen bağlanma- aljinat üretimindeki azalmanın kontrolden istatistiksel olarak farklı olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Grafik 3).

Onsekizinci saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun OD₅₄₀ absorbansı 0.574 ± 0.032 olarak belirlendi. Bağlanma-aljinat üretiminin kontrole göre % 25 MİK yoğunluğu etkisinde (0.733 ± 0.45) arttığı görüldü ($p<0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğunda (0.38 ± 0.094) ve % 50 MİK yoğunluğunda (0.384 ± 0.024) bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı belirlendi ($p<0.01$). Netilmisinin MİK yoğunluğunda bağlanma-aljinat üretiminin (0.376 ± 0.26) kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.01$) (Grafik 1).

K1 suşunun OD₅₄₀ absorbansı 0.911 ± 0.040 olarak belirlendi. K1' in aljinat ürettiği saptandı. Gentamisinin % 50 MİK, % 25 MİK ve % 12.5 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma-aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı görüldü ($p<0.01$). Amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı saptandı ($p<0.001$). Netilmisinin MİK, % 50 MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı görüldü ($p<0.01$) (Grafik 2).

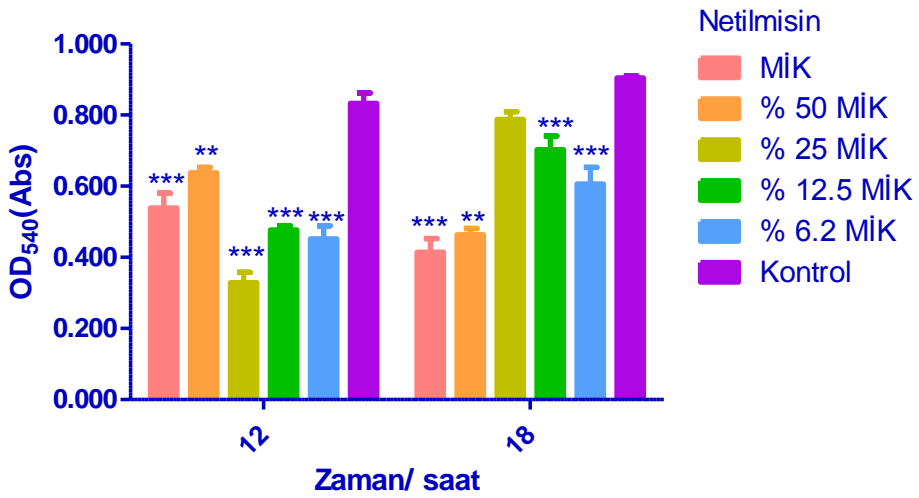
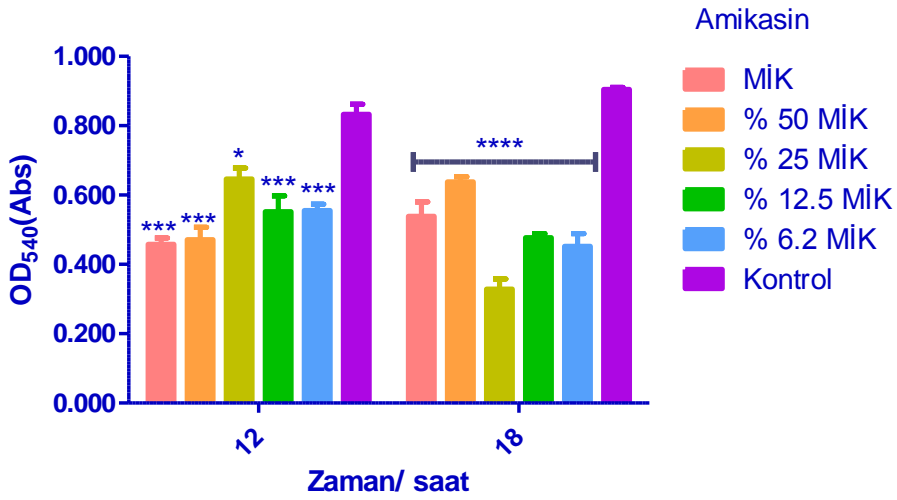
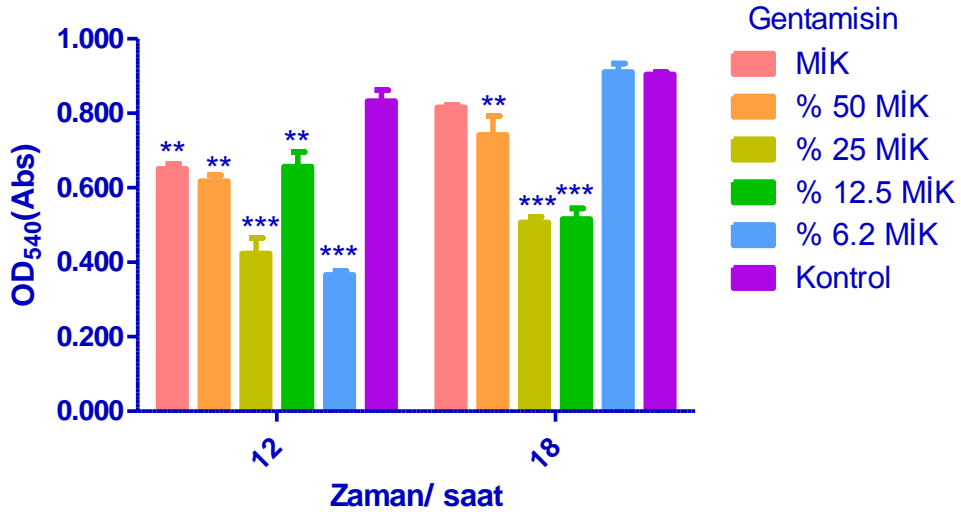
K2 suşunun OD₅₄₀ absorbansı 1.048 ± 0.141 olarak belirlendi. K2 suşunun biyofilm oluşturduğu görüldü. .Gentamisinin MİK ve sub- MİK yoğunluklarında biyofilm oluşumunun baskılandığı belirlendi. Gentamisinin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında bağlanma- aljinat üretiminin olduğu saptandı ($p<0.05$). Amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında biyofilm oluşumunun baskılandığı görüldü ($p<0.05$). Netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K2 suşunun biyofilm oluşturduğu görüldü. Netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğu etkisindeki biyofilm oluşumunun (OD₅₄₀ absorbansı 1.311 ± 0.051) kontrole göre arttığı belirlendi ($p<0.01$) (Grafik 3).

Grafik 1: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



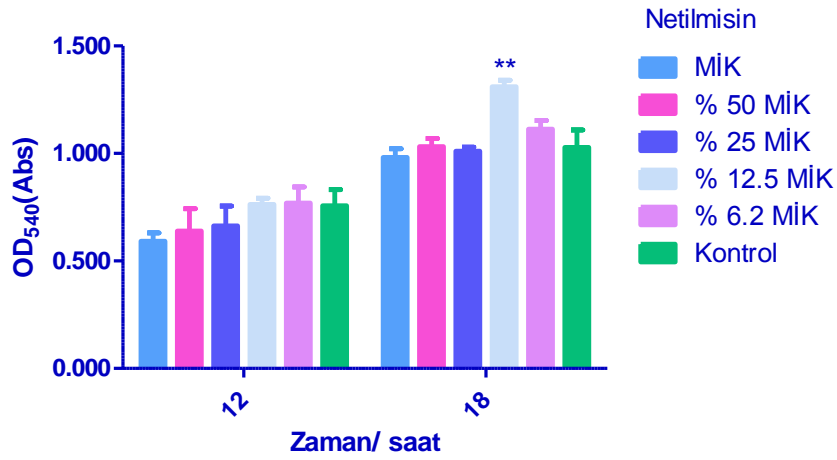
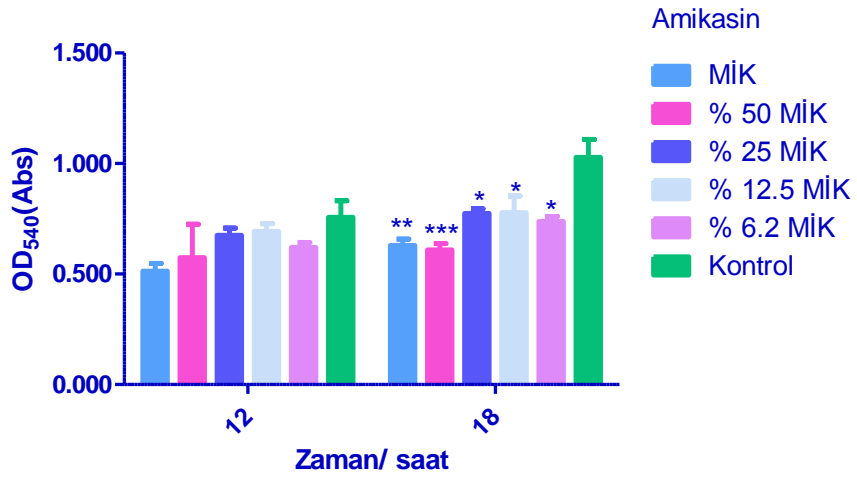
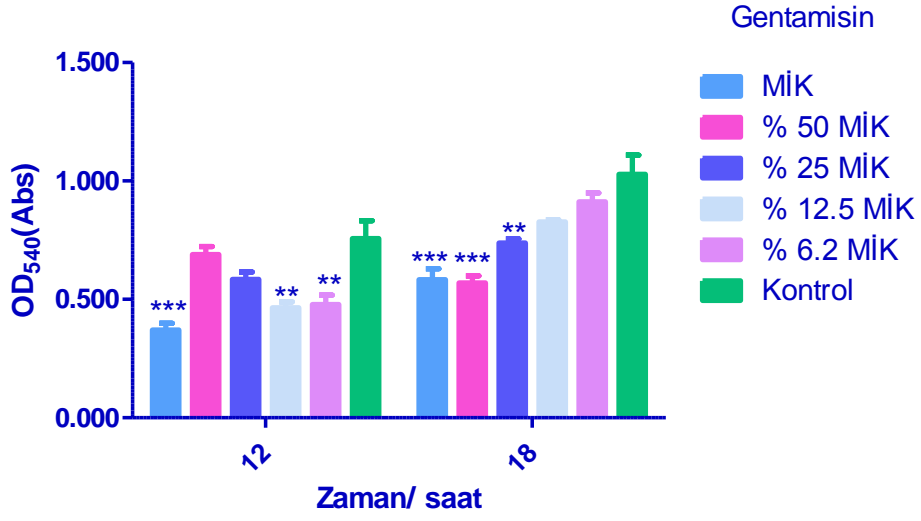
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Grafik 2: K1 suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Grafik 3: K2 suşunun aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.2. Enfeksiyon Modeli Sonuçları

4.2.1. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (*Gentamisin*, *Amikasin*, *Netilmisin*) Etkisinde alkalen proteaz, jelatinaz ve Çoğunluğu Algılama Yanıtları (*rhl* ve *las* Sistemleri) Değerlendirmesi

Kontrol: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücrelerden izole edilen bakterilerin patojenite ve çoğunluğu algılama yanıtları kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol bakterilerinin patojenite alkalen proteaz, jelatinaz ve çoğunluğu algılama yanıtları 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen hücrelerden izole edilen tüm suşların proteaz ve jelatinaz enzimi üretimlerinin olmadığı, *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalışmadığı görüldü (Tablo 8). Aminoglikozidlerin MİK ve sub- MİK yoğunlukları uygulanıp, izole edilen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının proteaz ve jelatinaz enzimi üretimlerinin olmadığı, *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalışmadığı görüldü (Tablo 8).

Altıncı ve 18. saatlerde: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen hücrelerden izole edilen tüm suşların proteaz ve jelatinaz enzimi üretimlerini ürettiği, *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalıştığı belirlendi. Aminoglikozidlerin MİK ve sub- MİK yoğunlukları uygulanıp, izole edilen tüm suşların proteaz ve jelatinaz enzimlerini üretebildiği, *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalıştığı görüldü (Tablo 9).

Dokuz ve 12. saatlerde: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen hücrelerden izole edilen tüm suşların proteaz ve jelatinaz enzimi üretiminin olduğu görüldü. *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalışmadığı görüldü. Aminoglikozidlerin MİK ve sub- MİK yoğunlukları uygulanıp, izole edilen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının proteaz ve jelatinaz enzimlerini üretebildiği belirlendi. Aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde üç suşun *las* ve *rhl* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalışmadığı görüldü (Tablo 10).

Tablo 8: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 0. saatte *las*, *rhl*, proteaz ve jelatinaz yanıtları

<u>0. saat</u>		<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
	<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>ATCC</u>	<i>Jelatinaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>K1</u>	<i>Jelatinaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>K2</u>	<i>Jelatinaz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GN: Gentamisin, **AK:** Amikasin, **NET:** Netilmisin, **las:** *P. aeruginosa*'nın birincil çoğunluğu algılama sistemi, **rhl:** *P. aeruginosa*'nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

Tablo 9: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 6 ve 18. saatlerde *las*, *rhl*, proteaz ve jelatinaz yanıtları

<u>6 ve 18. saatler</u>	<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<i>las</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rhl</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>ATCC</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>las</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rhl</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>las</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rhl</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K2</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, ***las*:** *P. aeruginosa*'nın birincil çoğunluğu algılama sistemi, ***rhl*:** *P. aeruginosa*'nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*.
KONTROL: Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

Tablo 10: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra 9 ve 12. saatlerde *las*, *rhl*, proteaz ve jelatinaz yanıtları

<u>9 ve 12. saatler</u>	<u>MİK</u>			<u>% 50 MİK</u>			<u>% 25 MİK</u>			<u>% 12.5MİK</u>			<u>% 6.2 MİK</u>			<u>KONTROL</u>
	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	<u>GN</u>	<u>AK</u>	<u>NET</u>	
<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>ATCC</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K1</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>las</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rhl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>K2</u> <i>Jelatinaz</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GN: gentamisin, **AK:** amikasin, **NET:** netilmisin, **las:** *P. aeruginosa*' nın birincil çoğunluğu algılama sistemi, **rhl:** *P. aeruginosa*' nın ikincil çoğunluğu algılama sistemi **K1 ve K2:** klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **ATCC:** standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*. **KONTROL:** Aminoglikozid uygulaması olmayan suşlar

4.2.2. Enfekte HEp- 2 Hücrelerinden İzole Edilen Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşlarının, Aminoglikozidlerin (*Gentamisin*, *Amikasin*, *Netilmisin*) Etkisinde Bağlanma Özelliği (*Aljinat Üretimi*)/ *Biyofilm Oluşumu Değerlendirmesi*

Kontrol: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücrelerden izole edilen bakterilerin biyofilm ve bağlanma özellikleri kontrol olarak değerlendirildi.

Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde kontrolün ve aminoglikozid uygulandıktan sonra izole edilen bakterilerin biyofilm ve bağlanma özellikleri kristal viyole boyama yöntemi ile değerlendirildi. **Spekterofotometrede 540 nm dalgaboyunda OD_{besiyeri} 0.79± 0.013 olarak bulundu.** Bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu değerlendirmeleri;

OD_{örnek} ≥ 2 ODb_{besiyeri}, bağlanma-aljinat üretimi olumlu (Kanamaro ve ark, 2006)

OD_{örnek} ≥ 1.00, biyofilm oluşumu olumlu olarak yapılmıştır (Toledo-Arana A ve ark, 2001)

Sıfır ve 6. saatlerde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen hücrelerden (kontrol) ve aminoglikozid uygulamasından sonra hücrelerden izole edilen bakterilerde bağlanma- aljinat üretimi olmadığı görüldü.

Dokuzuncu saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen hücrelerden (kontrol) ve aminoglikozid uygulamasından sonra hücrelerden izole edilen bakterilerde bağlanma- aljinat üretimi olmadığı görüldü.

K1 ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretimi (OD₅₄₀= 0.663± 0.170) olduğu görüldü. Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen bağlanma- aljinat üretiminin kontrolden istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Amikasinin MİK ve % 50 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.01$). Netilmisin MİK yoğunluğunda (bağlanma-aljinat üretimi: OD₅₄₀= 0.149± 0.070) ve % 50 MİK (bağlanma-aljinat üretimi: OD₅₄₀= 0.149± 0.062) yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı belirlendi (grafik 5)

K2 ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretimi (OD₅₄₀= 0.592± 0.025) olduğu görüldü. Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.001$). Amikasin ve netilmisin MİK ve % 50 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı görüldü ($p<0.01$) (Grafik 6).

Onikinci saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretiminin ($OD_{540} = 0.418 \pm 0.081$) olduğu görüldü. Gentamisin MİK yoğunluğundaki bağlanma-aljinat üretiminin ($OD_{540} = 0.296 \pm 0.013$) kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Gentamisin sub-MİK yoğunluklarında bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı görüldü. Amikasin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları etkisindeki enfekte hücrelerden izole edilen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*'nın bağlanma-aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Netilmisin MİK yoğunluğu etkisinde görülen ($OD_{540} = 0.274 \pm 0.077$) bağlanma- aljinat üretiminin kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$) (Grafik 4).

K1 ile enfekte hücreden izole edilen bakterinin bağlanma- aljinat üretimi ($OD_{540} = 0.783 \pm 0.077$) olduğu görüldü. Gentamisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde biyofilm K1 suşunun biyofilm oluşturduğu belirlendi ($p < 0.05$). Amikasin MİK ve % 50 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat baskılandığı görüldü ($p < 0.001$). Netilmisin MİK ve sub- MİK yoğunlukları etkisinde K2 suşunun biyofilm oluşturabildiği görüldü ($p < 0.001$) (Grafik 5).

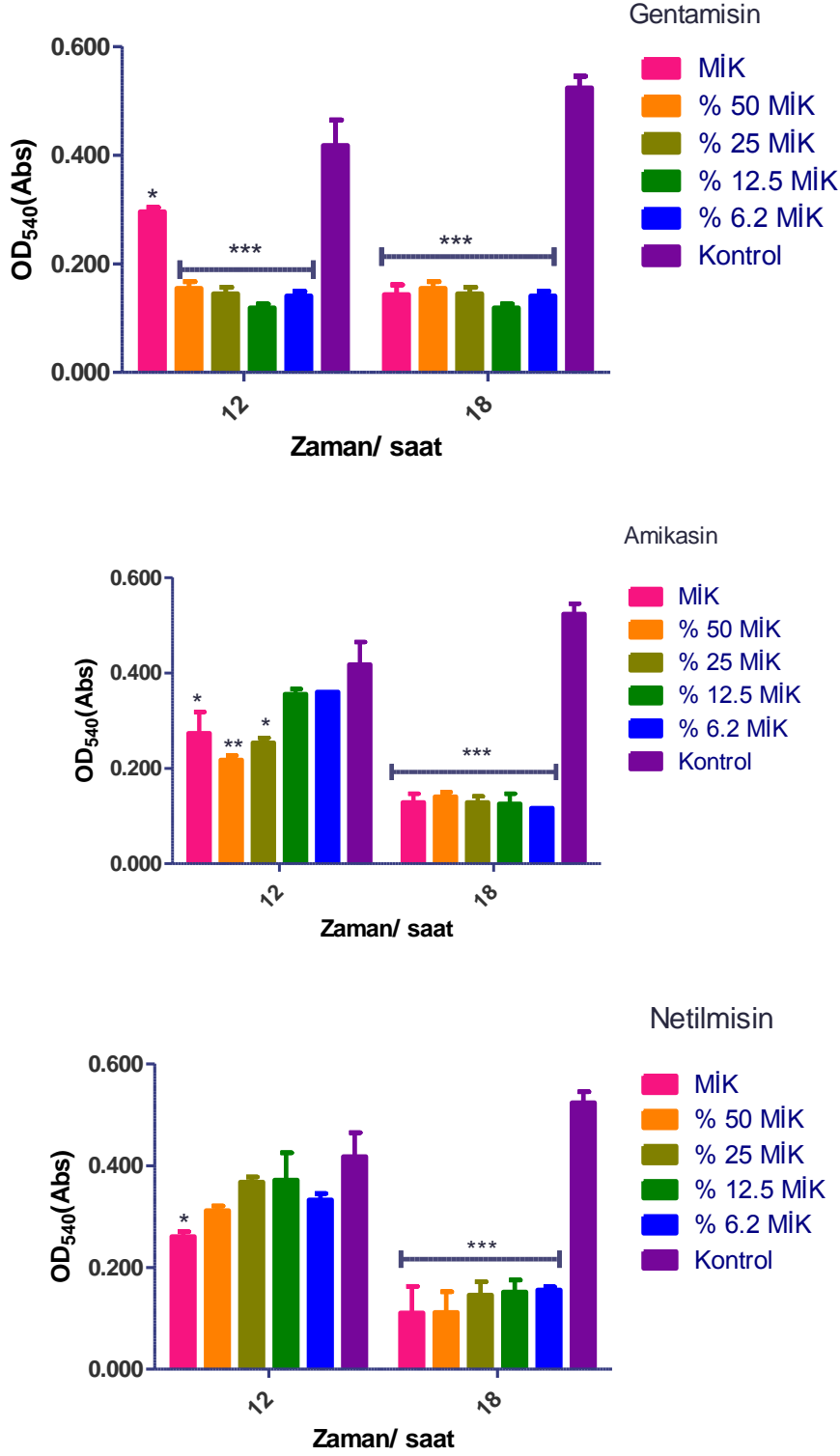
K2 ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin biyofilm oluşturduğu ($OD_{540} = 1.100 \pm 0.220$) görüldü. Gentamisin ve amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde bağlanma-aljinat üretimi ve biyofilm oluşumunun baskılandığı görüldü ($p < 0.001$). Netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde K2 suşunun biyofilm oluşturduğu görüldü. Bu biyofilm oluşumunun kontrolden istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlendi ($p < 0.05$) (Grafik 6).

Onsekizinci saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretiminin (0.424 ± 0.037) olduğu görüldü. Gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı belirlendi ($p < 0.001$). Amikasin ve netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde enfekte hücrelerden izole edilen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*'nın bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı saptandı ($p < 0.001$) (Grafik 4).

K1 ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretimi ($OD_{540} = 0.804 \pm 0.061$) olduğu görüldü. Gentamisin ve netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumunun baskılandığı belirlendi ($p < 0.001$). Amikasin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p < 0.001$) (Grafik 5).

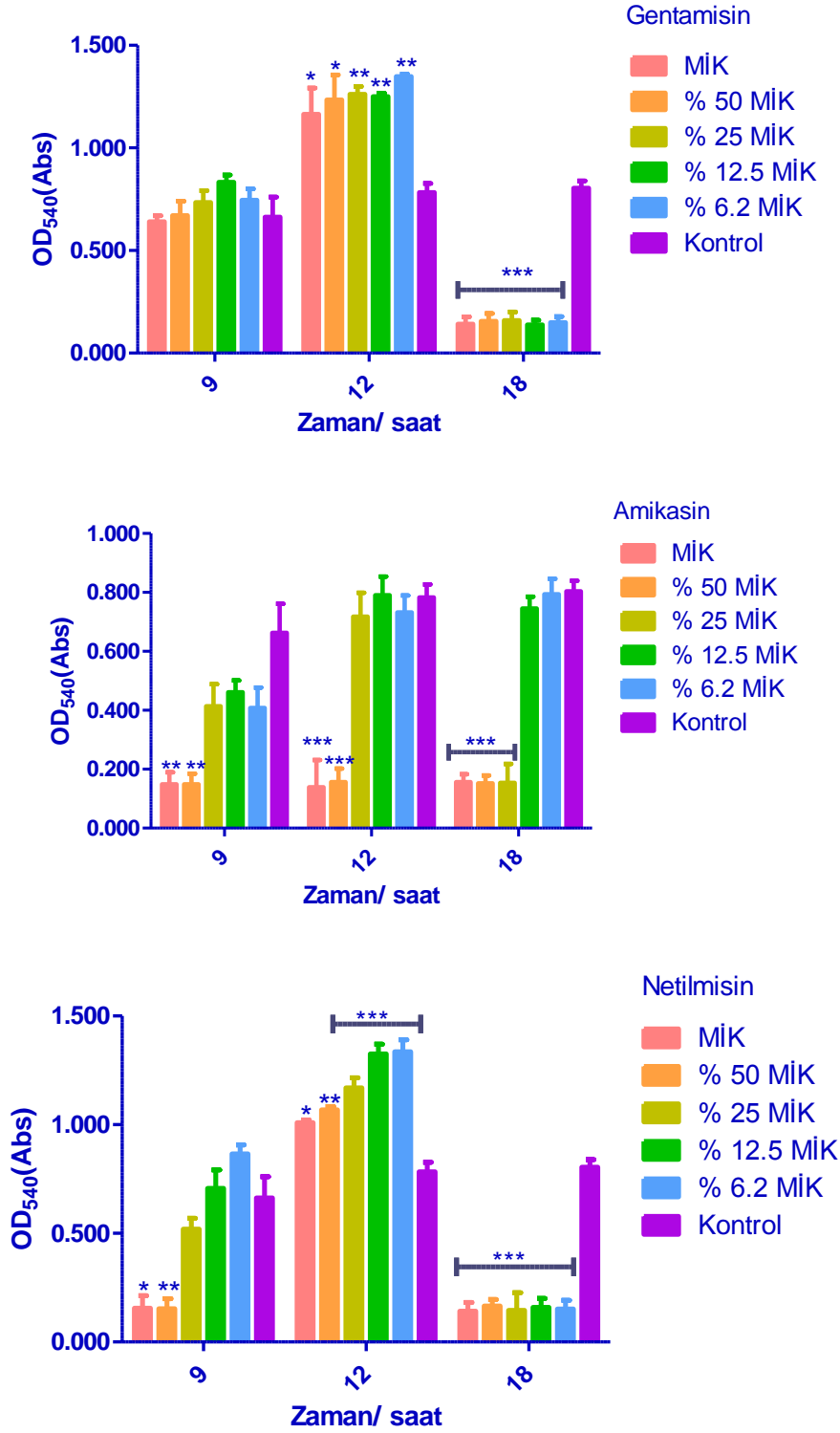
K2 ile enfekte hücreden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat ürettiği ($OD_{540} = 0.791 \pm 0.040$) görüldü. Gentamisin, amikasin ve netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p < 0.001$) (Grafik 6).

