



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
SUŞLARININ VİRULANS FAKTÖRLERİ, BİYOFİLM FORMASYONU ve QUORUM
SENSİNG YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deniz DÜZGÜN

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
SUŞLARININ VİRULANS FAKTÖRLERİ, BİYOFİLM FORMASYONU ve QUORUM
SENSİNG YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deniz DÜZGÜN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Suna GEDİKOĞLU

BURSA-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR	51
TEŞEKKÜR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonları konakçı savunma mekanizmalarında kırılma yanında bakteriye ait çok çeşitli virulans faktörlerinin de katkısı ile ortaya çıkar. Bu faktörlerin üretimi ve kontrolü büyük oranda Quorum Sensing (QS) olarak adlandırılan hücrelerarası iletişim sistemlerine bağlıdır. Bu sistemlerin daha iyi anlaşılması yeni tedavi yaklaşımlarının bulunmasına olanak sağlayacaktır. Bu çalışmanın amacı farklı kaynaklı ve değişik lokalizasyonlarda enfeksiyon oluşturmuş *P aeruginosa* suşlarını virulans faktörleri, biyofilm yapma yeteneği ve quorum sensing kabiliyeti yönünden incelemektir.

Çalışmamızda hastalardan elde edilen 97 adet *P aeruginosa* suşu kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Bu örneklerin 6 tanesi idrar, 24 tanesi kan, 12 tanesi kateter, 40 tanesi trakeal aspirat, 15 tanesi yara kültüründen izole edilmişti. Pozitif kontrol olarak PAO1 (ATCC 15692) kullanıldı.

Doksanyedi örnekten 43'ünde Homoserin Lakton (HSL) üretimi gözlemlendi ve QS (+) olarak değerlendirildi. Kalan 54 suşun ekildiği besiyerlerinde beklenen renk değişikliği olmadı ve QS (-) olarak kabul edildi.

QS (+) bulunan suşlarda motilite QS (-) olanlara göre anlamlı derecede daha fazla gözlemlendi. QS (+) suşlarda swimming $0,73 \pm 0,2$, swarming $0,32 \pm 0,2$, twitching $0,75 \pm 0,3$ iken QS (-) olanlarda sırasıyla $0,59 \pm 0,2$, $0,25 \pm 0,1$ ve $0,63 \pm 0,2$ bulundu. (P=0,0002, 0,03 ve 0,009) İdrar örnekleri her üç motilite şeklinde diğer örneklerle göre daha fazla değere ulaştı.

QS (+) olan suşlar QS (-) olanlara göre hem tüpte hem de plate'de anlamlı olarak daha fazla biyofilm oluşturdular.(tüpte $0,93 \pm 0,4$ karşılık $0,79 \pm 0,3$, plate'de $0,83 \pm 0,4$ karşılık $0,70 \pm 0,3$, P=0,04) Kan ve kateter örnekleri, trakea aspirat sıvısı (TAS) ve yara örneklerine göre daha fazla biyofilm oluşturdular.

Piyosyanin, elastaz üretimi ve LasA aktivitesi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu.

Kromozomal DNA analizinde *LasI* intakt geni ve internal fragmanı QS(+) ve QS(-) olan tüm örneklerde görüntülendi.

lasR :QS(+) olan 43 suşun 36 sında intakt gen gösterilirken tümünde internal fragman gözlemlendi. QS(-) olan 54 suşun 45 inde intakt gen gösterilirken internal fragman 53 suşta gözlemlendi.

RhlI: QS(+) suşların 30 unda intakt gen gösterilirken tümünde internal fragman gözlemlendi. QS(-) suşların 38 inde intakt gen gösterilirken internal fragman tümünde gözlemlendi.

RhlR :QS(+) suşların 37 sinde intakt gen gösterilirken 39 unda internal fragman gözlemlendi. QS(-) suşların 42 sinde intakt gen gösterilirken internal fragman 49 suşta gözlemlendi.