Grafik 4: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



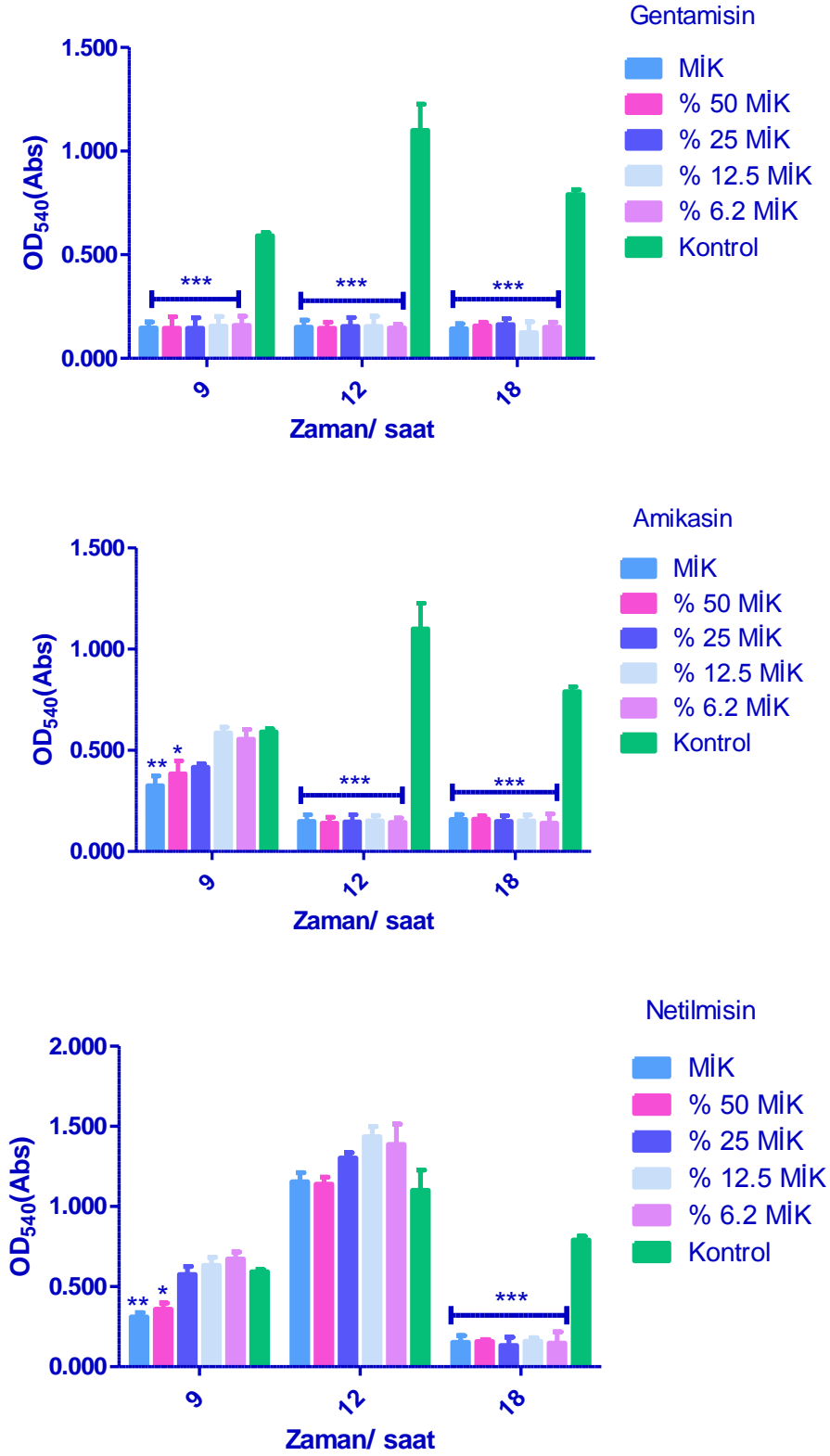
Karşılaştırmalar aminoglikozid uygulaması olmayan kontrole göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; grafikte kullanılan yatay çizgi, sütunlardaki p değerlerinin anlamlılık derecelerinin aynı olduğunu gösterir

Grafik 5: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



Karşılaştırmalar aminoglikozid uygulaması olmayan kontrole göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; grafikte kullanılan yatay çizgi, sütunlardaki p değerlerinin anlamlılık derecelerinin aynı olduğunu gösterir

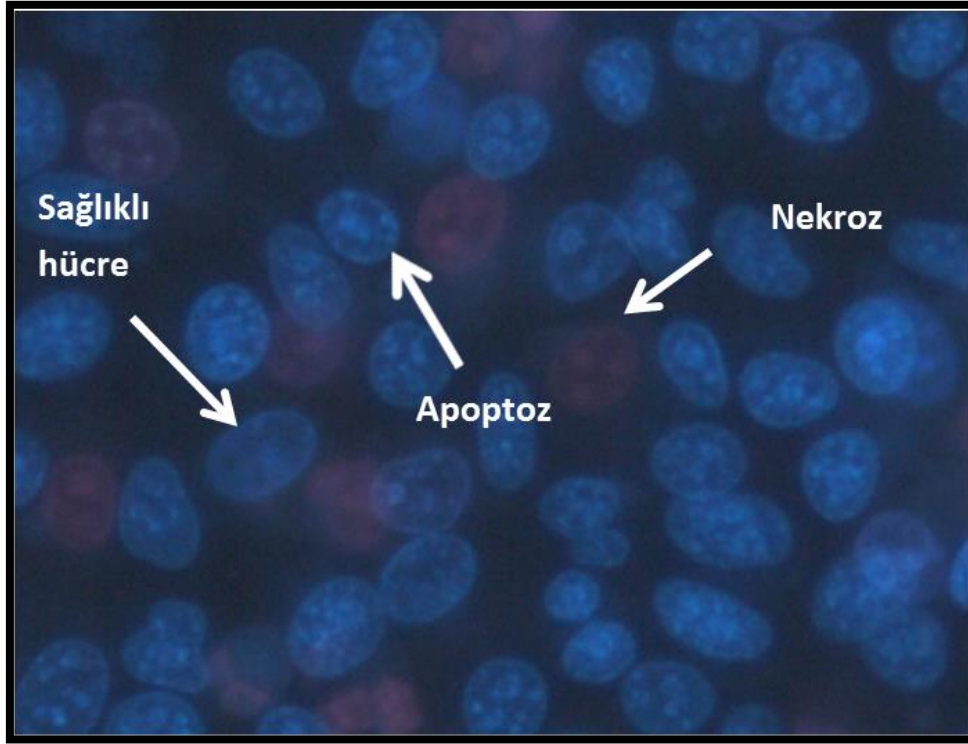
Grafik 6: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonra bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu



Karşılaştırmalar aminoglikozid uygulaması olmayan kontrole göre yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; grafikte kullanılan yatay çizgi, sütunlardaki p değerlerinin anlamlılık derecelerinin aynı olduğunu gösterir

4.2.3. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Apoptoz ve nekroz oluşumları Hoechst 33342 (HOE 33342) ve propidium iodide (PI) ile belirlendi. HOE; çift sarmallı DNA'ların AT'DEN zengin bölgelerine özgün vital bir boyadır. Bu iki boyanın kullanımı, hücre duvarının geçirgenlikleri arasındaki farklılıklara dayanır. Ölü hücreler bu boyalara geçirendir. Canlı hücreler düzgün mavi Hoechst 33342 (HOE) ile boyanırlar. Canlı apoptotik hücreler ise PI' i atabilmesine rağmen HOE boyasını atamazlar ve apoptotik kromotinler belirgin yoğunlukta boyanırlar. PI ise ölü nekrotik hücreleri (pembe renkte) boyar (Resim 1).



Resim 1: Sağlıklı (canlı) hücre, apoptoz ve nekroz görülen hücreler

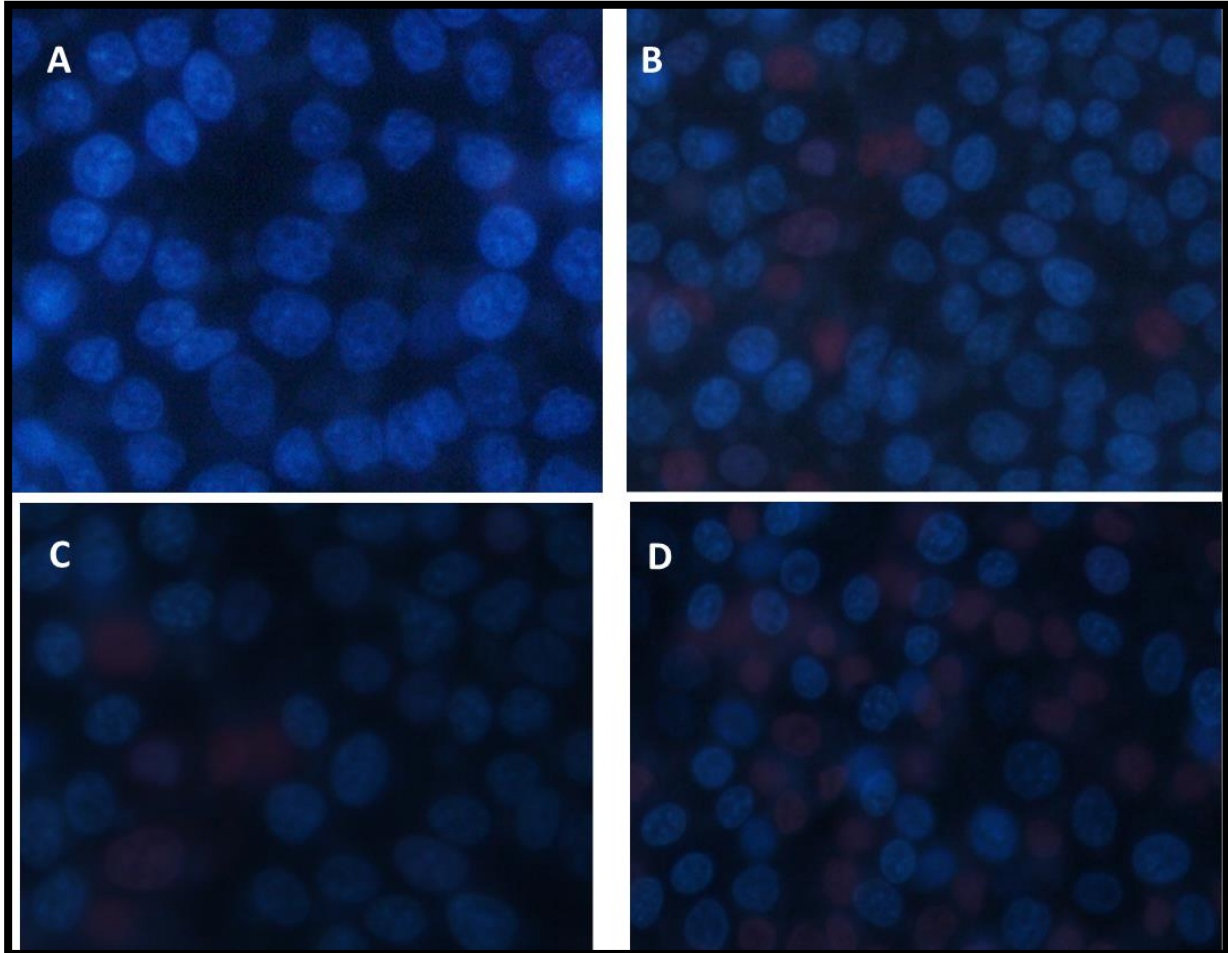
Aminoglikozidler uygulandıktan sonra değerlendirilen apoptoz ve nekroz yanıtlarındaki değişim one-way ANOVA yöntemi ile analiz edildi. Aminoglikozidlerin etkisindeki apoptoz ve nekroz yanıtları "Tukey's Multiple Comparison Test" yöntemi kullanılarak kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2.3.1. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücreleri kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin apoptoz ve nekroz yanıtları 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi.

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin apoptoz yanıtlarının yüzdeleri: 0. saatte % 1.33 ± 0.5 , 6. saatte % 14.6 ± 3.0 , 9. saatte % 35.6 ± 2.0 , 12. saatte % 79.3 ± 15.0 olarak belirlendi.

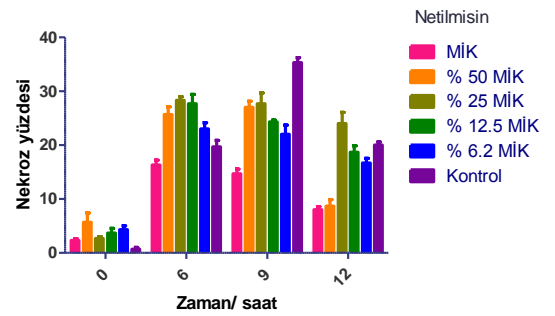
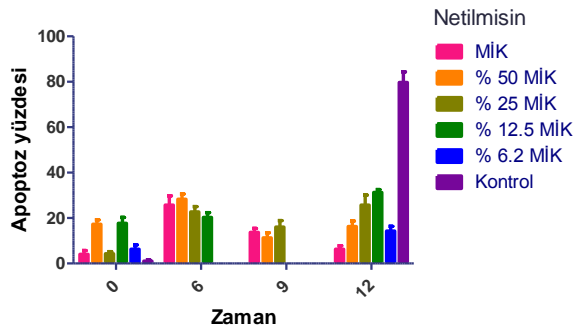
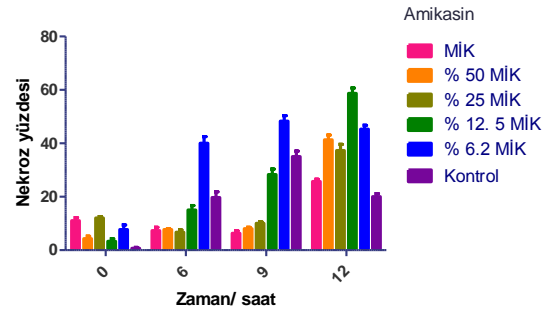
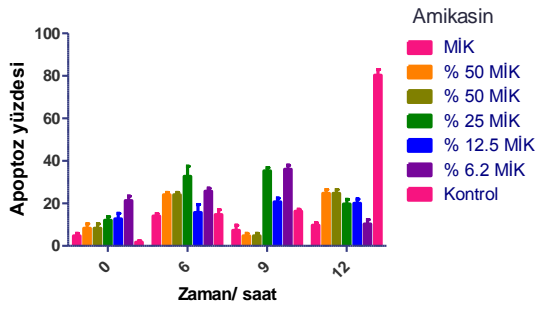
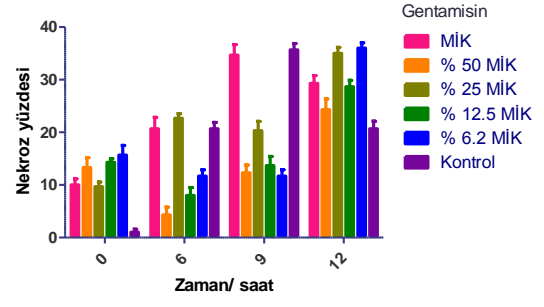
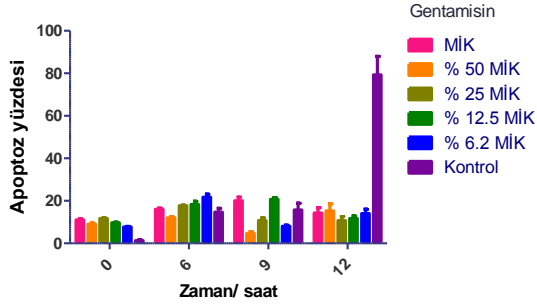
Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin nekroz yanıtlarının yüzdeleri ise; 0. saatte % 1.0 ± 0.5 , 6. saatte 20.6 ± 2.0 , 9. saatte % 35.6 ± 2.0 , 12. saatte % 20.6 ± 2.5 olarak belirlendi (Resim 2).



Resim 2: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerinde apoptoz/ nekroz görüntüleri. **A:** sıfırıncı saat, **B:** altıncı saat, **C:** dokuzuncu saat, **D:** onikinci saat

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 7’ de gösterilmiştir.

Grafik 7: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği



4.2.3.1.1.1. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak gentamisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

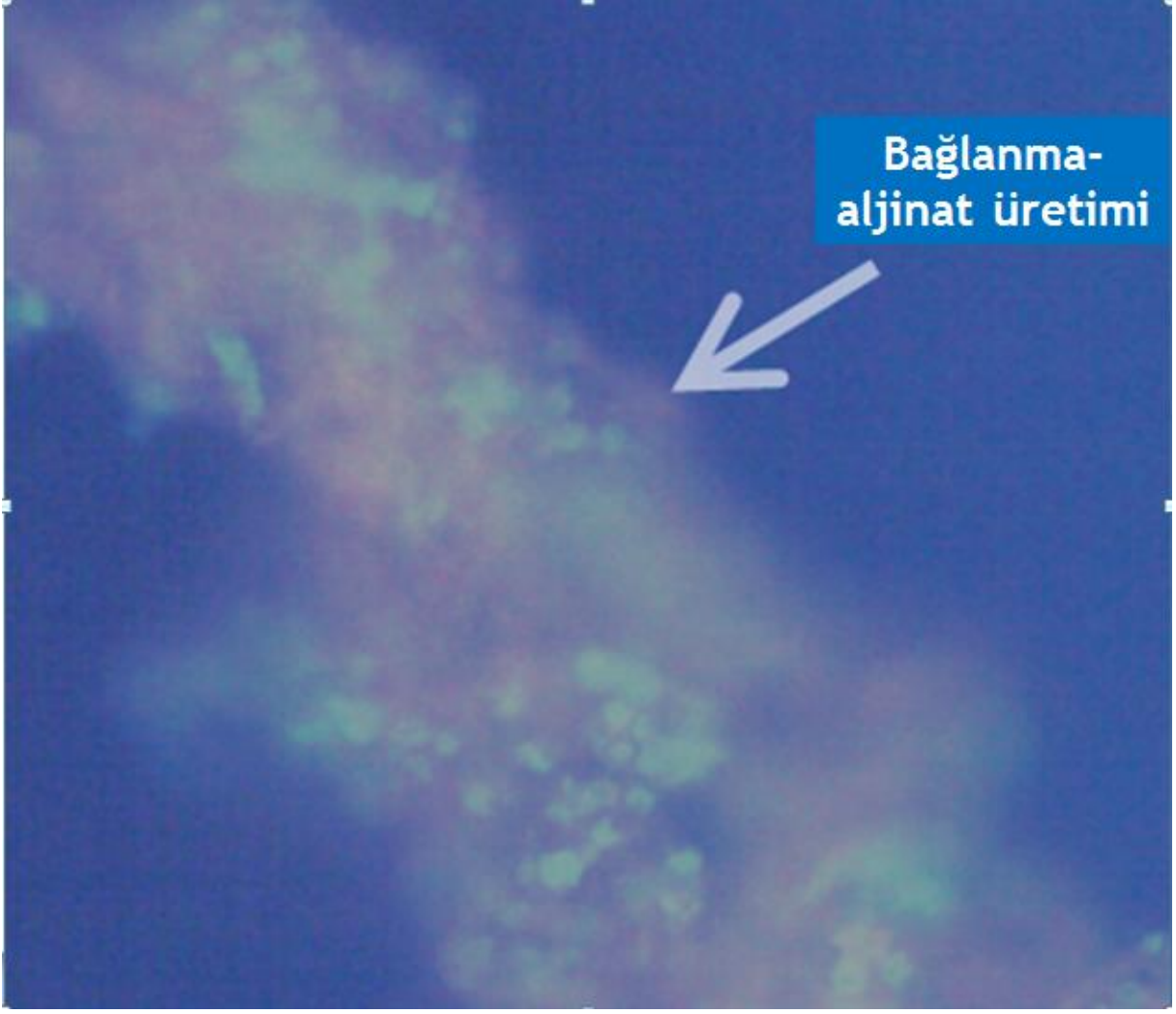
Sıfırıncı saatte: Gentamisin tüm yoğunluklarının etkisinde kontrole göre görülen apoptoz yüzdesindeki artış anlamlı bulunmuştu ($p < 0.001$). Gentamisin MİK yoğunluğu etkisinde 10.0 ± 2.0 , % 25 MİK yoğunluğu etkisinde 9.6 ± 1.5 ($p < 0.01$) ve gentamisin diğer yoğunlukları etkisinde kontrole göre nekroz yanıtının artarak devam ettiği görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 11).

Altıncı saatte: Gentamisin %6.2 MİK yoğunluğu etkisinde 21.6 ± 2.5 görülen apoptoz artışının anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Gentamisin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde 4.3 ± 2.5 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda 8.0 ± 2.6 ($p < 0.001$), % 6.2 MİK etkisinde 11.6 ± 2.0 ($p < 0.001$) olan nekroz yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi (Tablo 11).

Dokuzuncu saatte: Gentamisin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde 4.6 ± 1.5 görülen apoptoz yanıtının kontrole göre anlamlı oranda azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$). Gentamisin %50 MİK yoğunluğundan itibaren başlayan nekroz yanıtındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 11).

Onikinci saatte: Nekroz yanıtları gentamisin MİK yoğunluğu etkisindeki 29.3 ± 2.5 ($p < 0.05$), % 25 MİK etkisinde 35.0 ± 2.0 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde 36.0 ± 1.7 olarak görüldü. Kontrole göre nekroz yanıtlarındaki bu artış anlamlı bulundu (Tablo 11).

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de gentamisin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü. İlginç olarak gentamisin %6.2 MİK yoğunluğu etkisinde bağlanma- alijnat üretiminin olduğu görüldü (Resim 3).



Resim 3: Onsekizinci saatte *ATCC 27853 Pseudomonas aeruginosa* suşunun HEp-2 hücrelerinde görülen bağlanma- aljinat üretimi (gentamisin % 6,2 MİK yoğunluğu)

Tablo 11: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	11.0± 1.0	<0.001	9.0± 1.0	<0.001	11.6± 0.5	<0.001	9.6±0.5	<0.001	7.6± 0.5	<0.001	1.33± 0.5
	Nekroz	10.0± 2.0	<0.01	13.3±3.2	<0.001	9.6± 1.5	<0.01	14.3±1.1	<0.001	15.5± 3.2	<0.001	1.0± 0.5
6. saat	Apoptoz	16.0± 1.0	> 0.05	12.0±1.0	> 0.05	17.6± 0.5	> 0.05	18.3± 2.5	> 0.05	21.6± 2.5	<0.05	14.6± 3.0
	Nekroz	20.6± 3.7	> 0.05	4.3±2.5	<0.001	22.6± 1.5	> 0.05	8.0± 2.6	<0.001	11.6± 2.0	<.001	20.6± 2.0
9. saat	Apoptoz	20.0± 3.0	> 0.05	4.6± 1.5	<0.001	10.6± 2.3	> 0.05	20.6± 1.5	> 0.05	8.0± 1.0	> 0.05	15.6± 5.0
	Nekroz	29.3± 2.5	> 0.05	12.3± 2.5	<0.001	20.3± 3.0	<0.001	13.6± 3.0	<0.001	11.6± 2.0	<0.001	35.6± 2.0
12. saat	Apoptoz	14.3± 4.1	> 0.05	15.3± 5.5	> 0.05	10.6± 3.2	> 0.05	11.6± 2.0	> 0.05	14.0± 3,0	> 0.05	79.3± 15.0
	Nekroz	29.3± 2.5	<0.05	24.3± 3.5	> 0.05	35.0± 2.0	<0.001	28.6± 2.0	<0.05	36.0± 1.7	<0.001	20.6± 2.5

KONTROL: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **GN:** Gentamisin. Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.2. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* İle Enfekte Edilip; Amikasinin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Amikasinin % 25 MİK yoğunluğu etkisinde % 12.0 ± 3.0 ($p < 0.05$), % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde % 12.6 ± 4.5 ($p < 0.05$) ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 21.3 ± 3.5 ($p < 0.001$) olarak görüldü. Kontrole göre apoptoz yanıtlarındaki bu artış anlamlı bulundu. Amikasinin MİK yoğunluğu etkisinde % 11.0 ± 2.0 ($p < 0.001$), % 25 MİK' te % 12.0 ± 1.0 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda % 7.6 ± 3.05 ($p < 0.01$) olan nekroz yanıtlarının kontrole göre artışı anlamlı bulundu (Tablo 12).

Altıncı saatte: Amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda görülen % 32.6 ± 8.3 apoptoz yanıtının kontrole göre artışının anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.01$). Nekroz yanıtları MİK yoğunluğu etkisinde % 7.3 ± 2.0 , % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 7.6 ± 1.5 % 25 MİK yoğunluğu etkisinde % 15.0 ± 3.0 olarak görüldü ($p < 0.01$). Kontrole göre nekroz yanıtlarındaki bu azalış anlamlı bulundu. İlginç olarak amikasinin % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 40.0 ± 4.3 nekroz yanıtındaki bu artış anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 12).

Dokuzuncu saatte: Amikasinin MİK yoğunluğu etkisinde % 7.3 ± 4.1 ($p < 0.05$) ve %50 MİK yoğunluğu etkisinde % 4.6 ± 2.0 ($p < 0.01$) bulunan apoptoz yanıtlarının kontrole göre azaldığı belirlendi. Amikasinin % 25 MİK yoğunluğu etkisinde % 35.3 ± 2.5 ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 36.0 ± 3.4 olan apoptoz yanıtlarının kontrole göre arttığı saptandı ($p < 0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğunda % 6.3 ± 1.5 , % 50 MİK yoğunluğunda % 8.0 ± 1.0 ve % 25 MİK yoğunluğunda % 10.0 ± 1.0 olan nekroz yanıtlarının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.001$). Amikasinin % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 48.33 ± 3.5 olan nekroz yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 12).

Onikinci saatte: Amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde kontrole göre apoptoz yanıtında azalma anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Amikasinin %50 MİK yoğunluğundan itibaren nekroz yanıtında artış saptandı. Kontrole göre nekroz yanıtındaki bu artış anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 12).

Altıncı saatte, amikasinin % 25 MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin olduğu görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de amikasin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 12: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	4.6± 2.0	> 0.05	8.3± 3.5	> 0.05	12.0± 3.0	<0.05	12.6± 4.5	<0.05	21.3± 3.5	<0.001	1.33± 0.5
	Nekroz	11.0± 2.0	<0.001	4.3± 1.5	> 0.05	12.0± 1.0	<0.001	3.3± 1.5	> 0.05	7.6± 3.05	<0.01	1.0± 0.5
6. saat	Apoptoz	14.0 ± 2.0	> 0.05	24.0± 2.0	> 0.05	32.6± 8.3	<0.01	15.6± 6.5	> 0.05	25.6± 2.5	> 0.05	14.6± 3.0
	Nekroz	7.3± 2.0	<0.01	7.6±1.5	<0.01	6.6± 1.5	<0.01	15.0± 3.0	> 0.05	40.0± 4.3	<.001	20.6± 2.0
9. saat	Apoptoz	7.3± 4.1	<0.05	4.6± 2.0	<0.01	35.3 ± 2.5	<0.001	20.6± 3.0	> 0.05	36.0± 3.4	<0.001	15.6± 5.0
	Nekroz	6.3± 1.5	<0.001	8.0± 1.0	<0.001	10.0± 1.0	<0.001	28.3±3.5	> 0.05	48.33±3.5	<0.001	35.6± 2.0
12. saat	Apoptoz	9.6± 2.0	<0.001	24.6± 3.0	<0.001	19.6±3.7	<0.001	20.0± 3.6	<0.001	10.3±3.5	<0.001	79.3± 15.0
	Nekroz	25.6± 1.5	> 0.05	41.3± 3.0	<0.001	37.3± 4.0	<0.001	58.6± 3.5	<0.001	45.3± 2.5	<0.001	20.6± 2.5

KONTROL: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **AK:** Amikasin Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.3. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Netilmisin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 17.3 ± 3.2 , %12.5 MİK yoğunluğu etkisinde % 17.6 ± 4.5 olarak belirlenen apoptoz yanıtlarının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). amikasinin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 5.6 ± 3.0 olan nekroz yanıtının kontrole göre arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo 13).

Altıncı saatte: Netilmisin %50 MİK yoğunluğu etkisinde % 25.6 ± 7.0 olan apoptoz yanıtının kontrole göre arttığı saptandı ($p < 0.05$). Netilmisin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 25.6 ± 2.5 ($p < 0.05$), % 25 MİK yoğunluğu etkisinde % 28.3 ± 1.1 ($p < 0.01$), % 12.5 yoğunluğu etkisinde % 27.6 ± 3.0 ($p < 0.01$) olan nekroz yanıtlarının kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 13).

Dokuzuncu saatte: Netilmisin etkisinde HEp-2 hücrelerinin apoptoz yüzdelerindeki değişimin kontrole göre anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Netilmisin MİK yoğunluğu etkisinde % 14.6 ± 1.5 ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 27.0 ± 2.0 ($p < 0.01$), % 25 MİK yoğunluğu etkisinde % 27.6 ± 3.5 ($p < 0.05$), % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde % 24.3 ± 0.5 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 22.0 ± 3.0 ($p < 0.001$) olarak nekroz yanıtları saptandı. Netilmisin etkisinde kontrole göre nekroz yanıtındaki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 13).

Onikinci saatte: Netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde hücrelerdeki apoptoz yüzdeleri kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.001$). Netilmisin MİK yoğunluğu etkisinde % 8.0 ± 1.0 ve % 50 MİK yoğunluğu etkisinde % 8.6 ± 2.0 olan nekroz yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 13).

Altıncı saatte netilmisin % 25 MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde, **12. saatte** netilmisin MİK, % 50 MİK, % 25 MİK ve % 12.5 MİK yoğunlukları etkisinde “**aljinat**” yapısının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de netilmisin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 13: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	4.0± 3.0	> 0.05	17.3± 3.2	<0.001	4.3±1.5	> 0.05	17.6± 4.5	<0.001	6.3±3.2	> 0.05	1.33± 0.5
	Nekroz	2.3±0.5	> 0.05	5.6±3.0	<0.05	2.6±0.5	> 0.05	3.6±1.5	> 0.05	4.3± 1.1	> 0.05	1.0± 0.5
6. saat	Apoptoz	25.6± 7.0	<0.05	28.3± 4.0	> 0.05	22.6±4.1	> 0.05	20.3±3.5	> 0.05	22.6±4.1	> 0.05	14.6± 3.0
	Nekroz	16.3±1.5	> 0.05	25.6±2.5	<0.05	28.3±1.1	<0.01	27.6±3.0	<0.01	23.0±2.0	> 0.05	20.6± 2.0
9. saat	Apoptoz	13.6± 6.3	> 0.05	11.3± 3.7	> 0.05	16.0±5.0	> 0.05	13.6± 3.0	> 0.05	11.3±3.7	> 0.05	15.6± 5.0
	Nekroz	14.6±1.5	<0.001	27.0±2.0	<0.01	27.6±3.5	<0.05	24.3±0.5	<0.001	22.0± 3.0	<0.001	35.6± 2.0
12. saat	Apoptoz	6.3± 2.5	<0.001	16.3±4.1	<0.001	25.6±7.7	<0.001	31.3± 2.0	<0.001	14.3±3.5	<0.001	79.3± 15.0
	Nekroz	8.0± 1.0	<0.001	8.6± 2.0	<0.001	24.0±3.6	> 0.05	18.6± 2.0	> 0.05	16.6±1.5	> 0.05	20.6± 2.5

KONTROL: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **NET:** Netilmisin. Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir

4.2.3.2. K1 Suşu İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

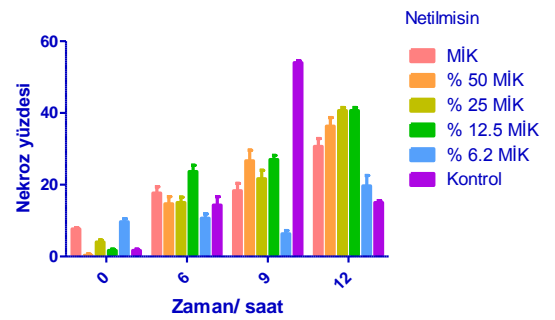
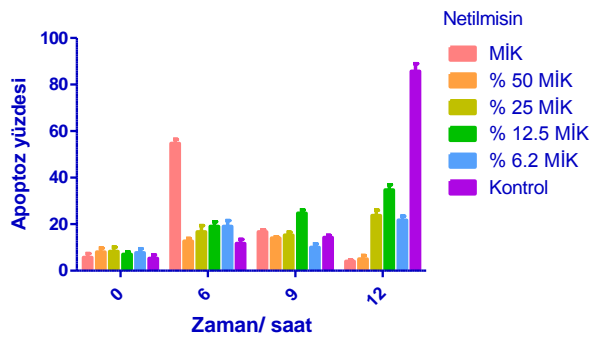
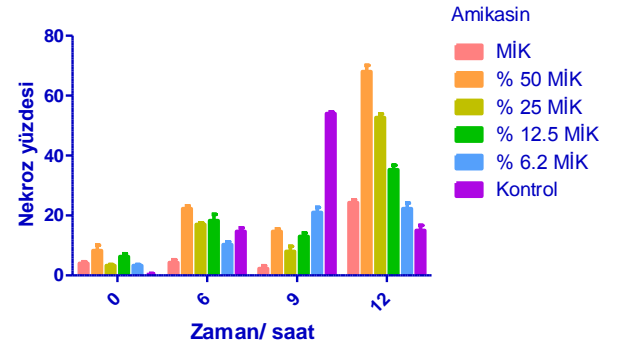
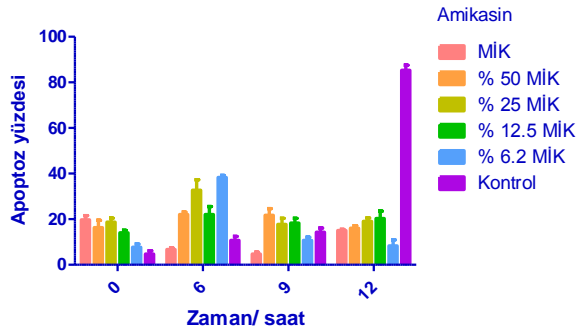
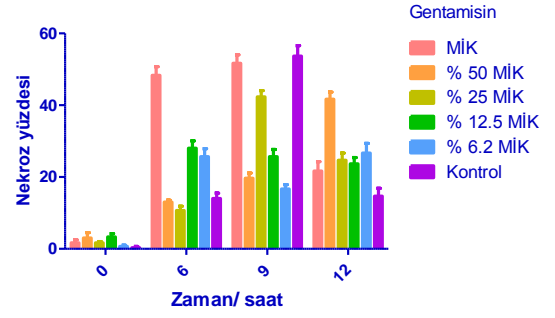
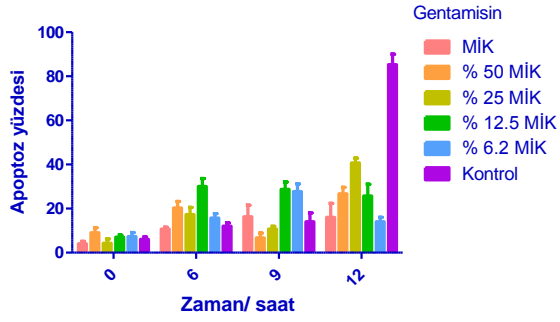
Kontrol: K1 suşu ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücreleri kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin apoptoz ve nekroz yanıtları 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi.

K1 suşu ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin apoptoz yanıtlarının yüzdeleri: 0. saatte % 6.0 ± 2.0 , 6. saatte % 12.0 ± 2.6 , 9. saatte % 14.0 ± 7.0 , 12. saatte % 85.3 ± 8.0 olarak belirlendi.

Kontrol hücrelerinin nekroz yanıtlarının yüzdeleri ise; 0. saatte % 0.3 ± 0.5 , 6. saatte 14.0 ± 2.6 , 9. saatte % 53.6 ± 5.0 , 12. saatte % 14.6 ± 3.7 olarak belirlendi.

K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 8' de gösterilmiştir.

Grafik 8: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği



4.2.3.1.2.1. K1 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K1 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saat: Gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde kontrole göre apoptoz ve nekroz yüzdelerinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$) (Tablo 14).

Altıncı saatte: Gentamisinin MİK yoğunluğu etkisinde 10.6 ± 1.5 ($p < 0.05$) olan apoptoz yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi. Gentamisinin % 25 MİK yoğunluğunda 17.3 ± 5.5 ($p < 0.001$) olarak belirlenen apoptoz yanıtının kontrole göre arttığı saptandı. Gentamisinin MİK yoğunluğu etkisinde 48.3 ± 4.1 ($p < 0.001$) ve %12.5 MİK yoğunluğu etkisinde 28.0 ± 3.6 ($p < 0.01$) olan nekroz yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü (Tablo 14).

Dokuzuncu saatte: Gentamisinin tüm yoğunluklarında kontrole göre artan apoptoz yanıtındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). gentamisinin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde 19.6 ± 2.5 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğu etkisinde 42.3 ± 3.05 ($p < 0.05$), % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde 25.6 ± 3.5 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde 16.6 ± 2.0 ($p < 0.001$) olarak görülen nekroz yanıtlarının kontrole göre azaldığı belirlendi (Tablo 14).

Onikinci saatte: Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde belirlenen apoptoz yüzdelerindeki azalış kontrole göre anlamlı bulundu ($p < 0.001$). gentamisinin % 50 MİK yoğunluğunda 41.6 ± 3.5 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda 26.6 ± 4.7 ($p < 0.05$) olarak belirlenen nekroz yüzdelerinin kontrole göre arttığı saptandı (Tablo 14).

Altıncı saatte gentamisinin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları etkisinde, “**aljinat**” yapının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de gentamisin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 14: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

	<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	
0. saat											
Apoptoz	4.0±2.0	> 0.05	9.0±4.0	> 0.05	4.3±3.2	> 0.05	7.0±1.7	> 0.05	7.3±3.0	> 0.05	6.0± 2.0
Nekroz	1.6± 1.5	> 0.05	3.0±2.6	> 0.05	1.6±0.5	> 0.05	3.3± 1.5	> 0.05	0.6±0.5	> 0.05	0.3±0.5
6. saat											
Apoptoz	10.6±1.5	<0.05	20.3±4.9	> 0.05	17.3±5.5	<0.001	30.0±6.2	> 0.05	15.6±6.1	> 0.05	12.0±2.6
Nekroz	48.3±4.1	<0.001	13.0± 1.0	> 0.05	10.6±2.08	> 0.05	28.0± 3.6	<0.01	25.6± 3.7	<0.01	14.0±2.6
9. saat											
Apoptoz	16.3±9.0	> 0.05	6.6±3.7	> 0.05	10.6±2.3	> 0.05	28.6±5.7	> 0.05	27.6±6.1	> 0.05	14.0± 7.0
Nekroz	51.6±4.0	> 0.05	19.6±2.5	<0.001	42.3±3.05	<0.05	25.6± 3.5	<0.001	16.6± 2.0	<0.001	53.6± 5.0
12. saat											
Apoptoz	16.0±11.0	<0.001	26.6±5.1	<0.001	40.6±3.7	<0.001	25.6±9.2	<0.001	14.0±3.6	<0.001	85.3±8.0
Nekroz	21.6±4.5	> 0.05	41.6±3.5	<0.001	24.6±3.5	> 0.05	23.6± 3.0	> 0.05	26.6± 4.7	<0.05	14.6± 3.7

KONTROL: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **GN:** Gentamisin.

Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.2.2. K1 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz- Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K1 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte. Amikasinin MİK yoğunluğunda 19.6 ± 3.2 ($p < 0.01$), % 50 MİK yoğunluğunda 16.3 ± 5.5 ($p < 0.05$), % 25 MİK yoğunluğunda 14.0 ± 2.0 ($p < 0.05$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda 14.0 ± 2.0 ($p < 0.05$) olarak belirlenen apoptoz yüzdelерinin kontrole göre arttığı saptandı. Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda 8.3 ± 3.0 ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda 6.3 ± 1.5 ($p < 0.01$) olan nekroz yanıtlarının kontrole göre arttığı görüldü (Tablo 15).

Altıncı saatte: Apoptoz yanıtları amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda 32.6 ± 8.0 ve % 6.2 MİK yoğunluğunda 38.3 ± 1.5 olarak belirlendi. Kontrole göre apoptoz yanıtlarındaki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğu etkisinde nekroz yanıtının % 4.3 ± 1.5 olduğu ve kontrole göre bu azalmanın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Amikasinin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde ise, % 22.3 ± 1.5 olduğu ve kontrole göre bu artışın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.01$) (Tablo 15).

Dokuzuncu saatte: Amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde kontrole göre apoptoz yanıtındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde nekroz yanıtındaki azalmanın kontrole göre anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 15).

Onikinci saatte: Amikasinin tüm yoğunluklarında belirlenen apoptoz yanıtındaki azalmanın kontrole göre anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğunda 24.3 ± 1.5 ($p < 0.05$), % 50 MİK yoğunluğunda 68.0 ± 3.6 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda 52.6 ± 2.0 ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda 35.3 ± 2.5 olan nekroz yanıtlarının kontrole göre arttığı saptandı (Tablo 15).

Altıncı saatte amikasinin % 50 MİK yoğunluğu etkisinde “**aljinat**” yapının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de amikasinin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 15: K1 ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	19.6±3.2	<0.01	16.3±5.5	<0.05	18.6± 3.0	<0.01	14.0± 2.0	<0.05	7.6±2.5	> 0.05	6.0± 2.0
	Nekroz	4.0± 1.0	> 0.05	8.3± 3.0	<0.001	3.3± 0.5	> 0.05	6.3± 1.5	<0.01	3.3± 0.5	> 0.05	0.3±0.5
6. saat	Apoptoz	6.6±1.1	> 0.05	22.0±2.0	> 0.05	32.6± 8.0	<0.001	22.0± 6.0	> 0.05	38.3± 1.5	<0.001	12.0±2.6
	Nekroz	4.3± 1.5	<0.001	22.3± 1.5	<0.01	17.0± 1.0	> 0.05	18.3±3.5	> 0.05	10.3± 1.5	> 0.05	14.0±2.6
9. saat	Apoptoz	4.6±1.5	> 0.05	21.6±5.1	> 0.05	17.6±4.7	> 0.05	18.3±3.5	> 0.05	10.6± 2.5	> 0.05	14.0± 7.0
	Nekroz	2.3± 1.5	<0.001	14.6± 1.5	<0.001	8.0± 3.0	<0.001	13.0± 2.0	<0.001	21.0 ±3.0	<0.001	53.6± 5.0
12. saat	Apoptoz	15.0±1.0	<0.001	16.0±2.0	<0.001	19.0± 2.6	<0.001	20.3±5.5	<0.001	8.3±4.5	<0.001	85.3±8.0
	Nekroz	24.3±1.5	<0.05	68.0±3.6	<0.001	52.6± 2.0	<0.001	35.3± 2.5	<0.001	22.3±3.2	> 0.05	14.6± 3.7

KONTROL: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **AK:** Amikasin Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.2.3. K1 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K1 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Netilmisinin MİK yoğunluğundaki % 5.6±2.8 olarak belirlenen apoptoz yüzdesinin kontrole göre azalışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). netilmisinin sub-MİK yoğunlukları etkisinde kontrole göre artan apoptoz yanıtlarındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 16).

Altıncı saatte: Netilmisinin MİK yoğunluğunda % 54.6± 3.0 olan apoptoz yüzdesinin kontrole göre arttığı belirlendi ($p <0.001$). Netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğunda % 23.6± 3.0 olan nekroz yanıtının kontrole göre arttığı saptandı ($p <0.05$) (Tablo 16).

Dokuzuncu saatte: Netilmisinin tüm yoğunlukları etkisindeki apoptoz yüzdelerindeki değişimin kontrole göre anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Netilmisinin tüm yoğunluklarında belirlenen nekroz yüzdelerindeki azalışın kontrole göre anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 16).

Onikinci saatte: Netilmisinin tüm yoğunluklarında görülen apoptoz oranındaki azalışın kontrole göre anlamlı olduğu saptandı ($p <0.001$). Netilmisinin MİK, % 50 MİK, % 25 MİK, % 12.5 MİK yoğunluklarında belirlenen nekroz oranındaki artışın kontrole göre anlamlı olduğu belirlendi ($p <0.001$) (Tablo 16).

Onikinci saatte netilmisinin % 25 MİK yoğunluğundan itibaren “**aljinat**” yapının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de netilmisinin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 16: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	5.6±2.8	> 0.05	8.0±3.0	> 0.05	8.3±3.0	> 0.05	7.0±2.0	> 0.05	7.6±3.0	> 0.05	6.0± 2.0
	Nekroz	7.6± 0.5	<0.001	0.3±0.5	> 0.05	4.0±1.0	> 0.05	1.6±0.5	> 0.05	9.6±1.5	<0.001	0.3±0.5
6. saat	Apoptoz	54.6±3.0	<0.001	12.6±2.0	> 0.05	16.6±4.7	> 0.05	19.0±3.6	> 0.05	19.0±4.3	> 0.05	12.0±2.6
	Nekroz	17.6± 3.0	> 0.05	14.6± 3.5	> 0.05	15.0±2.6	> 0.05	23.6±3.0	<0.05	10.6± 2.0	> 0.05	14.0±2.6
9. saat	Apoptoz	16.6±1.5	> 0.05	14.0±1.0	> 0.05	15.3±2.0	> 0.05	24.6±2.5	> 0.05	10.0±2.6	> 0.05	14.0± 7.0
	Nekroz	18.3±3.5	<0.001	26.6± 5.1	<0.001	21.6±4.04	<0.001	27.0±2.0	<0.001	6.3±1.5	<0.001	53.6± 5.0
12. saat	Apoptoz	4.0±1.0	<0.001	5.0±2.6	<0.001	23.6±4.1	<0.001	23.6±4.1	<0.001	21.6±3.0	<0.001	85.3±8.0
	Nekroz	30.6±3.7	<0.001	36.3±4.1	<0.001	40.6±1.5	<0.001	40.6±1.5	<0.001	19.6±5.0	> 0.05	14.6± 3.7

KONTROL: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **NET:** Netilmisin Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.3. K2 Suşu İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

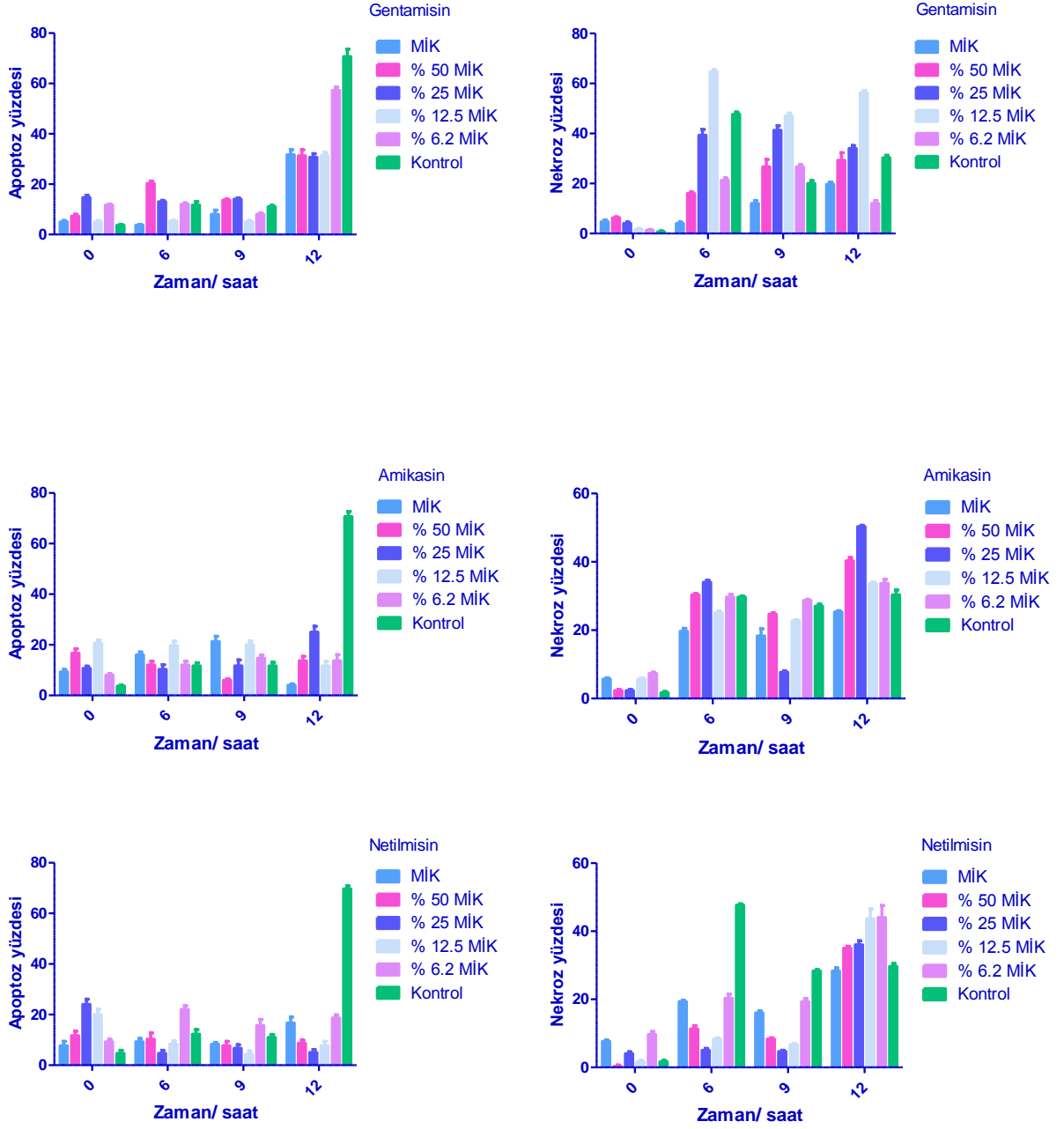
Kontrol: K2 suşu ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücreleri kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin apoptoz ve nekroz yanıtları 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi.

K2 suşu ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin apoptoz yanıtlarının yüzdeleri: 0. saatte % 3.6 ± 0.5 , 6. saatte % 11.6 ± 2.5 , 9. saatte % 11.0 ± 1.0 , 12. saatte % 70.6 ± 5.13 olarak belirlendi.

Kontrol hücrelerinin nekroz yanıtlarının yüzdeleri ise; 0. saatte % 1.6 ± 0.5 , 6. saatte 14.3 ± 4.0 , 9. saatte % 54.0 ± 1.0 , 12. saatte % 15.0 ± 1.0 olarak belirlendi.

K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 9' da gösterilmiştir.

Grafik 9: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının kinetiği



4.2.3.1.3.1. K2 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K2 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Gentamisinin % 50 MİK yoğunluğundaki % 7.3 ± 1.1 ($p < 0.01$) ve % 25 MİK yoğunluğundaki % 14.6 ± 1.5 ($p < 0.001$) olan apoptoz yüzdesi, kontrole göre arttığı saptandı. Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen nekroz yüzdesindeki değişimin kontrole göre anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (Tablo 17).

Altıncı Saatte: Gentamisinin MİK yoğunluğu etkisinde % 3.6 ± 0.5 ($p < 0.001$) ve % 12.5 yoğunluğu etkisinde % 5.3 ± 0.5 ($p < 0.01$) olan apoptoz yüzdesinin, kontrole göre azaldığı görüldü. Gentamisinin % 50 MİK yoğunluğunda ise % 20.3 ± 1.5 ($p < 0.001$) olan apoptoz yüzdesinin, kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 17).

Dokuzuncu Saatte: Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen apoptoz yüzdesindeki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde belirlenen nekroz yanıtlarındaki değişimin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 17).

Onikinci saatte: Gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde belirlenen apoptoz yanıtlarındaki azalmanın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$). Gentamisinin % 50 MİK yoğunluğunda % 41.6 ± 3.5 ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde % 16.6 ± 4.7 ($p < 0.05$) belirlenen nekroz yüzdesinin kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 17).

Altıncı saatte gentamisinin % 25 MİK yoğunluğu etkisinde, **dokuzuncu saatte** gentamisinin % 25 MİK ve % 12.5 MİK yoğunlukları etkisinde “**aljinat**” yapının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de gentamisin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 17: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine gentamisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	5.0±1.0	> 0.05	7.3±1.1	<0.01	14.6±1.5	<0.001	5.0± 1.0	> 0.05	11.6±0.5	<0.001	3.6±0.5
	Nekroz	1.6±1.5	> 0.05	3.0± 2.6	> 0.05	1.6± 0.5	> 0.05	3.3± 1.5	> 0.05	0.6± 0.5	> 0.05	1.6 ± 0.5
6. saat	Apoptoz	3.6±0.5	<0.001	20.3±1.5	<0.001	13.0±1.0	> 0.05	5.3± 0.5	<0.01	12.0±1.0	> 0.05	11.6±2.5
	Nekroz	48.3± 4.1	<0.001	13.0± 1.0	> 0.05	10.6± 2.0	> 0.05	28.0± 3.6	<0.01	25.6± 3.7	<0.01	14.3±4.0
9. saat	Apoptoz	8.0±3.0	> 0.05	13.6±0.5	> 0.05	14.0±1.0	> 0.05	5.0± 1.0	<0.01	8.0±1.0	> 0.05	11.0±1.0
	Nekroz	51.6± 4.0	<0.001	19.6± 2.5	<0.001	42.3± 3.0	<0.05	25.6± 3.5	<0.001	16.6± 2.0	<0.001	54.0± 1.0
12. saat	Apoptoz	31.6±3.5	<0.001	31.3±4.0	<0.001	30.6±2.5	<0.001	31.3± 2.0	<0.001	57.3±5.0	<0.01	70.6±5.13
	Nekroz	21.6± 4.5	> 0.05	41.6± 3.5	<0.001	24.6± 3.5	> 0.05	23.6± 3.0	> 0.05	16.6± 4.7	<0.05	15.0± 1.0

KONTROL: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **GN:** Gentamisin Kontrol değerine göre değişim sorugulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.3.2. K2 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz- Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K2 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Amikasinin MİK yoğunluğunda % 9.3 ± 1.5 ($p < 0.05$), % 50 MİK yoğunluğunda % 16.6 ± 3.0 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda % 10.6 ± 1.5 ($p < 0.01$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda % 20.6 ± 2.0 ($p < 0.001$) olan apoptoz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi. Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda % 8.3 ± 3.0 ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda % 8.3 ± 3.0 ($p < 0.01$) olan nekroz yüzdelerinin kontrole göre arttığı saptandı (Tablo 18).

Altıncı saatte: Amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen apoptoz yüzdelerindeki artışın istatistiksel olarak kontrolden farklı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). Amikasinin MİK yoğunluğunda % 4.3 ± 1.5 ($p < 0.001$) olan nekroz yüzdesinin, kontrole göre azaldığı görüldü. Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda % 16.6 ± 3.0 ($p < 0.001$) olan apoptoz yüzdesinin, kontrole göre arttığı saptandı (Tablo 18).

Dokuzuncu Saatte: Amikasinin MİK yoğunluğunda % 21.3 ± 3.5 ($p < 0.05$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda % 20.0 ± 2.6 ($p < 0.05$) olan apoptoz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi. Amikasinin tüm yoğunluklarında görülen nekroz yüzdelerindeki azalışın kontrole göre anlamlı olarak farklı olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo18).

Onikinci Saatte: Amikasinin tüm yoğunluklarında görülen apoptoz yüzdelerindeki azalışın kontrole göre anlamlı olarak farklı olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğunda % 24.3 ± 1.5 ($p < 0.05$), % 50 MİK yoğunluğunda % 68.0 ± 3.6 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda % 52.6 ± 2.0 ($p < 0.01$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda % 35.3 ± 2.5 ($p < 0.001$) olan nekroz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 18).