Sonuçlarımız bakterinin kendi arasında kurduğu iletişim sistemi ve biyofilm oluşumunun tüm virulans faktörleri arasında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte incelediğimiz 97 suşun fenotipik davranışlarındaki çeşitlilik *P aeruginosa* suşlarının farklı davranışlar geliştirme özelliğini vurgulamaktadır. *P aeruginosa* virulans faktörlerinin hangi mekanizmalarla düzenlendiği ile ilgili daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler: pseudomonas, virulans, biyofilm, quorum sensing

SUMMARY

ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS FROM DIFFERENT SOURCES FOR VIRULANCE FACTORS, BIOFILM FORMATION and QUORUM SENSING

Numerous virulence factors and impaired host immune mechanisms have role in *Pseudomonas aeruginosa* infections. production and regulation of these factors mainly depend on intercellular communication systems called Quorum Sensing (QS). Better understanding of these systems would allow developing novel therapeutic approaches. This study aims that investigation of *P aeruginosa* strains from different sources and localisations in terms of virulence factors, biofilm and QS capability.

Ninety-seven *P aeruginosa* strains from patients were studied. Six strains were obtained from urine, 24 from blood, 12 from catheter, 40 from tracheal aspirate(TAS), and 15 from wounds. PAO1 (ATCC 15692) was served as positive control.

Forty-three strains of 97 expressed HSL and recorded as QS (+). Remained 54 strains were recorded as QS (-).

QS (+) strains showed statistically significant higher motility score than QS (-) strains. Swimming, swarming and switching were found $0,73 \pm 0,2$, $0,32 \pm 0,2$ and $0,75 \pm 0,3$ respectively in QS (+) strains whereas, $0,59 \pm 0,2$, $0,25 \pm 0,1$ and $0,63 \pm 0,2$ respectively in QS (-) strains. (P=0,0002, 0,03 and 0,009 respectively) Urinary samples reached higher scores than other samples in all three types of motility.

QS (+) strains built more biofilm than QS (-) strains both in tube and plate models. ($0,93 \pm 0,4$ versus $0,79 \pm 0,3$ in tube and $0,83 \pm 0,4$ versus $0,70 \pm 0,3$ in plate, P=0,04) Blood and catheter samples showed more biofilm build-up than tracheal aspirate and wounds.

Pyocyanine and elastase productions and LasA activity were found similar between QS (+) and QS(-) strains.

Chromosomal DNA analysis showed *LasI* intact gene and internal fragment in all QS(+) and QS(-) strains.

lasR : Intact gene was showed in 36 of 43 QS(+) strains, internal fragment was showed all of them. In QS(-) strains, intact gene was observed in 45 of 54 strains and internal fragment in 53 strains.

RhlI: Intact gene was showed in 30 of 43 QS(+) strains, internal fragment was showed all of them. In QS(-) strains, intact gene was observed in 38 of 54 strains and internal fragment in all strains.

RhlR : Intact gene was showed in 37 of 43 QS(+) strains, internal fragment was showed in 39 strains. In QS(-) strains, intact gene was observed in 42 of 54 strains and internal fragment in 49 strains.

These results imply that the important role of QS and biofilm in virulence factors. The diversity of phenotypic expression of 97 strains points that *P aeruginosa* has the ability of developing different behavior in different conditions. Mechanisms which regulate virulence factors of *P aeruginosa* have been less understood and still require further studies.

Keywords: pseudomonas, virulence, biofilm, quorum sensing

GİRİŞ

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* Ailesi'nde yer alan gram negatif basil morfolojisinde bakterileri kapsar. Doğada, toprakta ve suda oldukça yaygın olarak bulunurlar. Çevre koşullarına kolay uyum sağlarlar (1). Azot döngüsünde önemli rol oynarlar. *Pseudomonas*'lar katalaz ve oksidaz pozitif, şekerleri oksidasyon yoluyla parçalayabilen ancak fermentasyon yapmayan bakterilerdir, o nedenle nonfermentatif gram negatif basiller arasında yer alırlar (2).