Dokuzuncu saatte amikasinin MİK yoğunluğu etkisinde “**aljinat**” yapısının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de amikasinin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 18: K2 ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine amikasin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	9.3± 1.5	<0.05	16.6± 3.0	<0.001	10.6± 1.5	<0.01	20.6± 2.0	<0.001	8.0± 1.0	> 0.05	3.6±05
	Nekroz	4.0± 1.0	> 0.05	8.3± 3.0	<0.001	3.3± 0.5	> 0.05	6.3± 1.5	<0.01	3.3±0.5	> 0.05	1.6 ± 0.5
6. saat	Apoptoz	16.0± 2.0	> 0.05	12.0± 2.6	> 0.05	10.3± 3.2	> 0.05	19.6± 3.0	<0.05	12.0± 2.6	> 0.05	11.6±2.5
	Nekroz	4.3± 1.5	<0.001	22.3± 1.5	<0.01	17.0± 1.0	> 0.05	18.3± 3.5	> 0.05	10.3± 1.5	> 0.05	14.3±4.0
9. saat	Apoptoz	21.3± 3.5	<0.05	6.0±1.0	> 0.05	11.6± 4.0	> 0.05	20.0± 2.6	<0.05	14.6± 2.0	> 0.05	11.0±1.0
	Nekroz	2.3±1.5	<0.001	14.6± 1.5	<0.001	8.0± 3.0	<0.001	13.0± 2.0	<0.001	21.0± 3.0	<0.001	54.0± 1.0
12. saat	Apoptoz	4.0± 1.0	<0.001	13.6±3.0	<0.001	25.0± 4.0	<0.001	11.6± 3.0	<0.001	13.6± 4.1	<0.001	70.6±5.13
	Nekroz	24.3± 1.5	<0.05	68.0± 3.6	<0.001	52.6± 2.0	<0.001	35.3± 2.5	<0.001	22.3± 3.2	> 0.05	15.0± 1.0

KONTROL: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **AK:** Amikasin. Kontrol değerine göre değişim sorugulanmış ve *p* <0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.3.1.3.3. K2 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri K2 suşu ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde apoptoz ve nekroz yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Netilmisinin % 25 MİK yoğunluğunda % 24.0 ± 3.6 ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda % 20.0 ± 3.6 ($p < 0.001$) olan apoptoz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi. Netilmisinin MİK yoğunluğunda % 7.6 ± 0.5 ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda % 4.0 ± 1.0 ($p < 0.05$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda % 9.6 ± 1.5 ($p < 0.001$) olan nekroz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 19).

Altıncı saatte: Netilmisinin % 6.2 MİK yoğunluğunda % 22.0 ± 2.6 ($p < 0.05$) olan apoptoz yüzdesinin kontrole göre arttığı görüldü. Netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğunda % 23.6 ± 3.0 ($p < 0.05$) olan nekroz yüzdesinin kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 19).

Dokuzuncu saatte: Netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen apoptoz yüzdelerindeki değişimin kontrolden istatistiksel olarak farklı olmadığı saptandı ($p > 0.05$). Netilmisinin tüm yoğunlukları etkisindeki nekroz yüzdelerindeki kontrole göre azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 19).

Onikinci saatte: Netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde görülen apoptoz yüzdelerindeki kontrole göre azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Netilmisinin MİK yoğunluğunda % 30.6 ± 3.7 ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda % 36.3 ± 4.1 ($p < 0.001$), % 25 MİK ve % 12.5 MİK yoğunluklarındaki % 40.6 ± 1.5 ($p < 0.001$) olan nekroz yüzdelerinin kontrole göre arttığı belirlendi (Tablo 19).

Dokuzuncu saatte: Netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğundan itibaren “aljinat” yapısının meydana geldiği görüldü.

Onsekizinci saatte hem kontrolde hem de netilmisinin uygulamasında HEp-2 hücrelerinin tamamen bütünlüğünü kaybettiği görüldü.

Tablo 19: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine netilmisin uygulandıktan sonraki apoptoz ve nekroz yanıtlarının yüzdeleri

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	
0. saat	Apoptoz	7.6±3.0	> 0.05	11.6± 3.0	> 0.05	24.0± 3.6	<0.001	20.0± 3.6	<0.001	9.3± 1.5	> 0.05	3.6±05
	Nekroz	7.6± 0.5	<0.001	0.3± 0.5	> 0.05	4.0± 1.0	> 0.05	1.6± 0.5	> 0.05	9.6±1.5	<0.001	1.6 ± 0.5
6. saat	Apoptoz	9.3± 2.0	> 0.05	10.3± 4.1	> 0.05	4.6± 2.0	> 0.05	8.3± 2.3	> 0.05	22.0± 2.6	<0.05	11.6±2.5
	Nekroz	17.6± 0.5	> 0.05	14.6± 3.5	> 0.05	15.0± 2.6	> 0.05	23.6± 3.0	<0.05	10.6± 2.0	> 0.05	14.3±4.0
9. saat	Apoptoz	8.3± 1.1	> 0.05	7.6± 3.0	> 0.05	6.6± 2.5	> 0.05	4.3± 2.3	> 0.05	15.6± 4.1	> 0.05	11.0±1.0
	Nekroz	18.3± 3.5	<0.001	26.6± 5.1	<0.001	21.6± 4.0	<0.001	27.0± 2.0	<0.001	6.3±1.5	<0.001	54.0± 1.0
12. saat	Apoptoz	16.6±4.0	<0.001	8.6± 2.0	<0.001	5.0± 2.0	<0.001	7.6± 3.05	<0.001	18.6± 2.0	<0.001	70.6±5.13
	Nekroz	30.6± 3.7	<0.001	36.3± 4.1	<0.001	40.6± 1.5	<0.001	40.6±1.5	<0.001	19.6± 5.0	> 0.05	15.0± 1.0

KONTROL: K2 ile enfekte edilen HEp-2 hücresi apoptoz/ nekroz yanıtı yüzdeleri (aminoglikozid uygulanmamıştır). **NET:** Netilmisin Kontrol değerine göre değişim sorugulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.4. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücreleri kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin nitrik oksit 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi.

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin nitrik oksit yanıtları: 0. saatte $1.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$ saatte, 6. saatte $3.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$, 9. saatte $3.1 \pm 0.05 \mu\text{M}$, 12. saatte $7.1 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ve 18. saatte $6.1 \pm 0.05 \mu\text{M}$ olarak belirlendi.

K1 ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin nitrik oksit yanıtları: 0. saatte $1.5 \pm 0.10 \mu\text{M}$, 6. saatte $2.2 \pm 0.20 \mu\text{M}$, 9. saatte $3.4 \pm 0.11 \mu\text{M}$, 12. saatte $6.7 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ve 18. saatte $5.5 \pm 0.26 \mu\text{M}$ olarak belirlendi.

K2 ile enfekte edilen kontrol hücrelerinin nitrik oksit yanıtları: 0. saatte $1.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$, 6. saatte $1.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$, 9. saatte $3.6 \pm 0.05 \mu\text{M}$, 12. saatte $5.3 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ve 18. saatte $5.5 \pm 0.20 \mu\text{M}$ olarak belirlendi.

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu, K1 ve K2 suşları ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde nitrik oksit yanıtları değerlendirildi.

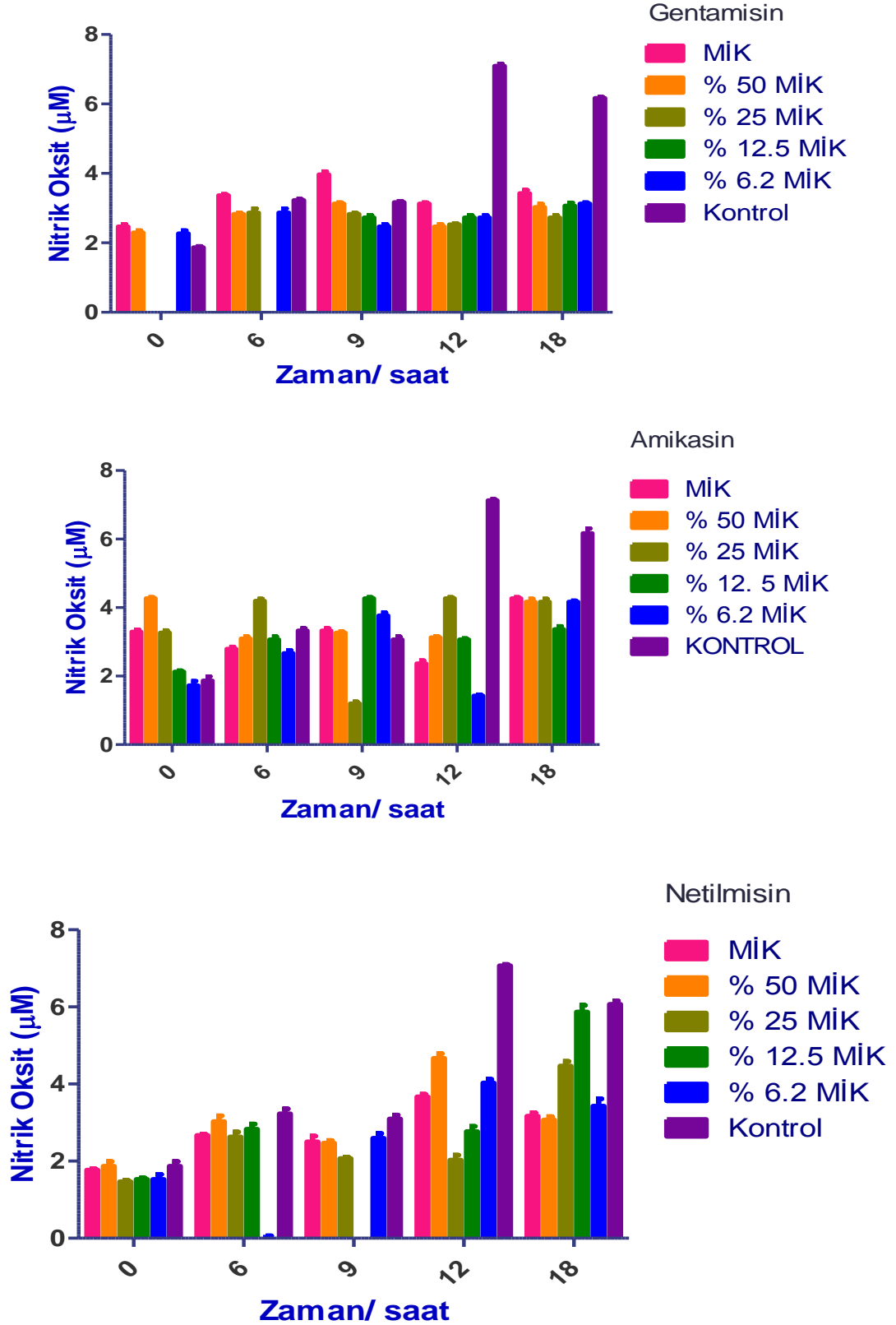
Aminoglikozidler uygulandıktan sonra değerlendirilen nitrik oksit yanıtlarındaki değişim one-way ANOVA yöntemi ile analiz edildi. Aminoglikozidlerin etkisindeki nitrik oksit "Tukey's Multiple Comparison Test" yöntemi kullanılarak kontrol ile karşılaştırıldı.

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 10' da gösterilmiştir.

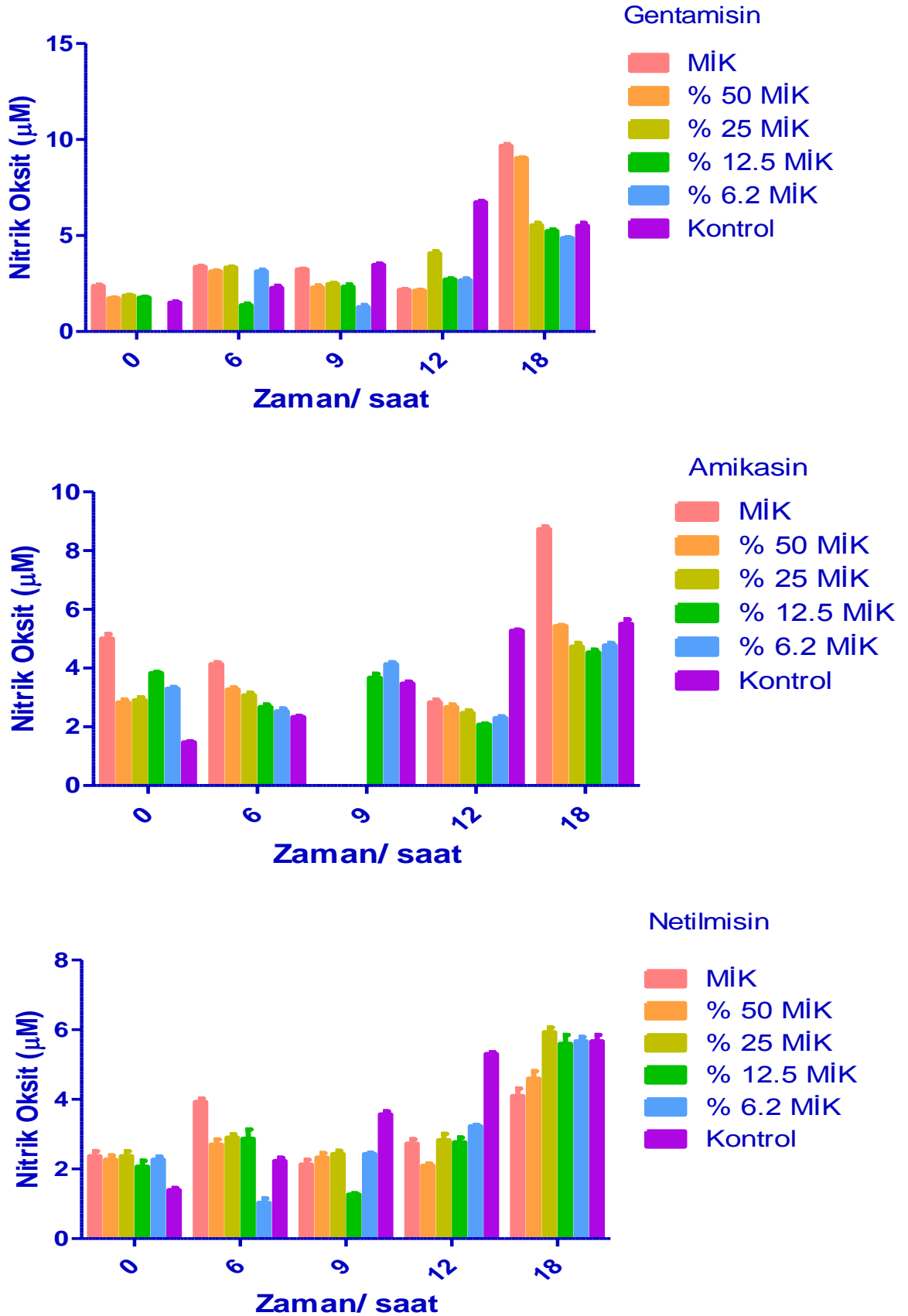
K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 11' de gösterilmiştir.

K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının zamana bağlı değişimi Grafik 12' de gösterilmiştir.

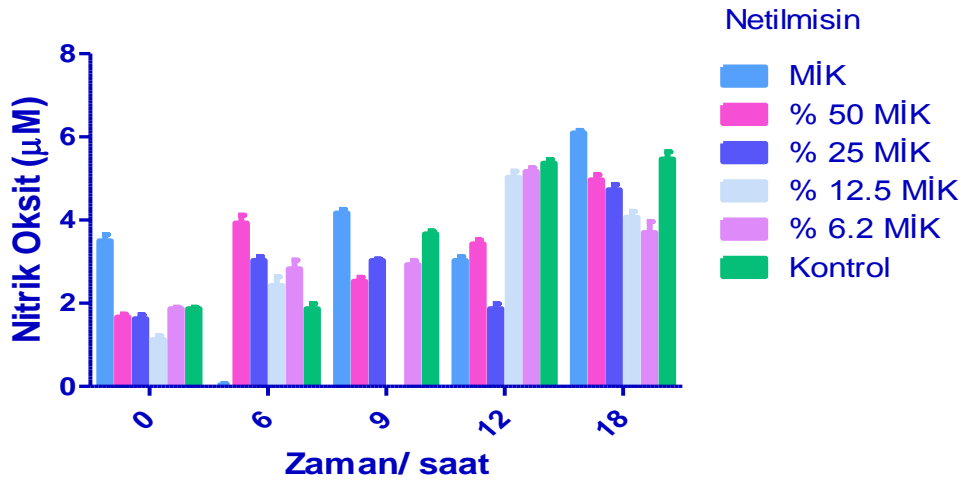
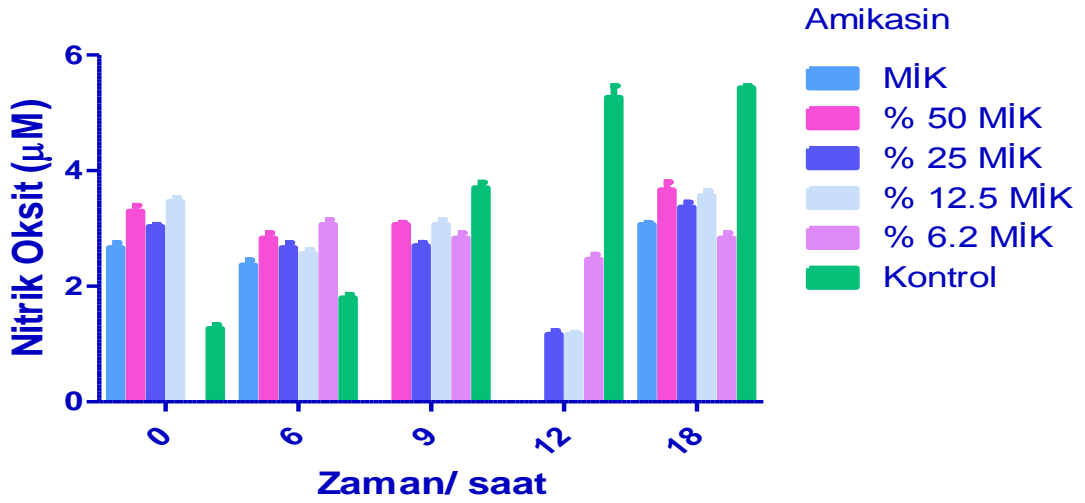
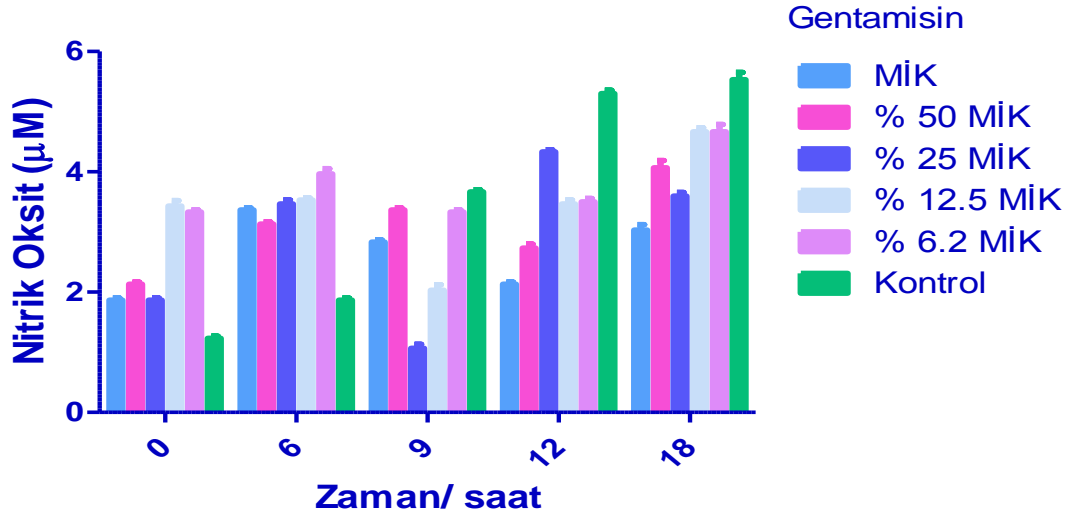
Grafik 10: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği



Grafik 11: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği



Grafik 12: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki nitrik oksit yanıtlarının kinetiği



4.2.4.1. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak gentamisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde nitrik oksit yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtları; gentamisin MİK yoğunluğunda $2.4 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $2.3 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $2.2 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olarak belirlendi ve kontrole göre bu artış anlamlı bulundu. Gentamisin % 25 MİK ve % 12.5 MİK yoğunluklarında nitrik oksit yanıtının olmaması kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 20).

K1 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtları, gentamisin MİK yoğunluğunda $2.3 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $1.7 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$), % 25 MİK yoğunluğunda $1.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda $1.7 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) olarak belirlendi. Kontrole göre bu artış anlamlı bulundu. Gentamisin % 6.2 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 20).

K2 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının gentamisin tüm yoğunluklarında kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 20).

Altıncı saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte HEp-2 hücrelerinin nitrik oksit yanıtlarının, gentamisin % 50 MİK yoğunluğundan itibaren kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.05$). Ayrıca gentamisin % 25 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 20).

K1 ve ile enfekte edilip gentamisin uygulanan HEp-2 hücrelerinin nitrik oksit yanıtlarının; gentamisin MİK yoğunluğunda $3.3 \pm 0.05 \mu\text{M}$, % 50 MİK yoğunluğunda $3.1 \pm 0.05 \mu\text{M}$, % 25 MİK yoğunluğunda $3.3 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ve % 6.2 MİK yoğunluklarında $3.1 \pm 0.15 \mu\text{M}$ bulundu. Kontrole göre nitrik oksit yanıtlarındaki bu artış anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Gentamisin % 12.5 MİK yoğunluğunda $1.3 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 20).

K1 ve ile enfekte edilip gentamisin uygulanan HEp-2 hücrelerinin nitrik oksit yanıtlarının gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 20).

Dokuzuncu saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelerin, gentamisinin MİK yoğunluğunda $3.9 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olan nitrik oksit yanıtının kontrole arttığı belirlendi. Gentamisin % 25 MİK yoğunluğunda $2.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$), % 12.5 MİK yoğunluğunda $2.7 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $2.4 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olan nitrik oksit yanıtının kontrole azaldığı belirlendi (Tablo 20).

Gentamisin % 50 MİK yoğunluğundan itibaren K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 20).

Gentamisin tüm yoğunluklarında K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 20).

Onikinci saatte: Gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde 3 suş ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 20).

Onsekizinci saatte: Gentamisin tüm yoğunluklarında standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 20).

K1 ile enfekte hücrelerin, gentamisin MİK yoğunluğunda $9.6 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $9.0 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), olan nitrik oksit yanıtının kontrole arttığı belirlendi. Gentamisin % 6.2 MİK yoğunluğunda $4.8 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) olan nitrik oksit yanıtının kontrole azaldığı belirlendi (Tablo 20).

Tablo 20: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Gentamisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	<u>GN</u>	<i>p</i>	
<u>0. saat</u>	ATCC	2.4±0.11	<0.001	2.3±0.10	<0.001	0	<0.001	0	<0.001	2.2±0.15	<0.01	1.8±0.05 μM
	K1	2.3±0.11	<0.001	1.7±0.05	<0.05	1.8±0.05	<0.001	1.7±0.05	<0.01	0	<0.001	1.5±0.10 μM
	K2	1.86±0.05	<0.001	2.1±0.05	<0.001	1.8±0.05	<0.001	3.4±0.1	<0.001	3.3±0.05	<0.001	1.2±0.05 μM
<u>6. saat</u>	ATCC	3.3±0.05	>0.05	2.8±0.05	<0.05	2.8±0.05	<0.05	0	<0.001	2.8±0.20	<0.05	3.2±0.05 μM
	K1	3.3±0.05	<0.001	3.1±0.05	<0.001	3.3±0.05	<0.001	1.3±0.15	<0.001	3.1±0.15	<0.001	2.2±0.20 μM
	K2	3.3±0.05	<0.001	3.1±0.05	<0.001	3.4±0.1	<0.001	3.5±0.05	<0.001	.3.9±0.1	<0.001	1.8±0.05 μM
<u>9. saat</u>	ATCC	3.9±0.15	<0.001	3.1±0.05	>0.05	2.8±0.05	<0.05	2.7±0.11	<0.01	2.4±0.11	<0.001	3.1±0.05 μM
	K1	3.2±0.05	>0.05	2.1±0.05	<0.001	2.4±0.11	<0.001	2.3±0.20	<0.001	1.2±0.20	<0.001	3.4±0.11 μM
	K2	2.8±0.05	<0.001	3.3±0.05	<0.05	1.06±0.11	<0.001	2.0±0.1	<0.001	3.3±0.05	<0.01	3.6±0.05 μM
<u>12. saat</u>	ATCC	3.1±0.05	<0.001	2.4±0.11	<0.001	2.5±0.05	<0.001	2.7±0.11	<0.001	2.7±0.11	<0.001	7.1±0.10 μM
	K1	2.1±0.05	<0.001	2.1±0.05	<0.001	4.0±0.20	<0.001	2.7±0.10	<0.001	2.6±0.15	<0.001	6.7±0.11 μM
	K2	2.1±0.05	<0.001	2.7±0.1	<0.001	4.3±0.05	<0.001	3.4±0.1	<0.001	3.5±0.1	<0.001	5.3±0.10 μM
<u>18. saat</u>	ATCC	3.4±0.15	<0.001	3.0±0.15	<0.001	2.7±0.11	<0.001	3.0±0.15	<0.001	3.1±0.05	<0.001	6.1±0.05 μM
	K1	9.6±0.15	<0.001	9.0±0.05	<0.001	5.3±0.20	>0.05	5.2±0.15	>0.05	4.8±0.05	<0.01	5.5±0.26 μM
	K2	3.0±0.15	<0.001	4.0±0.2	<0.001	3.6±0.1	<0.001	4.6±0.1	<0.001	4.6±0.2	<0.001	5.5±0.20 μM

ATCC: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2: Klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, KONTROL: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 enfekte edilen HEp-2 hücresi nitrik oksit yanıtları (aminoglikozid uygulanmamıştır). GN: Gentamisin. Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. ($p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı)

4.2.4.2. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEP-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEP-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde nitrik oksit yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtları; amikasinin MİK yoğunluğunda $3.3 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $4.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 25 MİK yoğunluğunda $3.2 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olarak belirlendi ve kontrole göre bu artış anlamlı bulundu (Tablo 21).

K1 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının amikasinin tüm yoğunluklarında kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 21).

K2 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtları, amikasinin MİK yoğunluğunda $2.6 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $3.3 \pm 0.17 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda $3.0 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 12.5 MİK yoğunluğunda $3.4 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) olarak belirlendi. Kontrole göre bu artış anlamlı bulundu. Amikasinin % 6.2 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Altıncı saatte: Amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda $4.2 \pm 0.10 \mu\text{M}$ olarak belirlenen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin MİK yoğunluğunda $2.8 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $2.6 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı (Tablo 21).

K1 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtları, amikasinin MİK yoğunluğunda $4.1 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 50 MİK yoğunluğunda $3.0 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 25 MİK yoğunluğunda $3.0 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olarak belirlendi. Kontrole göre bu artış anlamlı bulundu.

K2 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının amikasinin tüm yoğunluklarında kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.01$) (Tablo 21).