Pseudomonas aeruginosa insan normal florasında yer alabilir ve sağlıklı kişilerde nadiren hastalık yapar. Konak savunmasının zayıflaması halinde, ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulması, damar içi veya üriner kateter varlığı, endotrakeal tüp kullanılması enfeksiyonu hazırlayıcı faktörlerdir. Nötropeni, hipogamaglobülinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar da *Pseudomonas* spp. enfeksiyonlarına zemin hazırlar. Yanık yarası enfeksiyonları, kronikleşmeye eğilimli idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, kornea ülserleri, panoftalmi, bronşit, bronkopnömoni, sepsisemi, ortakulak enfeksiyonları ayrıca kistik fibrozisli olgularda alt solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olabilirler. Antibiyotik ve dezenfektanların birçoğuna kolaylıkla direnç geliştirebildikleri için tedavi ve kontrol edilmeleri sorun oluşturabilir ve hastane ortamında kolayca yerleşerek hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (3).

P. aeruginosa'nın çevresel koşullara uyum yanında, önemli bir özelliği de nutrisyonel bağımlılığının az olmasıdır. Yeterli nem sağlandığında çok az besin maddesi ile uzun süre canlı kalabilir. Farklı besin kaynaklarını karbon kaynağı olarak kullanabilir. Bu durum doğada dayanıklılık ve devamlılığını sağlar. Örneğin hastane ortamında; başlıca solunum cihazları, su içeren nemlendiriciler, lavabo, duş, küvet gibi ortamlar yanında yataklar, çarşaf, gazlı bezler, tamponlar gibi çok sayıda alandan izole edilebilirler (4).

P. aeruginosa'nın hastalık oluşabilmesi için ilk basamak, patojenin uygun bölgeye yerleşmesidir. Bakteri her ne kadar normal intestinal florada yer alabilirse de, sağlıklı epitele tutunamadığından bir tehlike oluşturmaz. Ancak deri ve mukozaların yapısı bozulduğunda veya immün sistemin baskılandığı durumlarda adezyon, kolonizasyon ve penetrasyon yapma fırsatını yakalar. Çeşitli virulans faktörleri aracılığı ile patojenik özellik gösterir. *P. aeruginosa*'nın fiziki koşullara uyum sağlayabilmesi, beslenme gereksinimlerinin azlığı ve antibiyotiklere kolay direnç kazanabilmesi patojenitesine

katkıda bulunur. Bakterinin virülans faktörleri patogenezin her basamağında düzenleyici rol oynar (5).

P aeruginosa'nın pek çok virülans faktörleri yanında son yıllarda biyofilm yapma ve quorum sensing (QS) yeteneği önem kazanmıştır. Biyofilm oluşturan bakteriler polisakkarit matriks ile çevrelenmiş bir topluluk oluşturur ve bir taraftan dış etkenlerden korunurken bir taraftan da çoğalmaya devam ederler. QS ise ortamda bulunan bakteri sayısı ile ilgili bir yanıt olarak ortaya çıkar. Bakteri topluluğunda sayı belirli bir düzeye ulaştığında oluşan özel bir hücrelerarası iletişim yolu ile bazı genetik mekanizmalar aktif hale gelir ve bakterinin davranışı yönlendirilir. Çalışmamızda *P aeruginosa* suşlarının virülans faktörleri yanında biyofilm yapma yeteneği ve quorum sensing kabiliyeti yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

P aeruginosa; 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olabilen basil veya kokobasil morfolojisinde bakterilerdir. Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor oluşturmazlar. Gram negatif olarak boyanır. Tek polar flajellası ile hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flajella bulunabilir (6).

Zorunlu aerobtur, ancak oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO₃ varsa yaşamını devam ettirir. En iyi 37°C'de olmakla beraber, 20-42°C arasındaki ısılarda üreyebilir. Kolay üreyen bakterilerdir. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolayca üredikleri için izolasyonları kolaydır. *P aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virulansı daha yüksek olan diğer tipte alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir. Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondulan yapıda koloniler oluşturur. Bazıları hücre dışına alginat salgıladıklarından mukoid koloniler yapar (7). Genellikle β hemoliz oluştururlar. EMB, McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. Besiyerinde kendine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2-aminoasetofenon'a aittir ve *P aeruginosa*'ya özgüdür (8).

P aeruginosa'nın değişik pigmentleri vardır. Kökenlerin çoğunluğu mavi yeşil bir ekstraselüler pigment olan pyosiyanın pigmenti oluşturur. Pyosiyanın; phenazine yapısındadır, genellikle mavi-yeşil renklidir ve koloni mavi-yeşil renk alır. Bu pigment yalnızca aerop ortamda oluşur, tanı değeri yüksektir. Piyosiyanın kloroformda erir. *Pseudomonas* spp. floresein pigmenti de yapabilirler. Floresein pyoverdin yapısında, soluk sarı renklidir. Özel besiyerlerinde ve UV ışığında (wood lambası) daha iyi gözlenebilir. Daha seyrek rastlanmakla beraber; Pyorubin; kırmızı, pyomelanin; kahverengi-siyah renkte koloni oluşturan pigment yapabilirler. Diğer pigmentlerin varlığı halinde piyosiyanın pigmentinin maskelenmesi söz konusu olabilir (9).

P aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterir. *P aeruginosa* oksidaz pozitifdir. Yani sitokrom c oksidaz içeren elektron transport zinciri sistemine sahiptir. Sitokrom c oksidaz içermeleri *Pseudomonas*

cinsini *Enterobacteriaceae* ailesinden ayıran temel özelliklerdendir. *Pseudomonas* spp. değişik şekerleri metabolize etmek için 2-keto-deoxygluconate yolunu kullanır. Bundan dolayı ATP üretimi için elektron transport zincirine gereksinimleri vardır. Bu özellik *Pseudomonas* cinsini zorunlu aerob yapar. Ancak *P aeruginosa* anaerobik şartlarda da yaşayabilir, bu farklılığı terminal elektron alıcı olarak nitratı kullanabilme özelliğinden kaynaklanır. Böylece *P aeruginosa* farklı çevre koşullarında varlığını devam ettirebilmektedir. İndofenol oksidaz, sitrat, L-arginin dihidrolaz pozitifler. L-lizin dekarboksilaz, L-ornitin dekarboksilaz negatiftirler. Nitrattan gaz oluştururlar.

P aeruginosa'nın bazı fizyolojik özellikleri çevresel faktörlere karşı avantaj sağlar ve patogeneze katkıda bulunur;

- *P aeruginosa*'nın nutrisyonel gereksinimleri oldukça basittir. Distile su içinde bile üreyebilmesi ne kadar az besin ile yetinebildiğini gösterir. Laboratuvar ortamında karbon kaynağı olarak asetat ve azot kaynağı olarak amonyum sülfat içeren oldukça basit besiyerlerinde üretmek mümkündür.
- Çoğalması için ideal çevre ısısı 37°C olmakla birlikte, 42°C ye kadar olan ısıda üremesi devam eder.
- Farklı çevresel koşullar, yüksek tuz oranı, zayıf antiseptikler ve çoğu antibiyotiklere karşı dirençlidir.
- Nemli ortamlarda daha kolay çoğalır.

Çevre koşullarındaki olumsuz faktörlere karşı da oldukça dirençlidir. Isı değişikliklerinden oldukça az etkilenir, çok tuzlu ortamlara dayanıklıdır, zayıf antiseptiklerden etkilenmez. Farklı ekolojik ortamlarda varlığını sürdürmesi onun fırsatçı patojen karakterine katkıda bulunur.

P aeruginosa antibiyotiklere direnç geliştirme konusunda oldukça başarılıdır (10). Dış membran yapısındaki lipopolisakkaritler doğal bariyer oluşturarak çoğu antibiyotiğin penetrasyonunu engeller. Biyofilm oluşturarak koruyucu bir matriks içinde kolonize olması, antibiyotiklerden korunmasını sağlar. Doğal ortamda basiller, aktinomiçes ve mantarlarla bir arada olması doğal antibiyotiğe karşı rezistans geliştirmesini sağlar. Antibiyotik rezistans plazmidleri içerir ve transduksiyon ve konjugasyon ile bunları transfer eder (11). Florokinolonlar, bazı aminoglikozidler ve imipenem gibi sınırlı sayıda antibiyotiklere karşı hassas olmakla beraber giderek artan bir direnç sorunu söz konusudur ve bu hassasiyet de suşlar arasında farklılıklar gösterir (3).