Dokuzuncu saatte: Amikasinin, % 12.5 MİK yoğunluğunda $4.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $3.7 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olarak belirlenen standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin

% 25 MİK yoğunluğunda $1.2 \pm 0.10 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Amikasinin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında K1 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının olmaması kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin % 6.2 MİK yoğunluğundaki $4.1 \pm 0.11 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Amikasinin MİK ve % 50 MİK yoğunluklarında K2 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının olmaması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda $1.16 \pm 0.11 \mu\text{M}$, % 12.5 MİK yoğunluğunda $2.56 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $2.8 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Onikinci saatte: Amikasinim tüm yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Amikasinin MİK ve % 50 MİK yoğunluklarında K2 suşu ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının olmaması kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin % 25 MİK yoğunluğundan itibaren nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Onsekizinci saatte: Amikasinim tüm yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 21).

Amikasinin, MİK yoğunluğunda $8.7 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olarak belirlenen K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). Amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda $4.7 \pm 0.20 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$), % 12.5 MİK yoğunluğunda $4.5 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $4.7 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) olan nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü (Tablo 21).

Tablo 21: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Amikasin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	<u>AK</u>	<i>p</i>	
<u>0. saat</u>	ATCC	3.3±0.10	<0.001	4.2±0.05	<0.001	3.2±0.11	<0.001	2.1±0.05	>0.05	1.7±0.20	>0.05	1.8±0.05 μM
	K1	5.0±0.26	<0.001	2.8±0.15	<0.001	2.9±0.17	<0.001	3.8±0.05	<0.001	3.3±0.10	<0.001	1.5±0.10 μM
	K2	2.6±0.15	<0.001	3.3±0.17	<0.001	3.0±0.05	<0.001	3.4±0.11	<0.001	0	<0.001	1.2±0.05 μM
<u>6. saat</u>	ATCC	2.8±0.10	<0.01	3.1±0.10	>0.05	4.2±0.10	<0.001	3.0±0.15	>0.05	2.6±0.15	<0.001	3.2±0.05 μM
	K1	4.1±0.11	<0.001	3.0±0.15	<0.001	3.0±0.15	<0.001	2.6±0.15	>0.05	2.5±0.15	>0.05	2.2±0.20 μM
	K2	2.3±0.15	<0.01	2.8±0.15	<0.001	2.6±0.15	<0.001	2.5±0.11	<0.001	3.0±0.15	<0.001	1.8±0.05 μM
<u>9. saat</u>	ATCC	3.3±0.11	>0.05	3.2±0.05	>0.05	1.2±0.10	<0.001	4.2±0.05	<0.001	3.7±0.15	<0.001	3.1±0.05 μM
	K1	0	<0.001	0	<0.001	0	<0.001	3.6±0.23	>0.05	4.1±0.11	<0.001	3.4±0.11 μM
	K2	0	<0.001	3.0±0.05	<0.001	2.7±0.10	<0.001	2.56±0.11	<0.001	2.8±0.15	<0.001	3.6±0.05 μM
<u>12. saat</u>	ATCC	2.3±0.15	<0.001	3.1±0.05	<0.001	4.2±0.05	<0.001	3.0±0.05	<0.001	1.4±0.05	<0.001	7.1±0.10 μM
	K1	2.8±0.15	<0.001	2.6±0.15	<0.001	2.4±0.15	<0.001	2.0±0.05	<0.001	2.3±0.10	<0.001	6.7±0.11 μM
	K2	0	<0.001	0	<0.001	1.16±0.11	<0.001	1.16±0.05	<0.001	2.46±0.15	<0.001	5.3±0.10 μM
<u>18. saat</u>	ATCC	4.2±0.05	<0.001	4.1±0.15	<0.001	4.1±0.15	<0.001	3.3±0.15	<0.001	4.1±0.05	<0.001	6.1±0.05 μM
	K1	8.7±0.15	<0.001	5.4±0.05	>0.05	4.7±0.20	<0.01	4.5±0.15	<0.001	4.7±0.15	<0.01	5.5±0.26 μM
	K2	3.0±0.05	<0.001	3.6±0.23	<0.001	3.36±0.15	<0.001	3.56±0.15	<0.001	2.83±0.15	<0.001	5.5±0.20 μM

ATCC: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, **K1 ve K2:** Klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **KONTROL:** Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 enfekte edilen HEp-2 hücresi nitrik oksit yanıtları (aminoglikozid uygulanmamıştır). **AK:** Amikasin, Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. ($p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı)

4.2.4.3. Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının Değerlendirilmesi

HEp-2 hücreleri, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 ile enfekte edildi. İki saatlik inkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılarak netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunlukları hücreler uygulandı. Sıfır, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde nitrik oksit yanıtları değerlendirildi.

Sıfırıncı saatte: Netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre azalması istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$) (Tablo 22).

Netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde standart K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre arttığı saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 22).

Netilmisin, MİK yoğunluğunda $3.5 \pm 0.26 \mu\text{M}$ olarak belirlenen K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). Netilmisin % 12.5 MİK yoğunluğunda $1.1 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 22).

Altıncı saatte: Netilmisin MİK yoğunluğunda $2.6 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$), % 25 MİK yoğunluğunda $2.6 \pm 0.20 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $0.03 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$) olan standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü (Tablo 22).

Netilmisin MİK yoğunluğunda $3.9 \pm 0.15 \mu\text{M}$ olarak belirlenen K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre arttığı görüldü ($p < 0.001$). Netilmisin % 6.2 MİK yoğunluğunda $0.03 \pm 0.05 \mu\text{M}$ olan nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 22).

Netilmisin MİK yoğunluğunda $0.03 \pm 0.05 \mu\text{M}$ olarak belirlenen K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.001$). Netilmisin % 50 MİK yoğunluğunda $3.9 \pm 0.32 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$), % 25 MİK yoğunluğunda $3.0 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $2.8 \pm 0.35 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) nitrik oksit yanıtlarının kontrole göre arttığı görüldü (Tablo 22).

Dokuzuncu saatte: Netilmisin MİK, % 50 MİK, %25 MİK ve % 6.2 MİK yoğunluklarında standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Netilmisin % 12.5 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 22).

Netilmisinin tüm yoğunluklarında K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$) (Tablo 22).

Netilmisinin tüm yoğunluklarında K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.01$). Ayrıca netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmaması kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 22).

Onikinci saatte: Netilmisinin tüm yoğunluklarında Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$) Netilmisinin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$) (Tablo 22).

Onsekizinci saatte: Netilmisinin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK ve % 6.2 MİK yoğunluklarında standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$) (Tablo 22).

Netilmisinin MİK yoğunluğunda $4.1\pm 0.36 \mu\text{M}$ ($p<0.001$) ve % 50 MİK yoğunluğunda $4.6\pm 0.36 \mu\text{M}$ ($p<0.05$) olarak belirlenen K1 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi (Tablo 22).

Netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğunda $4.0\pm 0.25 \mu\text{M}$ ($p<0.001$) ve % 6.2 MİK yoğunluğunda $3.7\pm 0.45 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$) olarak belirlenen K2 ile enfekte hücrelerin nitrik oksit yanıtının kontrole göre azaldığı belirlendi (Tablo 22).

Tablo 22: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 İle Enfekte Edilip; Netilmisin Uygulanan HEp-2 Hücrelerindeki Nitrik Oksit Yanıtlarının (μM) Değerlendirilmesi

		<u>MİK</u>		<u>% 50 MİK</u>		<u>% 25 MİK</u>		<u>% 12.5 MİK</u>		<u>% 6.2 MİK</u>		<u>KONTROL</u>
		<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	<u>NET</u>	<i>p</i>	
<u>0. saat</u>	ATCC	1.7±0.05	>0.05	1.8±0.20	>0.05	1.4±0.05	>0.05	1.5±0.05	>0.05	1.5±0.20	>0.05	1.8±0.05 μM
	K1	2.3±0.25	<0.01	2.2±0.20	<0.01	2.3±0.25	<0.01	2.0±0.28	<0.05	2.2±0.15	<0.001	1.5±0.10 μM
	K2	3.5±0.26	<0.001	1.6±0.11	>0.05	1.6±0.15	>0.05	1.1±0.15	<0.001	1.8±0.05	>0.05	1.2±0.05 μM
<u>6. saat</u>	ATCC	2.6±0.05	<0.05	3.0±0.25	>0.05	2.6±0.20	<0.05	2.8±0.23	>0.05	0.03±0.05	<0.001	3.2±0.05 μM
	K1	3.9±0.15	<0.001	2.7±0.26	>0.05	2.9±0.25	>0.05	2.8±0.47	>0.05	1.0±0.20	<0.01	2.2±0.20 μM
	K2	0.03±0.05	<0.01	3.9±0.32	<0.001	3.0±0.15	<0.01	2.4±0.35	>0.05	2.8±0.35	<0.01	1.8±0.05 μM
<u>9. saat</u>	ATCC	2.5±0.26	<0.01	2.4±0.11	<0.01	2.0±0.05	<0.001	0	<0.001	2.6±0.20	<0.05	3.1±0.05 μM
	K1	2.1±0.23	<0.001	2.3±0.20	<0.001	2.4±0.15	<0.001	1.2±0.05	<0.001	2.4±0.05	<0.001	3.4±0.11 μM
	K2	4.1±0.15	<0.01	2.5±0.15	<0.001	3.0±0.05	<0.001	0	<0.001	2.9±0.15	<0.001	3.6±0.05 μM
<u>12. saat</u>	ATCC	3.6±0.11	<0.001	4.6±0.20	<0.001	2.0±0.20	<0.001	2.7±0.23	<0.001	4.0±0.15	<0.001	7.1±0.10 μM
	K1	2.7±0.20	<0.001	2.1±0.10	<0.001	2.8±0.30	<0.001	2.7±0.23	<0.001	3.2±0.05	<0.001	6.7±0.11 μM
	K2	3.0±0.15	<0.001	3.4±0.15	<0.001	1.8±0.20	<0.001	5.0±0.25	>0.05	5.1±0.15	>0.05	5.3±0.10 μM
<u>18. saat</u>	ATCC	3.1±0.15	<0.001	3.06±0.15	<0.001	4.4±0.20	<0.001	5.8±0.30	>0.05	3.4±0.32	<0.001	6.1±0.05 μM
	K1	4.1±0.36	<0.001	4.6±0.36	<0.05	5.9±0.23	>0.05	5.6±0.43	>0.05	5.6±0.20	>0.05	5.5±0.26 μM
	K2	6.1±0.10	>0.05	4.9±0.20	>0.05	4.7±0.20	>0.05	4.0±0.25	<0.001	3.7±0.45	<0.001	5.5±0.20 μM

ATCC: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, **K1 ve K2:** Klinikten izole edilen *P. aeruginosa* suşları, **KONTROL:** Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 enfekte edilen HEp-2 hücresi nitrik oksit yanıtları (aminoglikozid uygulanmamıştır). **NET:** Netilmisin Kontrol değerine göre değişim sorgulanmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. ($p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı)

4.2.5. ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin Antibiyotiklerinin MİK ve Sub- MİK Değerleri Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Sitokin Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol: Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücreleri kontrol olarak değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN-gama yanıtları ile 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde “Multiplex ELISA” yöntemi değerlendirildi.

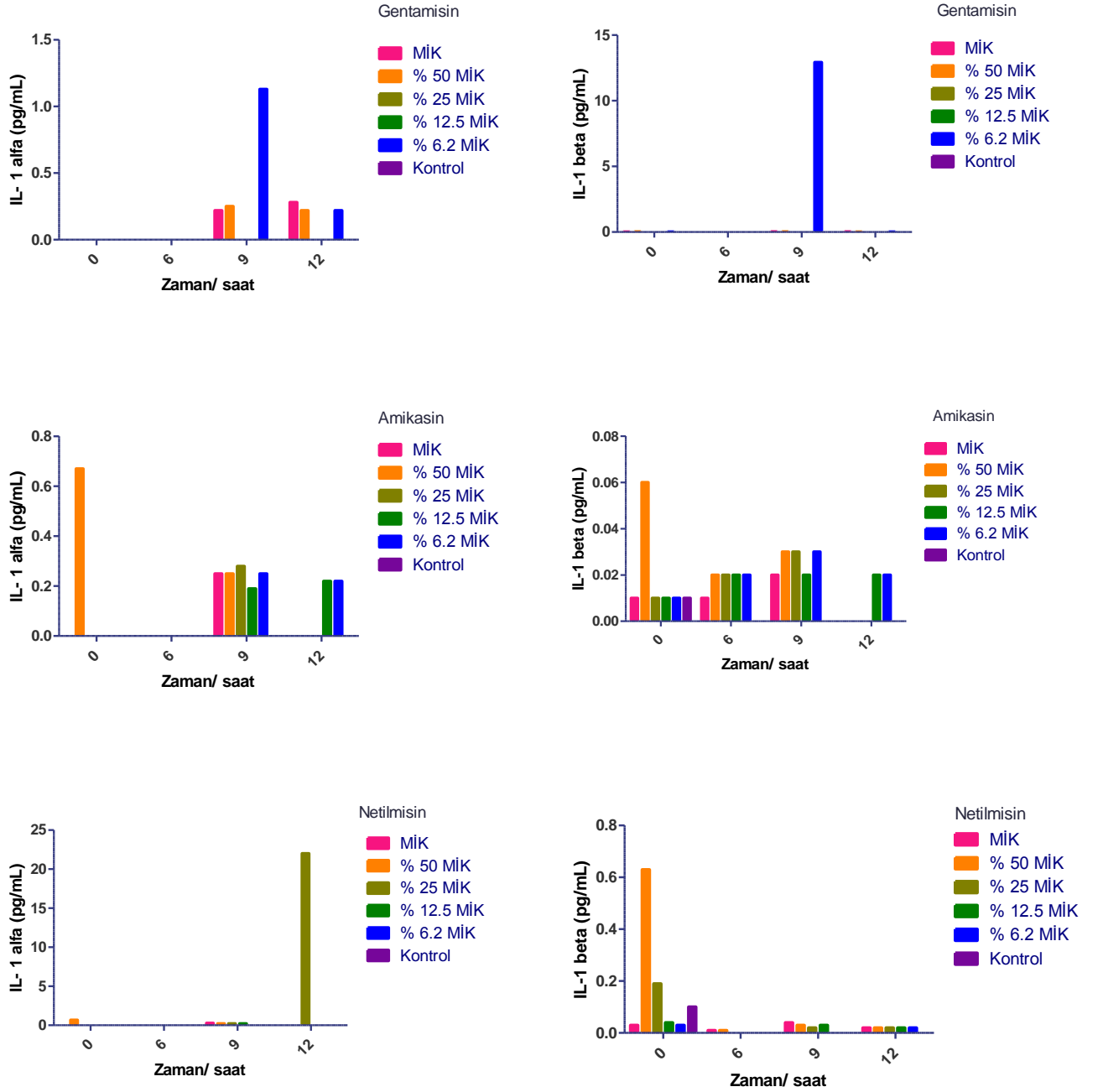
Sıfır, 6, 9 ve 12. saatlerde, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücrelerinde IL-4, IL-8, TNF- alfa, IFN-gama yanıtlarının olmadığı görüldü.

Onsekizinci saatte standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEp-2 hücrelerinde IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN-gama yanıtlarının olmadığı belirlendi.

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerde 0 ve 6 saatlerde gentamisin etkisinde IL-1 alfa yanıtının olmadığı görüldü. Dokuzuncu ve 12. saatte gentamisinin MİK ve % 50 MİK yoğunluklarında görülen yanıtın, 12. saatte gentamisinin & 6.2 MİK yoğunluğunda arttığı görüldü. Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda başlayan IL-1 alfa yanıtının, 9. saatte amikasinintüm yoğunluklarında, 12. saatte ise amikasinin % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde olduğu görüldü. Netilmisin % 25 MİK yoğunluğu etkisinde IL- 1 alfa yanıtının arttığı belirlendi (Grafik 13).

Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerde gentamisinin % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde IL-1 beta yanıtının arttığı belirlendi. Sıfırinci saatte amikasinin yoğunlukları etkisinde görülen IL- 1 beta yanıtının % 50 MİK’ te arttığı saptandı. Altı ve 9. saatlerde artan yanıtın, 12. saatte amikasinin % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde olduğu görüldü. Sıfırinci saatte netilmisinin% 50 MİK yoğunluğu etkisinde artan IL- 1 beta yanıtının diğer saatlerde azaldığı görüldü (Grafik 13).

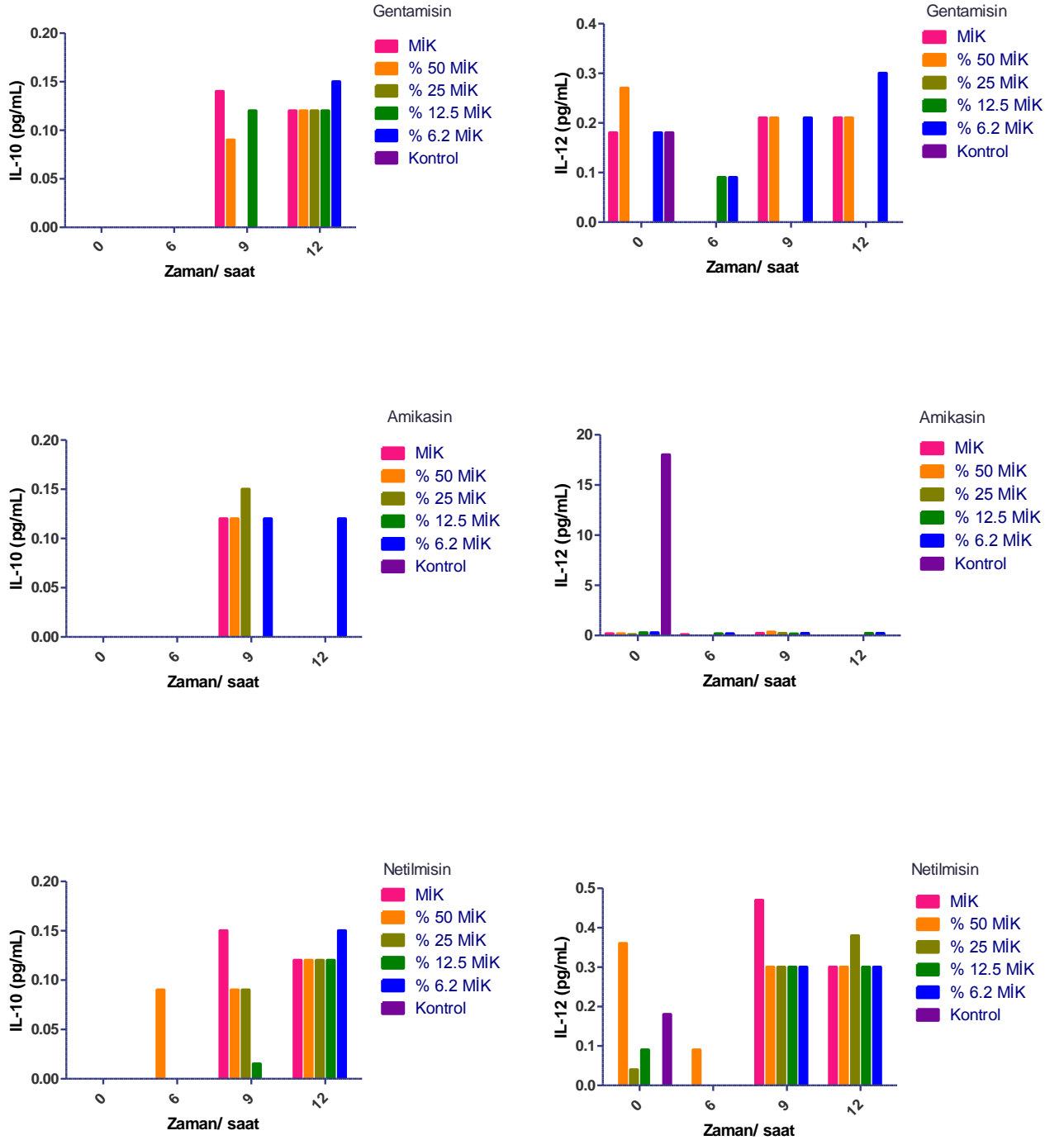
Grafik 13: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği



Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu ile enfekte hücrelerde 0 ve 6 saatlerde gentamisin etkisinde IL-10 yanıtının olmadığı görüldü. Dokuzuncu saatte gentamisinin MİK-% 50 MİK-% 25 MİK yoğunluklarında, 12. saatte tüm yoğunlukları etkisinde IL-10 yanıtının olduğu saptandı. Dokuzuncu saatte amikasinin MİK-% 50 MİK-% 25 MİK-% 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde, 12. saatte % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde IL- 10 yanıtı görüldü. Netilmisin etkisinde 6. Saatte % 50 MİK yoğunluğunda, 9. saatte MİK-% 50 MİK-% 25 MİK-% 12.5 MİK yoğunluklarında, 12. saatte tüm yoğunlukları etkisinde IL- 10 yanıtı belirlendi (Grafik 14).

Sıfırıncı saatte gentamisinin MİK-% 50 MİK yoğunlukları etkisinde, 6. saatte % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde, 9 ve 12. saatlerde MİK-% 50 MİK-% 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde IL- 12 yanıtı görüldü. Sıfırıncı saatte netilmisinin % 50 MİK- % 25 MİK-% 12.5 yoğunlukları etkisinde görülen IL-12 yanıtının 6. saatte % 50 MİK yoğunluğunda olduğu görüldü. Dokuz ve 12. saatlerde sitokin yanıtının netilmisin etkisinde arttığı belirlendi (Grafik 14).

Grafik 14: Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL-10 ve IL-12 yanıtlarının kinetiği



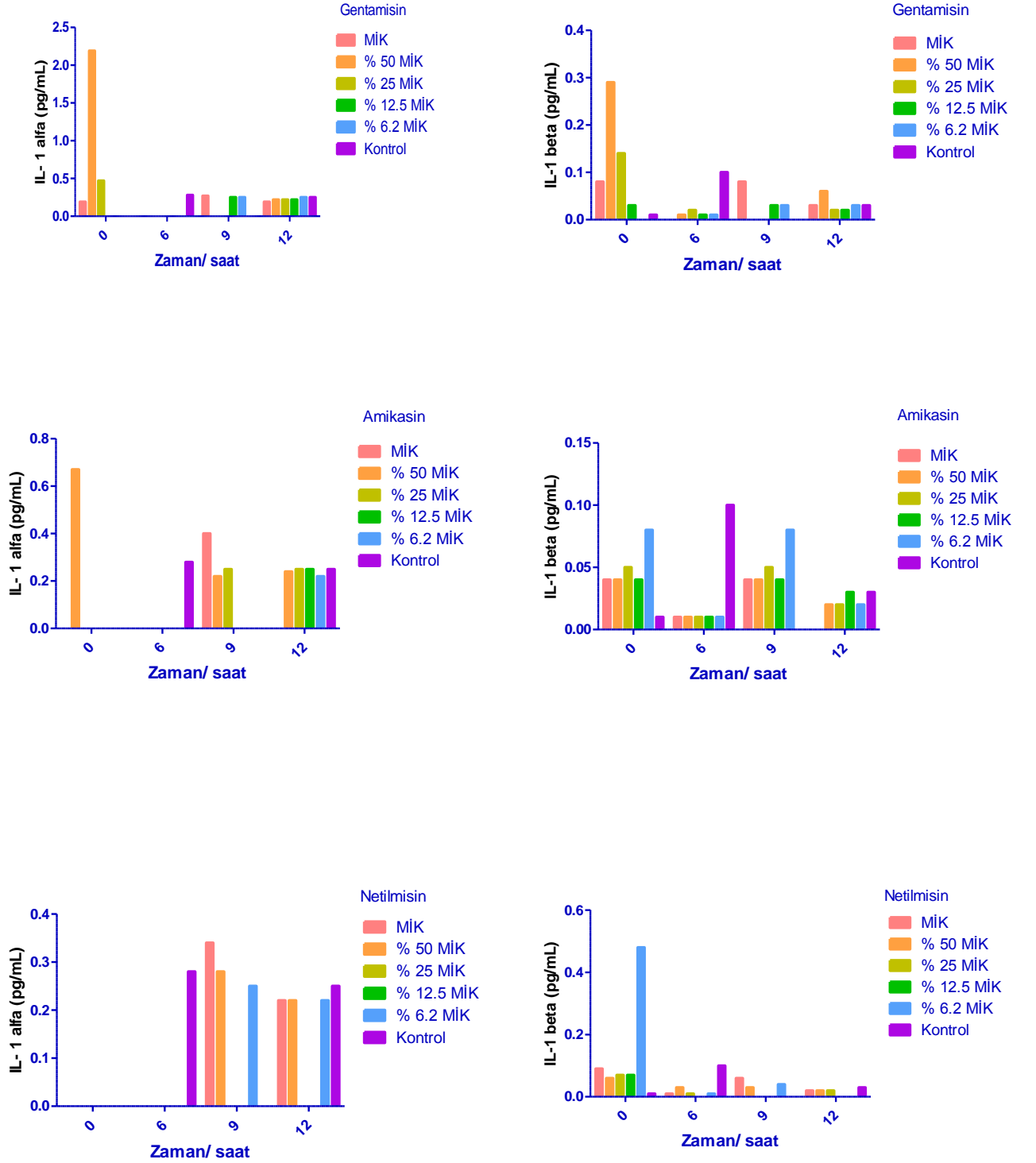
K1 suşu ile enfekte hücrelerde 0. saatte gentamisin ve amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda yüksek oranda IL-1 alfa yanıtı görüldü. Altıncı saatte aminoglikozidlerin etkisinde K1 suşunda IL-1 alfa yanıtı görülmedi. Dokuz ve 12. saatlerde aminoglikozidlerin etkisinde aynı oranlarad IL- 1 alfa yanıtı olduğu belirlendi (Grafik 15).

Sıfırıncı saatte gentamisin etkisinde başlayan IL- 1 beta yanıtının 6, 9, 12 saatlerde azaldığı görüldü. Sıfırıncı saatte amikasin ve netilmisin etkisinde kontrolden yüksek oranlarda IL- 1 beta yanıtı saptandı. Altıncı saatte amikasin etkisinde kontrolden az olan IL- 1 beta yanıtının 9 ve 12. saatlerde arttığı görüldü. Netilmisin etkisinde ise 6, 9 ve 12. saatlerde IL- 1 beta yanıtının kontrole göre azaldığı saptandı (Grafik 15).