Tanı:

P aeruginosa laboratuvarında kullanılan çoğu besiyerinde ürer, genellikle kanlı agar ve eozin-metilen-blue agar (EMB) besiyerinde üretilir. Gram negatif olması, özel koloni yapısı ve kokusu, laktozu fermente etmemesi, oksidaz pozitif olması ve yüksek sıcaklıkta (42°C) üreyebilmesi tanıma kolaylığı sağlar.

Epidemiyoloji: *P aeruginosa* nemli ortamı sever. İnsanda perine, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşir. Solunum cihazları, temizlik solüsyonları, ilaçlar, dezenfektanlar, küvetler, paspaslar yerleşim yerleridir. Bulaş yüzme havuzu, jakuzi, sauna, kontak lens solüsyonları gibi hastane dışında su ile ilgili kaynaklardan da olabilir (12).

Pseudomonas türleri insanların normal florasında yer alabilir (13). Deride %0,2, burun mukozasında %0-3,3, boğazda %0-6,6, dışkıda %2,6-24 oranında görülebilir. Hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bakteri, hastanede yatan yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde, antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılığı olabilmektedir (14).

Hastane enfeksiyonuna yol açan suşların toplum kökenlilerden farkı; hastane ortamında yaşamlarını sürdürebilmeleri, hastane personelinin deri ve mukozalarında kolonize olmaları, çeşitli yüzeylerde canlılıklarını koruyabilmeleri ve antibiyotik tedavilerine bazen de antiseptiklere direnç gösterebilmeleridir (15, 16). Yapısal olarak dirençli olması ve yeni direnç mekanizmalarını edinebilmesi, mikroorganizmaya hastane ortamında canlılığını sürdürebilmesi bakımından bir üstünlük sağlar (17).

VİRÜLANS ve PATOJENİTE

P aeruginosa'nın patogeneğinde çeşitli virülans faktörleri rol oynar. Bu faktörler aracılığı ile, ciddi seyirli enfeksiyonlara neden olabilir. Virülans faktörlerinin salınımı; büyümenin olduğu, hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar. Virülans faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi kompleks bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır. *P aeruginosa*'nın başlıca virülans faktörleri beş ana başlıkta toplanabilir (Tablo 1).

Tablo-1. *Pseudomonas Aeruginosa*'nın Virulans Faktörleri

Enzim ve proteazlar	Adezyon faktörleri	Pigmentler	Toksinler	Kapsül
Elastaz	Fimbria, piluslar	Piyosiyenin	Endotoksin	
Fosfolipaz C	Alginat	Piyorubin	Ekzotoksin A	
Kollajenaz	Piyoselin	α -oksifenazin	Ekzotoksin S	
Jelatinaz		Piyoverdin		
Alkalın proteaz		Piyosin		
Nötral proteaz		Fluoresein		
Sitotoksin				
Lesitinaz				

Virülans faktörlerinin çoğunun ekspresyonu bazı çevresel uyarılara bağlıdır: Ortamdaki demir iyonu, nitrojen, ısı, ozmolarite gibi. Ancak virülans faktörlerinin ekspresyonu genel olarak yüksek hücre dansitesine ulaşana kadar çok belirgin değildir. Hücre dansitesine bağlı olarak ortaya çıkan QS virülans genlerinin kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynar (18).

Virülans faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı spesifik virülans faktörleri kodlayan gendeki yeniden düzenlemeleri, promotör veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir (19).

Virülans faktörlerinin üretimindeki farklılığın olası bir mekanizması; virülans faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun, kompleks bir düzenleyici gen ağı ile farklı çevresel stimüllere yanıt olarak düzenlenmesidir (20). Örneğin; Ekzotoksin-A üretimi ortamdaki demir miktarı, ısı ve belirli nütrisyonel elemanların varoluşu ile regüle edilir. Bu regülasyonlar birden fazla pozitif ve negatif regülatör gen ile başlanır (21). Örneğin; elastaz üretimi QS sistemindeki las ve rhl genleri ile regüle edilir (22).