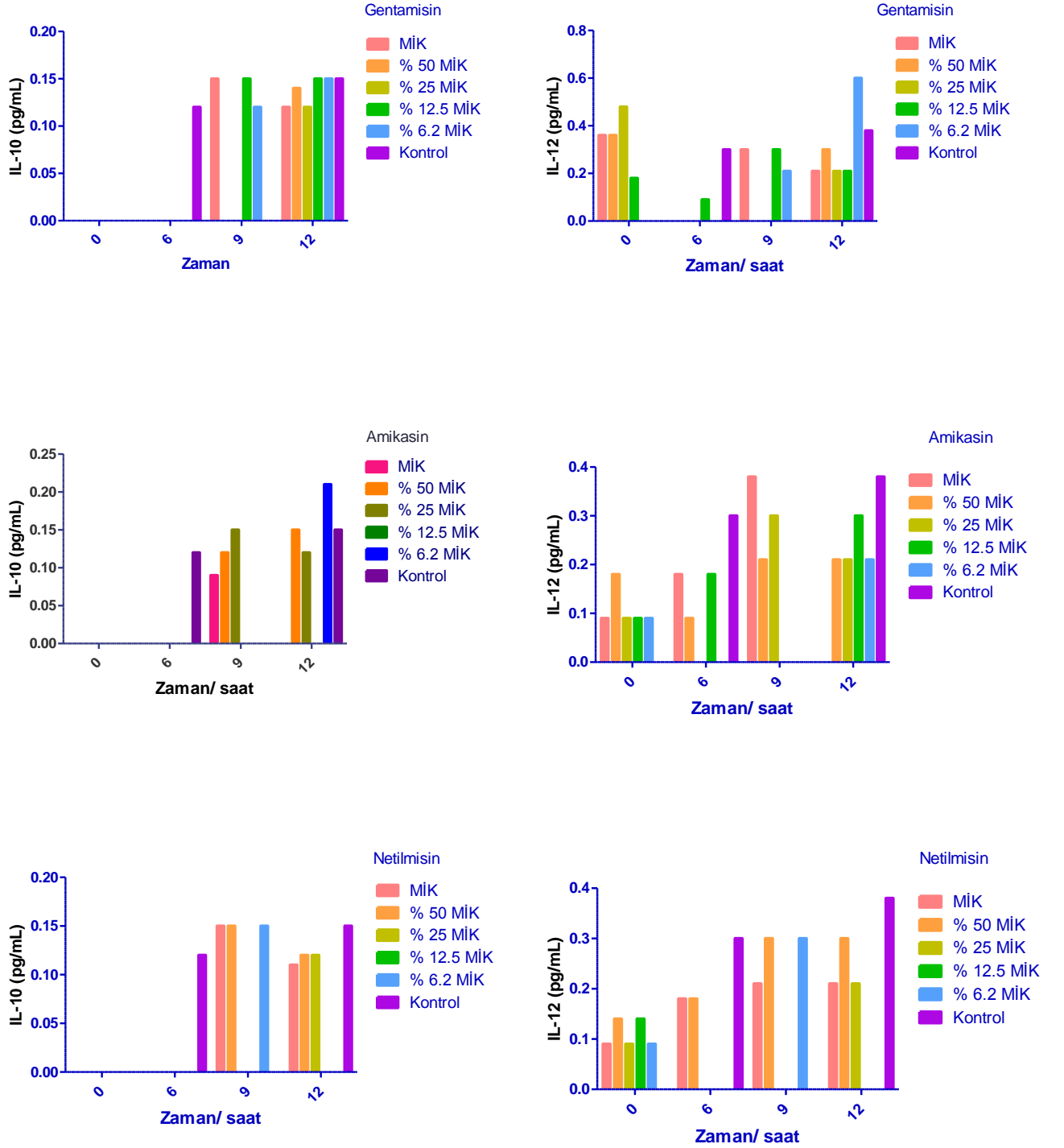
K1 suşu ile enfekte hücrelerde 0 ve 6. saatlerde aminoglikozidlerin etkisinde IL- 10 yanıtının olmadığı görüldü. IL- 10 yanıtının aminoglikozidlerin etkisinde zamana bağlı olarak arttığı belirlendi (Grafik 16).

IL- 12 yanıtın ise aminoglikozidlerin etkisinde sıfırıncı saatte olduğu görüldü. Gentamisin etkisinde 6. saatte IL-12 yanıtının olmadığı saptandı. Onikinci saatte gentamisinin % 6.2 MİK yoğunluğu etkisinde IL- 12 yanıtının kontrole göre arttığı belirlendi. Altı ve 12. saatlerde amikasin etkisinde IL- 12 yanıtının arttığı, 18. saatte azaldığı görüldü. Netilmisin etkisinde IL-12 yanıtının zamana bağlı olarak arttığı görüldü (Grafik 16)

Grafik 15: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği



Grafik 16: K1 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 10 ve IL- 12 yanıtlarının kinetiği



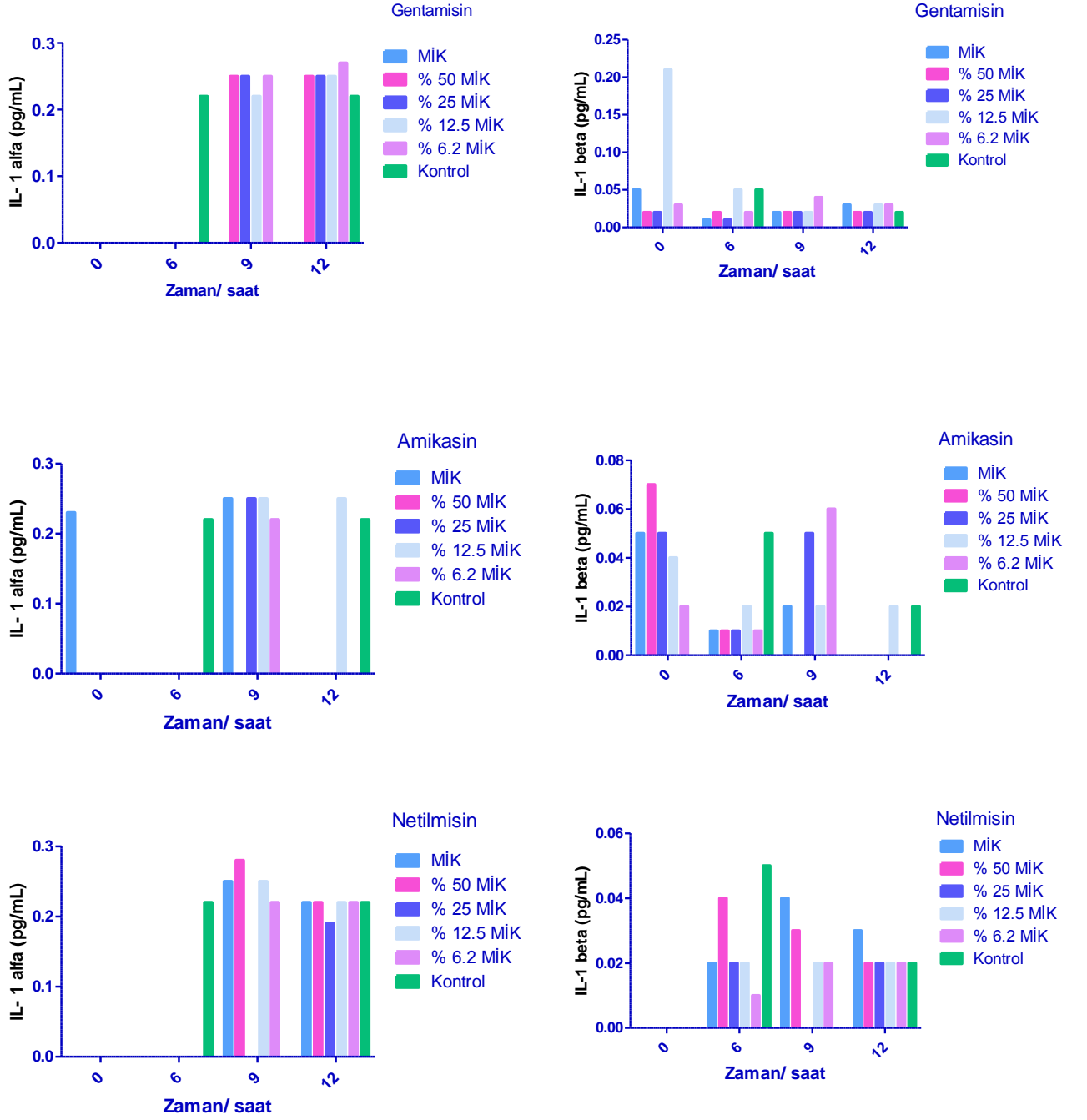
K2 suşu ile enfekte hücrelerde 0 ve 6. saatlerde gentamisin ve netilmisin etkisinde IL-1 alfa yanıtının olmadığı görüldü. Sıfırıncı saatte amikasinin MİK yoğunluğu etkisinde IL-1 alfa yanıtı belirlendi. Dokuz ve 12. saatlerde IL-1 alfa yanıtının kontrole yakın değerlerde olduğu görüldü (Grafik 17).

K2 suşu ile enfekte hücrelerde gentamisin etkisinde tüm saatlerde IL-1 beta yanıtının olduğu görüldü İlginç olarak sıfırıncı saatte gentamisinin MİK yoğunluğunda IL-1 beta yanıtının arttığı belirlendi. amikasin etkisinde ise 0. saatten itibaren görülen IL-1 beta yanıtının 6 ve 9. saatlerde azaldığı saptandı. Onikinci saatte ise amikasinin % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde IL-1 beta yanıtı görüldü. Netilmisin etkisinde 0. saatte IL-1 beta yanıtının olmadığı belirlendi. Altıncı saatte netilmisinin % 50 MİK yoğunluğunda IL-1 beta yanıtının arttığı görüldü. Dokuz ve 12. saatlerde netilmisinin MİK yoğunluğu etkisinde IL-1 beta yanıtının yüksek olduğu saptandı (Grafik 17).

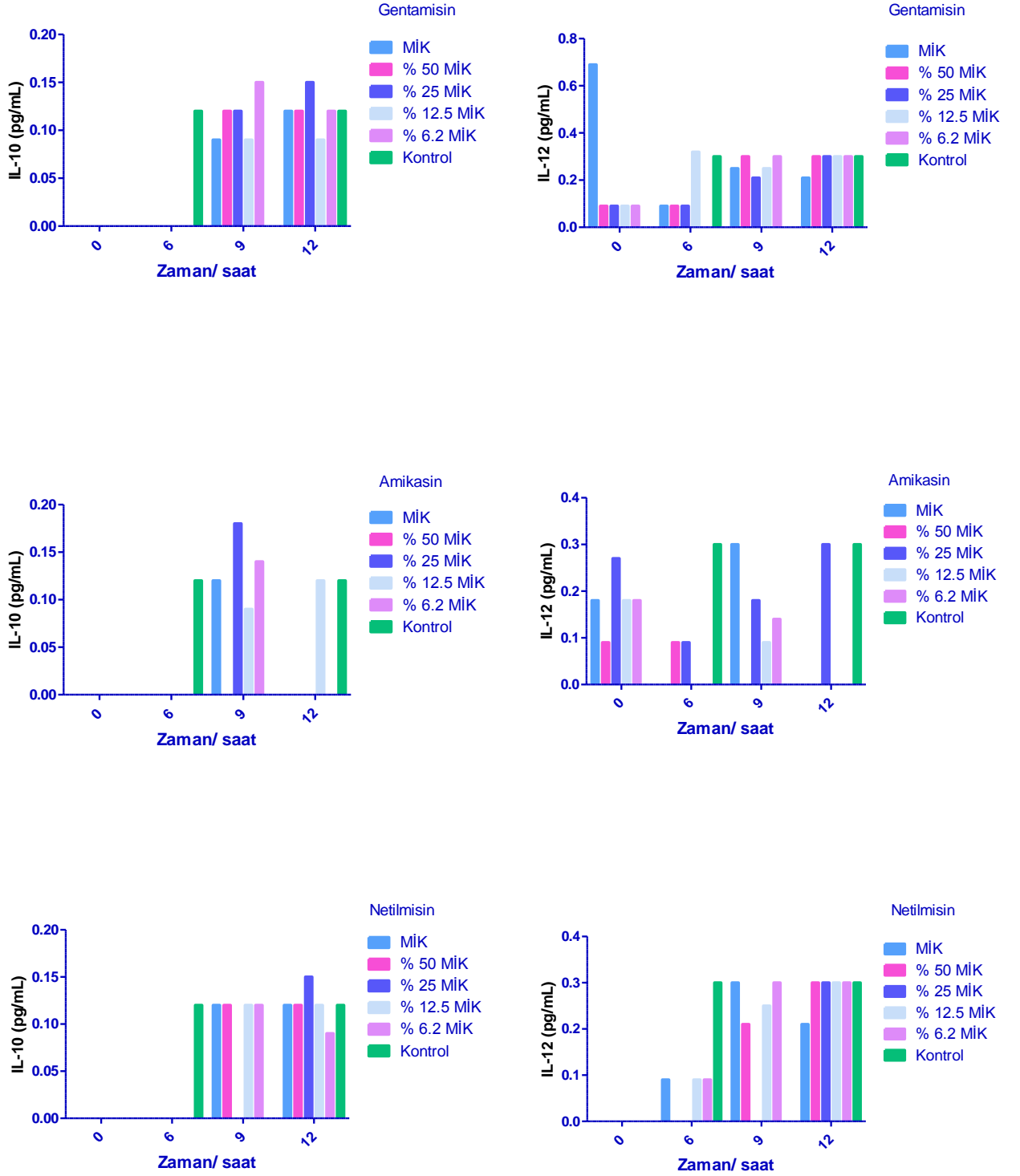
K2 suşu ile enfekte hücrelerde aminoglikozidlerin etkisinde 0 ve 6. saatlerde IL₁₀ yanıtının olmadığı görüldü. Gentamisin ve netilmisin etkisinde 9 ve 12. saatlerde IL-10 yanıtının kontrole yakın olduğu belirlendi. Dokuzuncu saatte amikasinin % 25 MİK yoğunluğunda IL-10 yanıtı kontrole göre yüksek bulundu. Onikinci saatte sadece % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde IL-10 yanıtının olduğu belirlendi (Grafik 18).

K2 suşu ile enfekte hücrelerde gentamisin etkisinde tüm saatlerde IL-12 yanıtının olduğu belirlendi. Sıfırıncı saatte gentamisinin MİK yoğunluğu etkisinde IL-12 yanıtının yüksek olduğu görüldü. Amikasin etkisinde 0. saatte görülen IL-12 yanıtının, 6. saatte % 50 MİK- % 25 MİK yoğunlukları etkisinde olduğu belirlendi. Dokuzuncu saatte amikasinin % 25 MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde kontrole göre azaldığı görüldü. Onikinci saatte amikasinin % 25 MİK yoğunluğu etkisinde kontrol ile aynı değerde IL-12 yanıtı görüldü. Netilmisin etkisinde 0. saatte IL-12 yanıtının olmadığı görüldü. Altıncı saate netilmisinin MİK-% 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde kontrole göre azalmış IL-12 yanıtı belirlendi. Dokuz ve 12. saatlerde kontrole yakın oranlarda IL-12 yanıtı saptandı (Grafik 18).

Grafik 17: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının kinetiği



Grafik 18: K2 suşu ile enfekte edilen HEp-2 hücrelerine aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin) uygulandıktan sonraki IL-10 ve IL-12 yanıtlarının kinetiği



5. TARTIŞMA

Antibiyotikler MİK, sub-MİK ve supra-MİK yoğunluklarında, bakterinin virülans salgılarını değiştirebilir ve sub-MİK antibiyotik yoğunluklardaki davranışları üzerine çalışmalar, tedaviye de ışık tutar. Sub-MİK, sözgelimi bir yara enfeksiyonunda, cilt altı kılcal damarlardaki antibiyotik yoğunlukları, yoğunluklar; adhezinleri ve yüzey proteinlerinin sayılarını değiştirerek, bakterinin tutunmasını, morfolojisini virülansını, hareketini etkiler (Yim ve ark, 2007). Fonseca ve arkadaşları, piperasilin/tazobaktam antibiyotiğinin sub-MİK yoğunluklarında durağan fazdaki *P. aeruginosa*'nın tutunmasının azalmasını nedenlerini; hem durağan hem de üreme fazının başında hidrofobiklik değişimi, bakteri şeklinin değişimi, her iki büyüme fazında da bakteri hareketindeki değişiklik olarak açıklamışlardır (Fonseca ve ark, 2007). Bakteriyal tutunma ("binding" – biyofilm) ve bakterinin konağa kolonizasyon evreleri oldukça karmaşıktır. Bu karmaşık evrelerin yorumlanması ve çoğunluğu algılama sistemlerinin yolaklarının tanımlanmasında *P. aeruginosa* model mikroorganizma olarak kullanılmaktadır (Stewart, 1996; Waters ve Bassler, 2005).

***Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde *In vitro* ve Enfeksiyon Modelindeki Enfekte Hücrelerden İzole Edilen Bakterilerin Çoğunluğu Algılama Yanıtları:** Mikroorganizmalar virülans özelliklerini birbirleri ile iletişim halinde iken genlerinde "upregulation/ downregulation" ("upregulation: ekspresyondaki artış, "downregulation: ekspresyondaki azalma) biçiminde değiştirirler. Mikroorganizma toplulukları özellikle değişen mikroçevreye uyum gösterirken (antibiyotik tedavisi = bakterinin ilk bulunduğu kimyasal çevreden farklı hale gelen kimyasal çevre,.. gibi) oldukça başarılıdır. *P. aeruginosa*'nın dirençli ve virulan birçok tipi, mikroçevre sinyallerini kullanan çoğunluğu algılama sistemleri ile genotiplerini ve fenotiplerini yeniden düzenler. Araştırmamızda bu nedenle çoğunluğu algılama sistemleri olan *las* ve *rhl* sistemlerini kullanan (mutant olmayan) standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşları kullanılmıştır.

In vitro* deneylerimizde; standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunda** (biyofilm negatif / aljinat pozitif olduğu bilinir) gentamisin, amikasin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde, ***las* çoğunluğu algılama sistemlerinin çalıştığı** belirlendi (Las* çoğunluğu algılama sistemi, bakteri tutunmasının "mikrokoloni oluşması dönemi"nde etkin hale geçer**).

Yine **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunda** (biyofilm negatif / aljinat pozitif olduğu bilindir) gentamisinin tüm yoğunlukları etkisinde **rhl sisteminin çalıştığı** saptandı. Amikasin ve netilmisinin MİK yoğunluklarının **rhl sisteminin çalışmasını baskıladığı**, ancak % 50 MİK yoğunluklardan itibaren **rhl sisteminin baskılamadığı** belirlendi (**rhl çoğunluğu algılama sistemi, las sisteminin çalışması ile devreye girer ve rhamnolipid, ikinci metabolitlerin üretimini tetikler**).

K1 suşunda gentamisin, amikasin ve netilmisin MİK ve sub- MİK yoğunluklarında **las sisteminin çalışmasının baskılandığı** görüldü. Gentamisin % 12.5 MİK yoğunluğundan itibaren **rhl sisteminin çalıştığı** saptandı. Amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde **K1 suşunda rhl sisteminin çalışmasının baskılandığı** belirlendi. Netilmisin tüm yoğunlukları etkisinde de **rhl sisteminin çalıştığı** saptandı. Çelişkili gibi görünen bu sonuç, uzun zincirli **las** sistemini **saptama yöntemimizin duyarlılığı veya 3. çoğunluğu algılama sistem olan “pqs” sistemi ile ilgili** olabilir. **Las** çoğunluğu algılama sistemi ile hem **pqs** hem de **rhl** sistemlerini yönetmektedir. Diğer bir deyişle **rhl** sistemi **las** ve **pqs** sistemi ile kontrol edilmektedir. Ancak **rhl** çoğunluğu algılama sistemi hiyerarşik düzenlemede farklı çalışabilir. **Las** çoğunluğu algılama sistemi etkin olmasa da **rhl**’ ye bağlı virülans sistemlerinin çalıştığı gösterilmiştir. Dördüncü bir sistem olan “Integrated Quorum Sensing” (IQS) sistemi ise **P. aeruginosa**’ da **las** çoğunluğu algılama sisteminin baskınlığını tersine çevirir. **LasI** ve **lasR** mutantlarda IQS sisteminin, **pqs** ve **rhl** sistemlerinin ekspresyonunu ve çoğunluğu algılama bağımlı virülans faktörlerinin üretimini upregüle ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark, 2013). Spekülasyon: **K1 klinik suşunda las** sisteminin çalışmadığı aminoglikozid (gentamisin, amikasin, netilmisin) yoğunluklarında **pqs** ve IQS sistemleri, 3. ve 4. sistemler olarak, **rhl** sisteminin çalışmasını düzenlemiş olabilir.

K2 suşunda gentamisin, amikasin, netilmisin etkisinde **las ve rhl sistemlerinin çalışmasının baskılandığı** görüldü.

Enfeksiyon modeli deneylerimizde; enfekte hücrelerden 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde izole edilen **standart ATCC 27853 P. aeruginosa**, **K1 ve K2 suşlarının** çoğunluğu algılama sistemleri değerlendirildi. Sıfır, 9 ve 12. saatlerde aminoglikozidlerin etkisinde ve aminoglikozid uygulanmamış kontrol grubundaki **her üç suşun las ve rhl** çoğunluğu algılama sistemlerinin çalışmadığı görüldü. Altı ve 18. saatlerde ise, aminoglikozidlerin etkisinde ve aminoglikozid uygulanmamış kontrol grubundaki **her üç suşun las ve rhl** çoğunluğu algılama sistemlerinin çalıştığı belirlendi.

In vitro çoğunluğu algılama sistemleri yanıtlarının enfeksiyon modelindeki enfekte hücrelerden izole edilen bakterilerin çoğunluğu algılama sistemleri yanıtlarından farklı olması

ilginç bir sonuçtur ve bakterinin enfeksiyon süresince mikroçevreye adaptasyon yeteneği sayesinde fenotipik özelliklerini değiştirdiğini göstermektedir (Bjarnsholt T ve ark, 2013). Bu da bakteriyel çoğunluğu algılama sistemlerinin düzenlenmesinde mikroçevre özelliklerinin etkin olduğu görüşünü ve mikroçevreye uyumda çoğunluğu algılama yollarının değişebildiği desteklemektedir. *P. aeruginosa* ile enfekte kistik fibrosisli hastalardan alınan balgam, bronko alveolar lavaj örneklerinde çoğunluğu algılama sinyal moleküllerinin üretildiği gösterilmiştir. Enfeksiyonu gelişiminde çoğunluğu algılama sistemlerinin etkili olduğu bilinmektedir (Collier ve ark, 2001; Middleton ve ark, 2002; Guina ve ark, 2003). Pearson ve arkadaşları, standart *P. aeruginosa* suşu ile *lasI/rhlI* mutant suşlarla yaptıkları çalışmada; mutant suşlarda virülans özelliklerinin önemli miktarda azaldığını göstermişlerdir (Pearson ve ark, 2000). Çalışmamızda kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının, farklı mikroçevre özelliklerini temsil eden gentamisin, amikasin ve netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında; çoğunluğu algılama sistemlerinin kontrol ettiği bağlanma- aljinat üretimi, biyofilm oluşumu, alkalin proteaz ve jelatinaz üzerine etkilerinin her suş ve antibiyotik için farklı farklı oldukları görüldü. Değişen mikroçevreye uyumda bakterinin virülans özelliklerinin değiştiğini belirledik. Bu sonuç bakterinin mikroçevreye uyumda fenotipik özelliklerini değiştirdiği görüşü ile uyumlu bir sonuçtur.

***Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde *In vitro* ve Enfeksiyon Modelinde Enfekte Hücrelerden İzole Edilen Bakterilerin Alkalin Proteaz ve Jelatinaz Yanıtları:** Korneal enfeksiyonlarda; konak dokunun yıkımı bakteri toksini ve / veya proteazları ile gerçekleşmektedir. Besin azlığında bakteri etkin proteaz enzimlerini salgılayarak kronik enfeksiyon süresince insan dokusunda canlı kalabilmektedir. Elastaz A (*lasA*), elastaz B (*lasB*), alkalin proteaz ve proteaz IV *P. aeruginosa* 'nın ürettiği ve hücre dışı proteaz enzimleridir. Elastaz ve alkalin proteazın korneal epitellere penetrasyonda etkin olduğu gösterilmiştir. Korneal enfeksiyon bölgesinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının çoğunluğu algılama sinyal molekülleri ürettiği, enfektif olmayan kontak lens ve / veya korneadan izole edilen suşların ise; çoğunluğu algılama sistemlerinde etkin olan *lasI*, *lasR* veya *rhlI* genlerinden mutant (-/-) olduğu belirlenmiştir (Zhu ve ark, 2004; Lynch ve ark, 2002).

***In vitro* deneylerimizde;** aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisindeki standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının alkalin proteaz ve jelatinaz enzimi üretimleri 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirilmiştir. Bu zaman dilimlerinde aminoglikozid uygulanmamış üç suşun da alkalin proteaz ve jelatinaz enzimlerini ürettikleri görüldü. Sıfır ve 18. saatlerde aminoglikozidlerin etkisinde her üç

suşun da alkalen proteaz ve jelatinaz enzimlerini ürettikleri belirlendi. Altıncı saatte gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunun**, Amikasinin MİK, % 50 MİK, % 25 MİK, % 12.5 MİK yoğunlukları etkisinde K1 suşunun, netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde ise **K1 ve K2 suşlarının** alkalen proteaz enzimi üretimlerinin baskılandığı görüldü. Dokuzuncu saatte ise, aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunun**, gentamisin tüm yoğunlukları etkisinde de **K1 suşunun** alkalen proteaz enzimlerinin baskılandığı saptandı. Aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde **K2 suşunun** proteaz enzimini ürettiği belirlendi. Sıfır, 6 ve 9. saatlerde aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde **üç suşta da** jelatinaz enzimi üretiminin olduğu belirlendi. *P. aeruginosa*'nın virülans özelliklerinin her birinin, her zaman eksprese etmediği bilinmektedir. Aminoglikozidlerin MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde alkalen proteaz ve jelatinaz yanıtlarının, suşa ve antibiyotik yoğunluğuna bağlı olarak değişmesi, bakterinin farklı mikroçevreye verdiği farklı yanıtı göstermektedir. Oldak ve arkadaşları; çalışmalarında bakteri çoğalmasının logaritmik fazında ve metabolik aktivitenin azaldığı durağan fazda siprofloksasin uygulamasının *P. aeruginosa*'nın alkalen proteaz enzimi üretiminde etki etmediğini göstermişlerdir (Oldak ve Trafny, 2005).

Enfeksiyon modeli deneylerimizde; enfekte hücrelerden izole edilen **standart ATCC 27853 P. aeruginosa, K1 ve K2 suşlarının** alkalen proteaz ve jelatinaz enzimleri üretimleri 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde değerlendirildi. *In vitro* sonuçlardan farklı olarak 0. saatte aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde alkalen proteaz ve jelatinaz enzimleri üretimlerinin baskılandığı belirlendi. Yine *in vitro* sonuçlardan farklı olarak 6. saatte gentamisin ve netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunun**, amikasin ve netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde **K1 suşunun**, netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde **K2 suşunun** alkalen proteaz ve jelatinaz enzimlerini ürettikleri belirlendi. **Onikinci saatte**, (*in vitro*'dan farklı olarak) aminoglikozidlerin etkisinde **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunun**, gentamisin ve amikasin etkisinde **K1 suşunun**, gentamisin etkisinde **K2 suşunun** alkalen proteaz enzimini ürettiği görüldü.

Hoiby ve arkadaşları kistik fibrosisli hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşları ile yaptıkları araştırmalarında bakterinin değişen mikroçevreye adapte olduğunu ve bu adaptasyon süresince bakteride fenotipik değişiklikler olduğunu göstermişlerdir (Hoiby ve ark 2011). Hücre dışı enzim üretimleri, her üç suşta konak (HEp-2 hücre dizisi) karşılaştıktan sonra değişmiş olması *P. aeruginosa*'nın değişen mikroçevreye uyumunda fenotipik değişiklik gösterdiğini desteklemektedir. Uyum yeteneğinin bir sonucu olan bu farklılığa

klirik açısından bakıldığında, bakterinin konak savunmasından kaçışı sağladığı görülmektedir. Konak (mikroçevre) zelliklerine uyum sağlama sürecinde virülans genlerinin sunum (expression) mekanizmalarının uyarılması ile bakterinin enfeksiyon bölgesinde sağkalımı sağlanmış olmaktadır (Hoiby ve ark, 2001).

***Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Aminoglikozidler Etkisinde *In vitro* ve Enfeksiyon Modelinde Enfekte Hücrelerden İzole Edilen Bakterilerin Bağlanma- Aljinat Üretimi ve Biyofilm Oluşumu:** Biyofilm oluşum basamakları tutunma, mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve dağılma olarak tanımlanmaktadır. Tutunma evresinden sonra görülen mikrokoloni oluşumunda, bakteriler Psl, Pel ve aljinat eksopolisakkaritleri üretirler. Daha sonra yapıya hücre dışı DNA (eDNA) bileşenleri katılmaktadır (Chiang ve Burrows, 2003; Vallet ve ark, 2001; Ma ve ark, 2009). *P. aeruginosa*'nın virülans göstergelerinin araőtırıldıėı birçok çalışmada hem planktonik hem de biyofilm formunda üremede ekzopolisakkarit aljinat üretiminin olduğu gösterilmiştir. Aljinat, mukoid *P. aeruginosa* suşlarının önemli hücre dışı bileőeni olarak tanımlanmaktadır. Aljinatın kompleman aktivasyonunu inhibe ettiği, nötrofil ve makrofajların fagositik etkisini azalttığı gösterilmiştir (Oliver ve ark, 1985; Meshulam ve ark, 1984; Learn ve ark, 1987).

Biyofilm oluşumu yzeeye tutunma ile başlayan, bakteri ve mikroçevre arasındaki karmaşık etkileşim mekanizmaları ile devam eder. Mikroçevre ile etkileşim ilk birkaç saat boyunca görülen geridnőüml tutunma başlar. Daha sonra bakterinin polisakkaritleri ve pilileri ile geridnőümsz tutunma gerçekleőtir. Epitel hücreleri ve mukus gibi solunum yolu bileşenlerine bakteriyel tutunma enfeksiyon geliőiminin ve kolonizasyonun ilk adımı olarak tanımlanır (Worlitzsch ve ark, 2002).

Kistik fibrosisli hastaların akciğer alveollerinde ve farklı konak dokularında oluşun *P. aeruginosa* enfeksiyonları için, antibiyotiklere karşı direnç geliőtmesi nedeniyle, biyofilm oluşumları oldukça önemlidir. Kistik fibrosisli hastalarda mukus salgısı düşük olduğundan enfeksiyonlara zemin hazırlaması nedeniyle fırsati enfeksiyon etkenleri (*Pseudomonas*, *Aspergillus*,...) ile çalışmalar yapılmaktadır (Manavathu ve ark, 2014; Lopes ve ark, 2014; Hengzhuang ve ark, 2012). Bu çalışmalarda sözgelimi *P. aeruginosa* enfeksiyon ortamında, oksijen yoğunluğunun dőklėine bağlı olarak metabolizmasını değiştirerek ilgili antibiyotiklere farklı yanıtlar verdiği saptanmıőtir.

***In vitro* deneylerde standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K1 suşlarının 12. ve 18. saatlerde bağlanma- aljinat üretimi olduğu belirlendi. Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun 12. saatte gentamisininin MİK yoğunluğunda, amikasinin % 6.2 MİK yoğunluğunda bağlanma- aljinat üretiminin arttığı belirlendi ($p<0.05$). Amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda**

ise bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.01$). **Onsekizinci saatte** ise bağlanma-aljinat üretiminin gentamisinin % 25 MİK yoğunluğunda arttığı belirlendi ($p<0.001$). Amikasinin MİK, % 50 MİK yoğunluklarında, netilmisinin MİK yoğunluğunda bağlanma- aljinat üretiminin azaldığı görüldü ($p<0.01$). **K2 suşunda** ise aminoglikozidlerin etkisinde bağlanma- aljinat üretimlerinin kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.05$). **K2 suşunda 12. saatte** bağlanma- aljinat üretimi olduğu, 18. saatte ise suşun biyofilm oluşturduğu belirlendi. Onikinci saatte gentamisinin MİK, % 12.5 MİK ve % 6.2 MİK yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretimlerinin baskılandığı görüldü ($p<0.01$). Onsekizinci saatte gentamisin ve amikasinin tüm yoğunluklarında bağlanma- aljinat üretiminin devam ettiği fakat biyofilm oluşumunun olmadığı görüldü ($p<0.05$). Netilmisin etkisinde **K2 suşunun** biyofilm oluşturabildiği ve netilmisinin % 12.5 MİK yoğunluğunda biyofilm oluşumunun kontrole göre arttığı saptandı ($p<0.01$).

Enfeksiyon modeline enfekte hücrelerden 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu değerlendirildi. Enfekte edilen HEp-2 hücrelerinden izole edilen (kontrol) **standart ATCC 27853 P. aeruginosa** suşunun 12 ve **18. saatlerde** bağlanma- aljinat üretimi olduğu görüldü. K1 ve K2 suşlarında **9 ve 18. saatlerde** bağlanma- aljinat üretimi olduğu belirlendi. Onikinci saatte ise **K1 suşunda** bağlanma- aljant üretiminin devam ettiği, **K2 suşunun** biyofilm oluşturduğu görüldü. Suşlar ile enfekte edilen hücrelere aminoglikozid uygulamasından sonra 0, 6, 9, 12 ve 18. saatlerde bakteriler izole edilerek bağlanma- aljinat üretimleri ve biyofilm oluşumları değerlendirildi. Onikinci saatte gentamisinin % 50 MİK yoğunluğundan itibaren, amikasinin MİK-% 50 MİK-% 25 MİK yoğunluklarında, netilmisinin MİK yoğunluğunda **standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşunun** bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı belirlendi ($p<0.001$). Onsekizinci saatte ise aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.001$). Dokuzuncu saatte amikasin ve netilmisinin MİK, % 50 MİK yoğunluklarında **K1 suşunun** bağlanma-aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.05$). Gentamisinin ve netilmisinin etkisinde 18. saatte **K1 suşunun** biyofilm oluşturduğu saptandı. Amikasinin MİK ve % 50 MİK yoğunluğu etkisinde ise bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.001$). Onsekizinci saatte ise gentamisin ve netilmisin etkisinde **K1 suşunun** bağlanma- aljinat üretiminin baskılandığı belirlendi. Amikasinin MİK-% 50 MİK- % 25 MİK yoğunluklarında **K1 suşunun** aljinat üretiminin baskılandığı görüldü ($p<0.001$). Dokuz, 12 ve 18. saatlerde gentamisinin etkisinde, 12 ve 18. saatlerde amikasinin tüm yoğunlukları etkisinde, 18. saatte netilmisinin tüm yoğunlukları etkisinde **K2 suşunun** bağlanma-aljinat üretiminin ve biyofilm oluşumunun baskılandığı görüldü ($p<0.001$).

Araştırmamızda elde ettiğimiz “dalgalanmalar” gösteren bakteri yanıtlarının, bağlanma-aljinat üretimi/ biyofilmin gelişme, olgunlaşma ve ayrılma olarak tanımlanan evrelerine paralel gittiği düşünülmektedir. Ancak özellikle 12. saatten önce elde edilen hücre kültür sonuçları oldukça ilginçtir. Akciğer hücre hattı, makrofaj hücre hattı gibi farklı hücre modellerinde daha fazla sayıda suş ve daha fazla antibiyotik grupları ile yapılacak daha ileri çalışmaların bu konu ile ilgili soruları yanıtlamada katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Enfeksiyon bölgesinde bakteri hücreleri farklı fizyolojik mikroçevrelerde bulunabilirler. Biyofilm oluşumunda; yüzeye tutunma, yüzeyde çoğalma ve bakterinin bulunduğu çoğalma fazı önemlidir (Roberts, 2005; Walkers ve ark, 2003). Farklı fizyolojik mikroçevrelerde (farklı enfeksiyon bölgelerinde), çoğalmanın yavaşlaması bakterileri antibiyotiklerden korunmasını sağlamaktadır ve bu da biyofilm oluşumu ile meydana gelen direncin bakteri çoğalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Biyofilm içinde olduğu zaman *P. aeruginosa*’daki uzun dönem adaptasyonları, genomlarındaki artan mutasyonlar ile meydana gelmektedir. Bu genomik değişiklikler nokta mutasyonları, genomik adaların kazanılması ve kaybedilmesi, genomik yeniden düzenlemeleri içermektedir (Spoering Alve Lewis; 2001). Çalışmamızda belirlediğimiz suşların farklı aminoglikozid (gentamisin, amikasin ve netilmisin) farklı yoğunluklarında farklı zamanlarda biyofilm yapısını oluşturabilmesi, adaptasyon sürecinde suşların “farklı yanıt” verdikleri görüşünü destekler görülmektedir. Topikal (içerikteki antibiyotikğin yaklaşık olarak %30’ un emildiği kabul edilir) ve / veya sistemik (periferik dolaşımdaki etken maddenin miktarı, etken maddenin ilk enjekte edildiği yerden daha düşük olacaktır) antibiyotikler ile enfeksiyonların sağaltımında biyofilm oluşumundan kaynaklanan problemler çıkmaktadır (Percival ve ark, 2005). Çalışmamızda zamana bağlı olarak azalan antibiyotik yoğunluğuna paralel olarak 12. saatte klinik suşlarda biyofilm oluşumunun meydana gelmesi bunu destekler görünmektedir.

Enfeksiyon modelindeki apoptoz nekroz değerlendirmesinde altıncı saatte **standart ATCC 27853 suşunun** amikasin ve netilmisinin % 25 MİK’ ten itibaren; **K1 suşunun** gentamisinin MİK- % 12,5 MİK yoğunluklarında, amikasinin % 50 MİK yoğunluğunda; K2 suşunun ise gentamisinin % 25 MİK yoğunluğunda bağlanma-aljinat üretiminin başladığı belirlendi. Konak ile etkileşimin *in vitro* koşullarda belirlenenden daha hızlı olduğu düşünülebilir. *In vitro* değerlendirmemizde bağlanma- aljinat üretiminin tüm suşlarda 12. saatte ve enfekte hücrelerden izole edilen bakterilerin bağlanma- aljinat üretimleri 9. saatte başladığı görüldü. Onikinci saatte **K1 ve K2 suşlarının** biyofilm oluşturdıkları belirlendi.

Bu bulgu konak ile karşılaşan bakterinin bağlanma-aljinat üretimi ve biyofilm oluşumu özelliğini değiştirdiğini göstermektedir. Ayrıca mikroskopik değerlendirmede tespit edilen “aljinat” yapının altıncı saatte görülmesi konaktaki bakteri davranışının farklı olduğu görüşünü desteklemektedir. Biyofilm şeklinde üreme gösteren bakterilerde görülen antibiyotiklere karşı direnç yavaş üreme (uzun süren yenilenme zamanı), biyofilmin tabanındaki oksijen miktarının azalması gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişmektedir. Biyofilm yapısında üreyen bakterilerde direncin artması, antibakteriyel tedavinin neden başarısız olabildiğini açıklamaktadır. Buna karşın antibiyotikler için laboratuvarlarda *in vitro* duyarlılık testleri yapılmaktadır. Diğer yandan antibiyotik tedavileri planktonik bakterileri eradike ederek hastaların belirli ölçüde iyileşmelerini sağlamaktadır. Planktonik üreyen bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için laboratuvarlarda kullanılan rutin teknikler, biyofilmlerde üreyen bakterilerin eradikasyonları için yeterli ol(a)mayabilirler (Hoiby ve ark, 2001). Biyofilm oluşumunda; aerobik ve anaerobik solunumda önemli olan proteinlerin yapımı değişmektedir. Protein yapısı ve hareket özelliği değişen biyofilm yapısındaki bakteriler bu evrede tekrar planktonik fenotipe dönmektedir (Sauer ve ark, 2002). Schaber ve arkadaşları klinikten izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının polikarbonat membranda biyofilm oluşumunu sağlayarak, planktonik form ile biyofilm formunun; *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan imipenem (karbopenem β -laktam), gentamisin (aminoglikozid) ve piperasilin-tazobaktam (β -laktamaz inhibitörü) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını araştırmışlar ve biyofilm formunun planktonik forma göre yaklaşık 10 kat daha dirençli hale geldiğini göstermişlerdir (Schaber ve ark, 2007).

Biyofilm yapılarında, fiziksel olarak antibiyotik penetrasyonunun baskılanması direncinin artmasına neden olmaktadır (Gillis ve ark, 2005). Hoffman ve arkadaşları aminoglikozid gurubu antibiyotiklerin sub-MİK yoğunluklarının “aminoglycosidase response regulatory” (Arr) genini aktive ederek *P. aeruginosa*’ da biyofilm oluşumlarını arttırdıklarını göstermişlerdir (Hoffman ve ark, 2005). Bu ilginç bir sonuçtur: Arr; biyofilm oluşumu, virülans etmenlerinin sunumu ve antibiyotik direnci için gerekli proteinlerin sentezlenmesinde ikincil mesajcı olan disiklik GMP (di- c GMP)’ nin sentezlenmesinde önemli olan gen bölgesidir ve bakterinin antibiyotikleri “mesajcı” olarak algıladığını göstermektedir (Kulasakara ve ark, 2006).

In vitro kinetik çalışmamızda 12 ve 18. saatlerde bağlanma- aljinat üretiminin görülmesi, aminoglikozidlerin (gentamisin, amikasin ve netilmisin) kullanılan üç *P. aeruginosa* suşları üzerinde bağlanma- aljinat üretimini artırıcı etkisi olabileceğini göstermiştir. Ayrıca enfeksiyon modeli kinetik çalışmamızda hücrelerde “aljinat yapı”

görülürken, hücreden izole edilen bakterilerde görülmemesi, mikroçevreyi oluşturan antipseudomonal antibiyotiklerin yanısıra konağın da bakterinin aljinat oluşumuna etkin olduğunu göstermektedir. Aljinat, enfeksiyonun kronik evresi ile ilişkili olarak bakterinin polisakkarit stres yanıtı olarak tanımlanmaktadır (Schurr, 2013). Hücre kültüründe aljinat yapının görülmesi kronik enfeksiyon başlangıcı olarak yorumlanabilir.

Üriner ve akciğer *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oluşan biyofilm yapı mimarisinin antibiyotik direncinin gelişmesinde oldukça önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Kalın mukozal yapı; kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin önemli bir mikroçevre özelliğidir. Landry (2006) ve arkadaşları *in vitro* yaptıkları bir çalışmada musin üzerinde büyük hücresel birikimler ile oluşan *P. aeruginosa* biyofilmlerinin mimarisinin farklı olduğunu ve musin ile ilişkili biyofilmlerin tobramisine daha dirençli olduğunu göstermişlerdir (Landry ve ark, 2006). *P. aeruginosa* yavaş çoğalma evresinde, planktonik ve biyofilm hücrelerinin siprofloksasine eşit direnç gösterdiği görülmüştür. Ancak çoğalma hızı artıkça, planktonik hücreler biyofilm hücrelerinden daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sonuca göre biyofilmin yapısal elemanları ve çoğalmanın yavaşlaması, antibiyotik sağaltımında biyofilmlerin neden olduğu dirençte oldukça önemlidir. Biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelerden 15 kat daha fazla antibiyotik direnci kazandığı dönem, durağan (stationary phase) dönemdir. Buna göre çoğalmanın hızlanması direnç seviyeleri için bir göstergedir ve çoğalmanın yavaşlaması da koruyucu bir etki gösterebilmektedir (Costerton, 1999). Onikinci saatte aminoglikozidlerin etkisinde *in vitro* da bağlanma-aljinat üretiminin olması, enfeksiyon modelinde de K1 ve K2 suşlarının biyofilm oluşturması bu görüşü desteklemektedir.

Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi: Çok hücreli organizmaların en önemli özgül bağışık yanıtlarından biri de, diğer hücrelerin sağlığı için enfekte hücreyi “feda etmek” tir. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü mikrobiyal enfeksiyonlara karşı görülen önemli savunma mekanizmalarıdır (Bergsbaken ve Cookson, 2007; Lamkanfi ve Dixit, 2010). Apoptoz (programlanmış hücre ölümü-intiharı) sadece immun sistemin homeostasisi için değil aynı zamanda konak- etken etkileşimlerindeki klinik ilerlemenin ve enfeksiyon şiddetinin belirlenmesinde temel göstergelerden biri olarak belirtilmektedir. Enfekte konak hücrelerin apoptoz ile temizlenmesi ile mikrobiyal çoğalma ve yayılım baskılanabilmektedir (Lamkanfi ve Dixit; 2010). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının erken evresinde apoptoz (apotoz evresinde ayrıca immün sistemin uyarımı gerçekleşmez ve apoptotik cisimlerin üretilmesi ile etkenin yaşamını sürdürmesine yardımcı olabilecek apoptotik paketler oluşur) görülmektedir (Le Berre ve ark,

2004; Junkins ve ark, 2014). HeLa bulaşı epitel hücre dizisi; larinks epidermoid karsinoma olan HEp-2 hücre dizisinde ise zamana bağlı olarak değerlendirdiğimiz apoptoz -nekroz yanıtlarında, aljnat üretiminin görüldüğü saatlerde nekrozun (hücrenin ani ve kaza sonucu ölümü, immün sistem uyarılabilir) olduğu belirlendi. Bağlanma- aljnat üretiminde apoptozun görülmemesi, *P. aeruginosa* enfeksiyon modelinin bu saatlerde “kronik enfeksiyona” dönüştüğünün bir göstergesi olabilir. Aynı zamanda bu enfeksiyonun seyrinin suşa bağlı olarak değişiklik gösterdiğini de ortaya koymaktadır.

Onsekizinci saatte, standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşları ile enfekte, antibiyotik uygulaması yapılmayan HEp- 2 hücrelerinde IL- 1 alfa, IL- 1 beta, IFN gama, TNF alfa, IL- 4, IL- 8, IL- 10 ve IL- 12 yanıtının olmadığı belirlendi. Bu sonuç literatür ile uyumlu olarak bakterinin aljnat üretmeye başladıktan ve biyofilm oluşturduktan sonra konağın “immun yanıtından” korunduğu görüşünü desteklemektedir (Donlan ve Costerton, 2002; Drenkard, 2003; Holm ve Vikström,2014).

Standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 Suşları İle Enfekte Edilip; Aminoglikozid Uygulanan HEp- 2 Hücrelerindeki Nitrit Oksit ve Sitokin Yanıtlarının Değerlendirilmesi: Nitrik oksit (NO) önemli bir ikincil sinyal ve antimikrobiyal etki mekanizmalarında etkili olan serbest radikal bir gazdır (Bogdan ve ark, 2000). NO sentaz enzimi ile L- arjininden sentezlenen NO’ in üç izoformu tanımlanmıştır. Endotelial NOS ve nöral NOS temel olarak nanomolar seviyesinde eksprese edilip üretilmektedir (fizyolojik yanıtta üretilenler). Üçüncü NOS izoformu olan uyarılabilir (inducible) NOS (iNOS), enflamatuvar uyarım sonrası azami ölçüde eksprese edilmektedir (patolojik yanıtta üretilen) ve göreceli olarak büyük miktarlarda, mikromolar seviyesinde üretilmektedir. iNOS ile üretilen NO birçok bakteri, mantar, protozoan ve helmintlere karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Ermert ve ark, 2002; Shaul ve ark, 2002).

Konak yanıtının değerlendirildiği enfeksiyon modeli kinetik çalışmada, sadece bakteriler ile enfekte HEp-2 hücrelerinin NO yanıtlarının (çalışmamızda elde edilen NO değerleri, iNOS etkinliği sonucu hücrelerin ürettiği NO miktarlarını gösterir –patolojik yanıtlar sonucu ortaya çıkar) 0. saatten itibaren başladığı ve 6, 9, 12 ve 18. saatlerde artarak devam ettiği saptandı. **Dokuzuncu saatte standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşu** ile enfekte hücrelerin NO yanıtının; **gentamisin**in % 25 MİK yoğunluğundan itibaren kontrole göre azaldığı görüldü ($p < 0.05$).

K1 suşu enfekte hücrelerin NO yanıtlarının gentamisininin % 50 MİK yoğunluğundan itibaren ($p < 0.001$), **K2 suşu** ile enfekte hücrelerin ise gentamisininin tüm yoğunluklarında

kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.01$). **Onikinci saatte üç suş** ile enfekte hücrelerin aminoglikozidler etkisinde NO yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü ($p<0.001$).

Dokuzuncu saatte standart ATCC 27853 P. aeruginosa suşu ile enfekte hücrelerin NO yanıtının, **amikasinin** % 12.5 MİK yoğunluğu etkisinde kontrole göre arttığı belirlendi ($p<0.001$). **K1 suşu** ile enfekte hücrelerde ise **amikasinin** MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluğunda nitrik oksit yanıtının olmadığı görüldü. **K2 suşu** ile enfekte hücrelerde de NO yanıtının **amikasinin** MİK yoğunluğunda olmadığı, sub-MİK yoğunluklarında kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$).

Onikinci saatte standart ATCC 27853 P. aeruginosa ve K1 suşları ile enfekte hücrelerin gentamisin etkisinde NO yanıtlarının kontrole göre azaldığı görüldü ($p<0.001$). **K2 suşu** ile enfekte hücrelerde ise **amikasinin** MİK yoğunluğunda yanıtın olmadığı belirlendi ($p<0.001$). **Onikinci saatte standart ATCC 27853 P. aeruginosa ve K1 suşları** ile enfekte hücrelerin NO yanıtlarının netilmisin etkisinde azaldığı saptandı. **K2 suşu** ile enfekte hücrelerin NO yanıtlarının ise netilmisinin MİK yoğunluğunda arttığı ($p<0.01$) görüldü. **Netilmisinin** sub- MİK yoğunluklarında ise yanıtın kontrole göre azaldığı belirlendi ($p<0.001$).

iNOS makrofajlar, nötrofiller ve epitel hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Bu hücrelerdeki ekspresyonu IL-1, TNF- α ve IFN- γ gibi proenflamatuvar sitokinler ve lipopolisakkarid yapısı ile düzenlenmektedir (Shaul ve ark, 2002). Araştırmamızda TNF- α ve IFN- γ yanıtlarının olmadığı, IL- 1 alfa ve IL- 1 beta yanıtlarının zamana, suşa, ve aminoglikozidlerin yoğunluğuna bağlı olarak değiştiğini gördük. Parmerly ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın TNF-alfa, IFN-gama, IL-1alfa, IL-1 beta üretimlerini inaktive edebildiğini göstermişlerdir (Parmerly ve ark,1990). Normal konak inflammatuvar yanıtı iki fazdan oluşmaktadır:

(1) Sinyal iletimi, gen transkripsiyonu ve pro- enflamatuvar aracılardan üretimi ile sonuçlanan aktivasyonun uyarılması ve

(2) Sinyal iletimi, gen transkripsiyonu, anti-enflamatuvar aracı moleküllerin üretiminin artması ve pro-enflamatuvar aracı moleküllerin üretiminin azalması, endositoz ve temel duruma geçişi tanımlayan terminal faz (Sagel ve ark, 2007). Araştırmamızda tüm aminoglikozidlerin tüm yoğunlukları etkisinde 0, 6, 9 ve 12. saatlerde suşa ve aminoglikozidlerin yoğunluğuna bağlı olarak değişen IL-1 alfa, IL-1 beta, IL- 10 ve IL- 12 yanıtının olduğunu belirlendi. Enfeksiyon modeli çalışmamızda 18. saatte ortamda hiç hücre kalmadığını ancak aljinat üretiminin olduğu görüldü. Zamana, antibiyotiğe ve antibiyotik yoğunluklarına göre farklılık gösteren sitokin yanıtları çalışmamızda kullanılan mikroçevreye

yanıtta (enzim üretimi, çoğunluğu algılama sistemleri yanıtları, bağlanma-aljinat üretimi ve biyofilm oluşumları) farklılık gösteren **standart ATCC 27853 P. aeruginosa, K1 ve K2 suşlarının** farklı şekilde konak immun yanıtını uyardığını göstermektedir.

İmmun sistem ile ilgili yorumlarımızda hücre hattının özelliğine bağlı olarak elde ettiğimiz sonuçlara bakacak olursak: Sıfır, 6, 9 ve 12. saatlerde, **standart ATCC 27853 P. aeruginosa, K1 ve K2 suşları** ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEP-2 hücrelerinde IL-4, IL-8, TNF- alfa, IFN-gama yanıtlarının olmadığı görüldü. Onsekizinci saatte **standart ATCC 27853 P. aeruginosa, K1 ve K2 suşları** ile enfekte edilen ve aminoglikozid uygulanmayan HEP-2 hücrelerinde IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN-gama yanıtlarının olmadığı belirlendi. Bu noktada bu sinyal moleküllerinin özgün antikoları ile ileri hücre kültür çalışmalarının bakteri sayısının artışının enfeksiyonu ve biyofilm gelişimini etkileyip etkilemediği ile ilgili çalışılması gerekmektedir.

6. SONUC VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında hazırlanan *in vitro* ve hücre kültürü enfeksiyon modellemelerinde “Translasyonel Tıp” (from benchside to bedside-from bedside to benchside) kavramına uygun şekilde, “**klinisyenin hasta başındaki sorunlarına katkıda bulunmak**” amacı güdülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* fırsatçı bir patojendir, hücrede ilgili reseptörlere tutunarak enfeksiyon yaratır. Özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonları öldürücü olabilir. Bu enfeksiyonların tedavisi klinik hekimin genellikle “başını ağrıtan” konulardandır çünkü laboratuvar çalışmalarından gelen sonuçlar her zaman hekime yardımcı olmayabilir. Doktora tez çalışmasında “laboratuvar-klinik uyumsuzluğu” nun nedenlerini araştırmak üzere, patojenin *in vitro* (klinik mikrobiyoloji laboratuvarındaki tanı testlerini simgeler) yaşam döngüsü ile enfeksiyon modeli- hücre kültürü (canlı konağı temsil eder) yaşam döngüsü birbirinden farklıdır / değildir, hipotezleri üzerinden deneysel çalışma modelleri hazırlanmıştır. Günümüzde tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı (gentamisin, amikasin ve netilmisin olmak üzere üç anti-pseudomonal aminoglikozid değerlendirilmiştir), özellikle enfeksiyon modeli- hücre kültüründeki döngüsünde, bakterinin ve konağın nasıl davrandığı, bu davranış(lar)ın antipseudomonal tedaviyi nasıl etkileyebileceği araştırılmıştır.

In vitro deney sonuçlarına göre; her üç *Pseudomonas aeruginosa* suşunun (ATCC standart suş, K1 ve K2 klinik suşları), alkalin proteaz ve jelatinaz üretimlerinin (ekstraselüler salgılanan; kompleman sistemini – immünoglobülinleri – hücresel bağışıklığı baskılayan virülans etkenleri) antipseudomonal aminoglikozidlerin etkisiyle “zamana bağlı olarak” değiştiğini belirledik. Bağlanma- alijnat üretiminin her üç suşta kullanılan aminoglikozidlerin tüm dilasyonlarında 12. saatte oluşturmaya başladığını ve 18. saatte devam ettiğini gördük. Enfeksiyon modeli deney sonuçlarına göre ise; standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun 12 ve 18. saatlerde bağlanma- alijnat üretiminin olduğunu belirledik. Aminoglikozidlerin etkisinde 18. saatte bağlanma- alijnat üretiminin baskılandığını gördük. K1 ve K2 suşlarının 9 ve 18. saatlerde bağlanma- alijnat ürettiklerini, 12. saatte de biyofilm oluşturdıklarını belirledik. *In vitro*’ dan farklı olarak 18. saatte aminoglikozidlerin etkisinde K1 ve K2 suşlarının bağlanma-alijnat üretimi ve biyofilm oluşumlarının baskılandığını belirledi. Enfeksiyon modelinde, aminoglikozidler ile karşılaşan K1 ve K2 suşlarının 12. saatte daha virülan hale geldiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre, antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili bilinen “duyarlılık için yapılan inkübasyon süreleri 16-18 saat olur” kavramını

tartışmaya açmak gerekebilir. Ancak bunun için de test edilecek suş sayısı arttırılarak, farklı antibiyotik grupları ile standardizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

In vitro ve enfeksiyon modelindeki kinetik çalışmalarda, “12. saatin kritik görünmesinin” nedeni, bu değişikliğin biyofilm içindeki bakterilerin karbon-oksijen-fosfat-nitrik oksit gibi değişen mikroçevre koşullarına uyum amacıyla, genetik sunumlarının farklılaşmasına bağlı olabilir. Ayrıca biyofilmin içindeki bakterilerin yoğunluğuna bağlı olarak salınan yoğunluğu algılama sinyal moleküllerinin uyardığı gen bölgesi de değişmiş olabilir. Yine biyofilmin ”mantar şeklindeki mimarisi”nden aljinat üretimi de sorumludur, bu yapının kanalları içindeki su ve oksijen miktarları, önemli bir mikroçevre ortamı olarak (karbon – oksijen miktarları üzerinden), bakterinin metabolik yapısının düzenlenmesini etkileyecek genetik değişimlere neden olabilir.

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları’ nda hastadan alınan klinik örnekten bakteri izole edilmekte ve izole edilen bakterinin antibiyogramı yapılmaktadır. Antibiyogram sonuçları genellikle “overnight” (ertesi günün sabahı, 16-18 saat sonra) inkübasyondan sonra değerlendirilir. Ancak dikkat edilmesi gereken konu şudur: Hastadan izole edilen bakteri olası biyofilm yapısından ayrılmış bakteridir ve bu durumda bakteri planktonik evrede (bağlanma-aljinat üretimi yoktur) iken antibiyogram yapılmaktadır. Hücreye tutunmuş bakterinin patojenite özellikleri ile laboratuvarında besiyerlerinde (*in vitro*) üretilen bakterinin patojenite özellikleri, mikroçevreye adaptasyon özelliğinden dolayı aynı olmayabilir. İzole edilen bakterinin biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi-bilinmesi ve daha sonra bu dikkate alınarak “biyofilm temelli antibiyogram uygulanması” klinik açıdan yararlı olacaktır.

Gelişen antikorların biyofilm içine ulaşmadığı bilinmektedir. Bugüne kadar yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz veriler her ne kadar yeni sorulara yol açıyor olsa da bu sonucun çalışmalarımızın verimliliği ve etkinliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Bu anlamda deneysel model çalışmalarımızın DNA sekanslama (dizileme) yöntemi ile bakterinin enfekte ettiği bireye-hücreye özgün özelliklerin çalışılması, dolayısı ile “tailored medicine”(kişiselleştirilmiş tıp) noktasına taşınması gerektiğini düşünüyor ve gerek bu yöntemlerin standartizasyonu gerek maliyet analiz (“cost effectiveness”) çalışmalarının gerekliliğine inanıyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Alan R. Hauser and Egon A Ozer. *Pseudomonas aeruginosa*. NatureReviews Microbiology. <http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/posters.pdf> (Erişim Tarihi: 20 Kasım 2013)
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol Microbiol. 2006 Feb;59(4):1114-28.
- Aminov RI. Biotic acts of antibiotics. Front Microbiol. 2013 Aug 19;4: 241
- Arai H. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2011 May 5;2:103.
- Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.
- Baskın H: Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: “Quorum sensing” (Çoğunluğu Algılama), Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006;36(2):111- 5.
- Baskin H, Ellermann-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen SC. Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor-alpha. J Gen Virol. 1997 Jan;78 (Pt 1):195-203.
- Baskin H, Yazici Z, Baskin Y, Olgun N et al. Effects of non toxic doses of acyclovir on nitric oxide and cellular death responses in herpesvirus types 1 and 2 infected Hep-2 cells. New Microbiol. 2005 Jul;28(3):205-13.
- Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013 Aug 28;12:22.
- Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Görüntülenmesinde İki Yöntemin Karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2008. 38(2).
- Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Deneysel Mikroçevre Modelleme Çalışması: *Pseudomonas aeruginosa'* nın farklı Hücre Dizilerinde Çoğunluğu Algılama ve Biyofilm Yanıtları. Türkiye Klinikleri Dergisi. 2009; 29: 3, 627- 42.
- Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC ve ark. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3605– 13.

- Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 2014 Sep;22(9):517-27.
- Bergsbaken T, and Cookson BT. Macrophage activation redirects yersinia- infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog.* 2007, 3:e161.
- Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Jan;387(2):409–14
- Bjarnsholt T, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013 Sep;21(9):466-74.
- Bogdan C, Rollingshoff M, and Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* 2000; 173: 17–26.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The Matrix Revisited. *Trends Microbiol.* 2005, 13, 20–6.
- Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH et al. Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production. *Mol. Microbiol.* 2009, 73, 622–38
- Caballero A, Thibodeaux B, Marquart M, Traidej M et al. *Pseudomonas keratitis*: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Feb;45(2):522- 30.
- Cabral D, Loh BA, and Speert DP. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr. Res.* 1987; 22: 429 – 31.
- Chiang P, Burrows LL. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2003 Apr;185(7):2374-8.
- Christen B, Christen M, Paul R, Schmid F, Folcher M, Jenoe P. et al. Allosteric Control of Cyclic Di-GMP Signaling. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 32015–24.
- CLSI. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış standart-Onaltıncı baskı.M100-S16. Ocak -2006; 26(3).
- Collier DN, Spence C, Cox MJ, Phibbs PV. Isolation and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pseudorevertants containing suppressors of the catabolite repression control-defective *crc-10* allele. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Mar 15;196(2):87- 92.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41: 435-64.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am.* 1978 Jan;238(1):86-95.

- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49: 711- 45.
- Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 1999 May;11(3-4):217-21.
- Davies DG, Parsek MR; Pearson JP, Iglewski BH at al. The involvement of the cell-to cell signals in the development of a biofilm, *Science* 1998; 280 (5361):295- 298.
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):445–53.
- Delden CV and Iglewski B. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases.* 1998; Vol:4: 551- 60
- DeVault JD, Kimbara K, Chakrabarty AM. Pulmonary Dehydration and Infection in Cystic Fibrosis: Evidence that Ethanol Activates Aljinate Gene Expression and Induction of Mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 1990, 4, 737–45.
- Déziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol.* 2001 Feb;183(4):1195-204.
- Diggie SP, Cornelis P, Williams P, Camara M. 4-Quinolone Signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old Molecules, New Perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006, 296, 83–91.
- Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167- 93.
- Douthit SA, Dlakic M, Ohman DE, Franklin MJ. Epimerase Active Domain of *Pseudomonas aeruginosa* AlgG, a Protein that Contains a Right-Handed Beta-Helix. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 4573–83.
- Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(13):1213- 9.
- Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, and Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab. Investig.* 2002; 82: 425– 441
- Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA at al. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiol.* 2007 Apr 18;7: 33.

- Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, et al. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-P. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3372-82.
- Fisher JF, Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Chem*. 2014 Jun 4;56C:41-48.
- Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *J Appl Microbiol*. 2007 Nov;103(5):1828–37.
- Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Sep;30(3):236–41.
- Fox A, Haas D, Reimann C, Heeb S et al. Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the *vfr* global regulatory gene. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(6):1902- 8.
- Franklin MJ, Douthit SA, McClure MA. Evidence that the *algI/algJ* Gene Cassette, Required for O Acetylation of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate, Evolved by Lateral Gene Transfer. *J. Bacteriol*. 2004, 186, 4759–73.
- Friedman L, Kolter R. Genes Involved in Matrix Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Biofilms. *Mol. Microbiol*. 2004, 51, 675–90.
- Fugua C, Parsek RM, Greenberg PE. Regulation of gene expression by cell- to-cell communication: acyl – homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 439.
- Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50: 727–51.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):34-40.
- Gacesa P. Bacterial Alginate Biosynthesis-Recent Progress and Future Prospects. *Microbiology* 1998, 144, 1133–43.
- George M, Pierce G, Gabriel M, Morris C et al. Effects of quorum sensing molecules of *Pseudomonas aeruginosa* on organism growth, elastase B production, and primary adhesion to hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens*. 2005 Mar;31(2):54- 61.

- Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE et al. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep;49(9):3858–67.
- Glasser NR, Kern SE, Newman DK. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. *Mol Microbiol.* 2014 Apr;92(2):399-412
- Guina T, Purvine SO, Yi EC, Eng J et al. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2771–6.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):7- 10.
- Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2683-90
- Henry Y, Bessières P. Denitrification and nitrite reduction: *Pseudomonas aeruginosa* nitrite-reductase. *Biochimie.* 1984 Apr;66(4):259-89.
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005 Aug 25;436(7054):1171– 5.
- Høiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 2001 Jan;3(1):23-35.
- Høiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* 2011;9:32.
- Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci.* 2014; 26;5: 309.
- Hurley M, Smyth A. Fluoroquinolones in the treatment of bronchopulmonary disease in cystic fibrosis. *Ther Adv Respir Dis.* 2012 Dec;6(6):363-73.
- Joint I, Allan Downie J, Williams P. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1115- 7.
- Ju LK, Chen F, Xia Q. Monitoring microaerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* by online NAD(P)H fluorescence. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005 Dec;32(11-12):622-8.

- Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P et al. Global Regulation of Quorum Sensing and Virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2004, 150, 831–41.
- Junkins RD, Carrigan SO, Wu Z, Stadnyk AW, Cowley E, Issekutz T, Berman J, Lin TJ. Mast cells protect against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. *Am J Pathol*. 2014 Aug;184(8):2310-21.
- Kanamaro S, Kurazono H, Terai A, Monden K et al. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*; 2006.
- Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell- to- cell signalling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005; 73: 3197.
- Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Onbirinci baskı. Ankara, Hacettepe-Taş yayınevi; 2005 sf: 216- 22.
- Köhler T, Dumas JL, Van Delden C. Ribosome Protection Prevents Azithromycin-Mediated Quorum-Sensing Modulation and Stationary-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Dec;51(12):4243- 8.
- Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2839 -44.
- Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Diguanylate Cyclases and Phosphodiesterases Reveals a Role for Bis-(3'-5')-Cyclic-GMP in Virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 2839–44.
- Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*. 2002; 41: 22- 6
- Lamkanfi M Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2010 Jul 22;8(1):44-54
- Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK et al. Mucin- *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol*. 2006 Jan;59(1):142–51.
- Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens*. 2014; 18;3(3):596-632.
- Le Berre R, Faure K, Fauvel H, Viget NB, Ader F, Prangere T, Thomas AM, Leroy X, Pittet JF, Marchetti P, Guery BP: Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance. *Intensive Care Med* 2004, 30:1204e1211.

- Learn DB, Brestel EP, and Seetharama S. Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* aljinate. *Infect. Immun.* 1987; 55: 1813–8.
- Lebeaux D, Chauhan A, Létouffé S, Fischer F et al. pH-Mediated Potentiation of Aminoglycosides Kills Bacterial Persisters and Eradicates In Vivo Biofilms. *J Infect Dis.* 2014
- Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. Interactions of the Quorum Sensing Regulator QscR: Interaction with itself and the Other Regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol. Microbiol.* 2003, 48, 199–210.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* 2014.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):582-610.
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol.* 1998 Aug;44(8):707– 17.
- Lopes SP, Azevedo NF, Pereira MO. Emergent bacteria in cystic fibrosis: *in vitro* biofilm formation and resilience under variable oxygen conditions. *Biomed Res Int.* 2014:678301.
- Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW et al. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol* 2002;4(1):18 -28.
- Ma L, Lu H, Sprinkle, A, Parsek, MR, Wozniak DJ. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a Galactose- and Mannose-Rich Exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 8353–6.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 2009; 5(3):e1000354
- Maharaj R, May TB, Wang SK, Chakrabarty Am. Sequence of the alg8 and alg44 Genes Involved in the Synthesis of Aljinate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1993, 136, 267–9.
- Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 2):299-307.
- Manavathu EK, Vager DL, Vazquez JA Development and antimicrobial susceptibility studies of *in vitro* monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2014 Mar 3;14:53.

- Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul;36(4):893-916.
- Matsukawa M, Greenberg EP. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(14):4449- 56.
- May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD et al. Alginate Synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A Key Pathogenic Factor in Chronic Pulmonary Infections of Cystic Fibrosis Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, 4, 191–206.
- Mayer-Hamblett N, Ramsey BW, Kulasekara HD, Wolter DJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* Phenotypes Associated With Eradication Failure in Children With Cystic Fibrosis. *Clin Infect Dis.* 2014.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* 1997 Dec;143 (Pt 12):3703-11.
- McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 2702–8.
- Meshulam T, Obedeanu N, Merzbach D, and Sobel JD. Phagocytosis of mucoid and non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1984; 32: 151–165.
- Middleton B, Rodgers HC, Cámara M, Knox AJ et al. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Jan 22;207(1):1–7.
- Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(3):255-61.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol.* 2014, 8;4: 422.
- Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19(1):83–8
- Murray TS, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol.* 2008;190(8):2700-8.
- Nemoto K, Hirota K, Murakami K, Taniguti K et al. Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy.* 2003 Jun;49(3):121-5.

- Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 30;103(22):8305–6).
- Ołdak E, Trafny EA. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3281- 8.
- Oliver AM, and Weir DM. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* aljinate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin. Exp. Immunol.*1985; 59:190-6.
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(3):449-61.
- Parmely M, Gale A, Clabaugh M, Horvat R, Zhou WW. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1990 Sep;58(9):3009-14.
- Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007 Mar;189(6):2531-9
- Pappas KM, Weingart CL, Winans SC. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol*. 2004 Aug;53(3):755- 69.
- Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4331- 4.
- Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*. 2005 May;60(1):1- 7.
- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*. 2011 Apr 5;2:65.
- Rehm BH, Valla S. Bacterial Aljinate: Biosynthesis and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1997, 48, 281–8.
- Roberts ME. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*. 2005 Jan;151(Pt 1):75- 80.
- Robles-Price A, Wong TY, Sletta H, Valla S, Schiller NL.. AlgX is a Periplasmic Protein Required for Aljinate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 2004, 186, 7369–77.
- Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect*. 2000 (14):1721–31.

- Rybtke MT, Jensen PØ, Høiby N, Givskov M et al. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011 Apr;10(2):141-57.
- Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Aug 1;4(4):406-17.
- Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 2007, 189, 5383–6.
- Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 2;104(40):15876- 81.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002 Feb;184(4):1140–54.
- Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC et al. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(Pt 6):738- 48.
- Schabert M, Jahn D. Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*. 2010 Dec;300(8):549-56.
- Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M et al. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol*. 2007 Jun;189(11):4310-4.
- Schurr MJ. Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, Psl or alginate? *J Bacteriol*. 2013; 195(8):1623-6.
- Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S et al. PER–1 type beta lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med Sci Monit*. 2004; 10 (6): CR180–4.
- Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Sentürker S, Lee YJ. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):307-13
- Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol*. 2002; 64: 749–774.
- Shinabarger D, Berry A, May TB, Rothmel R, Fialho A, Chakrabarty AM. Purification and Characterization of Phosphomannose Isomerase-Guanosine Diphospho-D-Mannose Pyrophosphorylase. A Bifunctional Enzyme in the Aljinate Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem*. 1991, 266, 2080–8.

- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):762-4.
- Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1460-5
- Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001 Dec;183(23):6746-51.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
- Stewart PS. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(5):1052-8.
- Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. 2003 Mar;185(5):1485-91.
- Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Nov;40(11):2517-22.
- Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2002;(31):163S-170S
- Sztajner H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S et al. Autoinducer-2 regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation. *J Bacteriol*. 2007 Nov 2.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M. Et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4538-45.
- Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol*. 2012; :405191.
- Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34(9):2699-712
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A et al. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6911-6.
- Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Mar;30(2):274-91.

- Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G et al. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aro A live vaccine. *Veter Microb*, 2004; 101: 167–176.
- Von Götz F, Häussler S, Jordan D, Saravanamuthu SS et al. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol*. 2004 Jun;186(12):3837-47.
- Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI et al. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol*. 2003;185(7):2080-95.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jun;69(6):3327- 32.
- Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21: 319- 46.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1487
- Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jul 29;362(1483):1119- 34.
- Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Apr;12(2):182-91.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109:317-25.
- Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. 2005 Jul 29;309(5735):774-7.
- Yang L, Haagensen JA, Jelsbak L, Johansen HK et al. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *Environ Microbiol*. 2008 Sep;10(9):2331-43.
- Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1620–5.
- Yim G, Wang HH, Davies J. Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1483):1195–200.





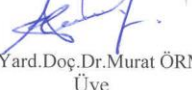

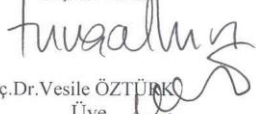


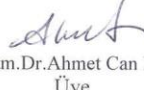
- Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
- Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thuruthyil SJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1897–903.
- Zielinski NA, Maharaj R, Roychoudhury S, Danganan CE, Hendrickson W, Chakrabarty AM. Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental Regulation of the algC Promoter. *J. Bacteriol*. 1992, 174, 7680–8.

8. EKLER

8.1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 05.10.2007/361

<p>Etik Kurul Üyeleri Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Prof.Dr.Tunç ALKIN Doç.Dr.Hakan ÖZDEMİR Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Doç.Dr.Mustafa SEÇİL Doç.Dr.Murat DUMAN Doç.Dr.Güven ASLAN Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Yunus KARSLI</p> <p>Etik Kurul Başkanı Prof.Dr.Taner ÇAMSARI</p> <p>Etik Kurul Sekreteri Hatice İĞCİ</p>	<p>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,</p> <p>Etik Kurulumuzun 01 Kasım 2007 tarih ve 10/23/2007 no.lu toplantısında, 335/2007 Protokol numaralı Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. İ.Hakkı BAHAR'ın proje yöneticisi ve Dr.Vahide BAYRAKAL sorumlusu olduğu, "Pseudomonas Aeruginosa DA' Aminoglikozidlerin (Gentamisin, Netilmisin, Amikasin) Etkisinde 'Quorum Sensing Sitokin İlişkisi Konak Cevabının Kinetiği" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.</p> <p>Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.</p> <p> Prof. Dr.Taner ÇAMSARI Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurul Başkanı</p> <p> Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER Üye</p> <p> Doç.Dr.Mustafa SEÇİL Üye</p> <p> Doç.Dr.Güven ASLAN Üye</p> <p> Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Üye</p> <p> Yunus KARSLI Üye</p> <p>Prof.Dr.Tunç ALKIN Başkan Yard.</p> <p> Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Üye</p> <p> Doç.Dr.Murat DUMAN Üye</p> <p> Doç.Dr.Hakan ÖZDEMİR Üye</p> <p> Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Üye</p>
--	---

Tel: 0232 412 22 54

8.2. ARBİS ÖZGEÇMİŞ

VAHİDE BAYRAKAL

TC Kimlik No / Pasaport No:	13833063524
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlıkta Kalite Geliştirme ve Akreditasyon AD
Telefon :	0232 412 6906
e-posta :	vahide.bayrakal@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
	Ege	Fen	Biyoloji	Lisans	2005
	Dokuz Eylül	Sağlık Bilimleri	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2008
	Dokuz Eylül	Sağlık Bilimleri	Sağlıkta Kalite Geliştirme ve Akreditasyon	Yüksek Lisans	2014

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Araş Gör	Mart 2009- Şubat 2014
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlıkta Kalite Geliştirme ve Akreditasyon Anabilim Dalı	Öğr. Gör	Şubat- 2014
				.	

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için gerekli Şartlar Standartı, TS EN ISO 15189 Tıbbi Laboratuvar Standardı, TS EN ISO 9001: 2008 Kalite Yönetim Sistemi

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
<input type="checkbox"/>	Bildiri Birinciliği	ANKEM	2012
	Yayın teşvik	TÜBİTAK	2012
	Bildiri Birinciliği	ANKEM	2010
	Yayın teşvik	TÜBİTAK	2009

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Güldaş N, **Bayrakal V**, Bahar İH. Gentamisin Etkisi Altındaki *Staphylococcus aureus* Suşlarının Biyofilm ve Koagülaz Yanıtları ile Mikroçevre İlişkisinin Değerlendirilmesi. Mikrobiyoloji Bülteni 2013; 47(1): 19-26.

İnceboz T; Yalçın G; **Bayrakal V**; İnceboz U; Derici Y. Investigation of *in vitro* Effects of Estrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators (Serms) On *Trichomonas vaginalis*. African Journal of Microbiology Research, 2012; Vol. 6(43), pp. 7078-7083

Baskın H, **Bayrakal V**, Bahar İH. Effects Of Gentamicin, Amikacin And Netilmicin On The Pathogenic Factors And Two Extracellular Quorum Sensing Systems Of *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(5):1319-26

Karaman M, Kiray M, **Bayrakal V**, Bağrıyanık H, Yılmaz O, Bahar İ. Sağlıklı ve İmmun Sistemi Baskılanmış Balb/ c Farelerde Deneysel Oral Kandidiyaz. Mikrobiyoloji Bülteni 2011, 45: 2.

Karaman M, **Bayrakal V**, Kiray M, Yılmaz O, Bağrıyanık H, Bahar İ. *P. aeruginosa* Quorum Sensing System And The Experimental Model Of Chronic Respiratory İnfection . Türkiye Klinikleri Dergisi. 2011,31:4, 981-4

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Deneysel Mikroçevre Modelleme Çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*'nın farklı Hücre Dizilerinde Çoğunluğu Algılama ve Biyofilm Yanıtları. Türkiye Klinikleri Dergisi. 2009; 29: 3, 627- 42.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Karaman M, Yılmaz O, **Bayrakal V**, Bahar İH. Gentamisin ve İmipenem Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Yanıtları ve Biyofilm Üretimi: *In vivo* Modelleme. ANKEM 2010; 24 (2): 76- 81

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Görüntülenmesinde İki Yöntemin Karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2008. 38(2).

Doğan Y, **Bayrakal V**, Baskın H, Bahar İH. Gentamisin Varlığında *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Biyofilm ve “Quorum Sensing” İlişkisi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2007; 37: 134 – 137.

Bayrakal V, Doğan Y, Baskın H, Bahar İH. Gentamisine Duyarlı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gentamisinin Biyofilm ve Koagülaz Oluşumuna Etkisi. ANKEM; 2007: 21(3):175–178.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Inceboz T; Yalcin G; **Bayrakal V**; Inceboz U; Derici Y. Investigation of *in vitro* Effects of Estrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators (Serms) On *Trichomonas vaginalis*. 8- 11 Kasım 2012. 17th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI), PORTUGAL, Lisbon. 2012' de poster bildirisi olarak sunuldu.

Bayrakal V, Baskin H, Bahar İH, Hoiby N. Kinetics Of The Biofilm Formation Of ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* Strain On Silicone Catheter Under The Effect Of Aminoglycosides: Evaluation With The Scanning Electron Microscopy. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases 28th International Congress of Chemotherapy, İNGİLTERE, Londra. 2012 de publication olarak sunuldu.

Bayrakal V, Bahar İ. Phenotypic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* In Two Different Microenvironments.7- 10 Mayıs.2011. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases 27th International Congress of Chemotherapy, İTALYA, Milano. 2011 de supplement online olarak sunuldu.

Baskin H, **Bayrakal V**, Bahar İH. Quorum Sensing - Cytokine - Relation in *Pseudomonas aeruginosa* under The Effect of Aminoglycosidase (Amikasin, Gentamisin, Netilmisin) 28 Haziran- 3 Temmuz 2009. The 3rd Congress of European Microbiologists FEM, İSVEÇ 2009' da poster bildirisi olarak sunuldu.

Güldaş N, **Bayrakal V**, Bahar İH. Gentamisin Etkisi Altındaki *Staphylococcus aureus* Suşlarının Biyofilm ve Koagulaz Yanıtları ile Mikroçevre İlişkisinin Değerlendirilmesi. 25- 29 Nisan 2012 27. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (ANKEM) sözlü sunum olarak sunuldu.

Karaman M, Kiray M, **Bayrakal V**, Bağrıyanık H, Yılmaz O, Bahar İ. Sağlıklı ve İmmun Sistemi Baskılanmış Balb/ c Farelerde Deneysel Oral Kandidiyaz. Kasım 2010. XXXIV Türk Mikrobiyoloji Kongresi, KKTC' de poster bildirisi olarak sunuldu.

Karaman M, **Bayrakal V**, Yılmaz O, Kiray M, Bağrıyanık Hİ, Bahar İH. Deneysel Kronik Akciğer Enfeksiyonu Modelinde, *Pseudomonas aeruginosa* Çoğunluğu Algılama Sistemlerinin Rolü ve Konak Bakteri Etkileşimi. 28 Nisan- 02 Mayıs 2010 25. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (ANKEM) sözlü sunum olarak sunuldu

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH.. *Pseudomonas aeruginosa* İnfeksiyonu Gelişiminde Fenotipik Değişikliklerin Önemi. 29 Nisan- 03 Mayıs 2009 24. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (ANKEM) sözlü sunum olarak sunuldu.

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. *Pseudomonas aeruginosa*' ya Karşı Aminoglikozid Kullanımı: Biyofilm Oluşumu, Bakteri Sayısı ile Orantılı mıdır? 1- 5 Nisan 2009. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi' nde poster bildirisi olarak sunuldu.

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Aynı Olgudan Ayrıştırılan *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Amikasin ve İmipenem Etkisi Altında Farklı Mikroçevredeki Davranışları: Bir Öncü Çalışma. 25- 29 Mart 2009. 14. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi' nde sözlü sunum olarak sunuldu.

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çevresel Koşulların Etkisinde Dinamik Ve Statik Biyofilm Gelişimi. 12- 25 Ekim 2008. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi nde sözlü sunum olarak sunuldu.

Baskın H, **Bayrakal V**, Bahar İH. Aminoglikozidlerin Silikon İdrar Sondası Üzerinde Biyofilm Oluşumuna Etkisi. Taramalı Elektron Mikroskopisi İle Kinetik Değerlendirme. 12- 25 Ekim 2008. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi nde sözlü sunum olarak sunuldu.

Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çoğunluğu Algılama (Quorum Sensing) Yanıtlarının Görüntülenmesinde İki Yöntem. 28 Mayıs- 1 Haziran 2008 23. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (ANKEM) sözlü sunum olarak sunuldu.

Baskın H, **Bayrakal V**, Bahar İH. Subminimal Dozlarda Gentamisin, Amikasin ve Netilmisin *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Patojenite Kriterleri ve “Quorum Sensing” Üzerine Etkisi. 29 Nisan- 3 Mayıs 2007. 22. Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (ANKEM) sözlü sunum olarak sunuldu.

Bayrakal V, Doğan Y, Baskın H, Bahar İH. Gentamisine Duyarlı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gentamisin Biyofilm ve Koagülaz Oluşumuna Etkisi. 12- 16 Eylül 2006. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi nde poster bildirisi olarak sunuldu.

Doğan Y, **Bayrakal V**, Baskın H, Bahar İH. Gentamisin En Düşük Baskılayıcı Yoğunluklarında *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarındaki Biyofilm ve “Quorum Sensing” İlişkisi Hakkında Ön Çalışma.12- 16 Eylül 2006. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi nde sözlü sunum olarak sunuldu