Patogenez:

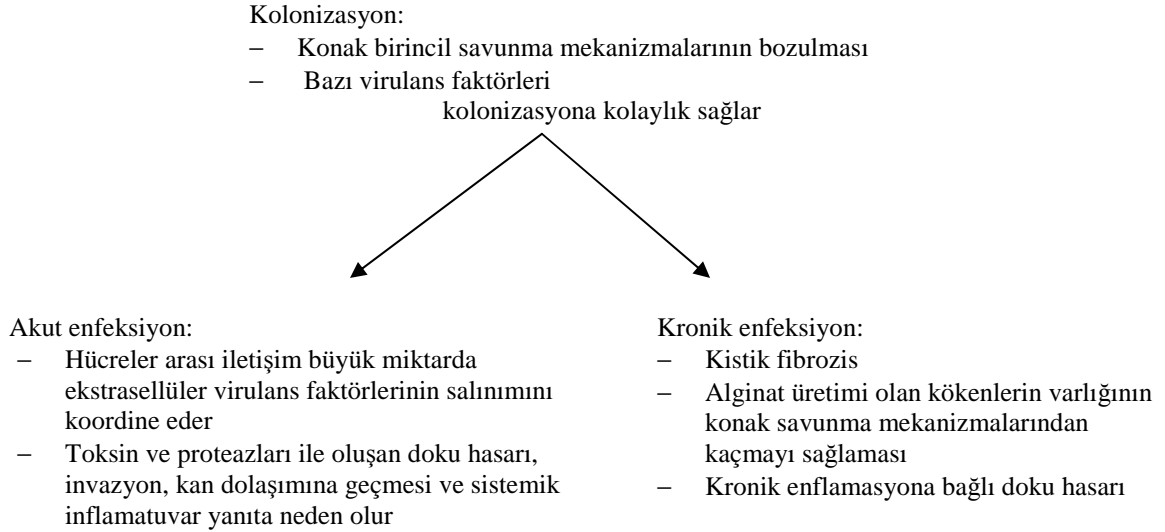
Fırsatçı patojen olarak *P aeruginosa*'nın enfeksiyon oluşturması hemen daima konakçı savunma mekanizmalarında kırılma ile başlar. Çok çeşitli virülans faktörlerinin de katkısı ile septisemi, üriner enfeksiyon, akut ve kronik akciğer enfeksiyonları, endokardit, dermatit ve osteokondrit gibi enfeksiyonlara yol açar (Şekil 1).

Bir *P aeruginosa* enfeksiyonunun gelişme süreci birbirini takip eden üç basamağa ayrılabilir;

- Bakteri adezyon ve kolonizasyonu
- Lokal invazyon

- Yaygın sistemik enfeksiyon

Bu basamaklarda bakterinin sahip olduğu virulans faktörleri farklı derecelerde rol oynar.



Şekil-1. *P. aeruginosa* Enfeksiyonu Gelişme Süreci

Kolonizasyon:

P. aeruginosa; doğada yaygın olarak bulunan bir bakteri olmasına karşın, toplum kökenli suşlar immün sistemi normal kişilerde nadiren enfeksiyon oluşturur. Daha çok hastane ortamında ve hazırlayıcı faktörlerin varlığında enfeksiyon ortaya çıkar.

Enfeksiyonun başlayabilmesi için öncelikle bakterinin yüzeye tutunması gerekir (23). Deri ve mukozalarda; travma, ciddi yanık, deri bütünlüğünün bozulması, normal florada değişiklik, kemoterapiye bağlı nötropeni, diyabet, kistik fibrosis, AIDS gibi immün sistemin hasarlı olduğu durumlarda ilk savunma mekanizmalarının yetersizliğine bağlı olarak bakterinin tutunmasına kolaylık sağlanmış olur (24).

Tutunmada fimbria ve adezin molekülleri rol oynar. Fimbrialar bakteri yüzeyinde yer alan ince, kısa, düzgün çıkıntılardır. Ancak elektron mikroskopunda görülebilirler. Bakterinin yaşamı için gerekli değildirler, bakterinin çeşitli yüzeylere ve birbirine tutunması ile bu yüzeylerde üremelerinde rol oynar, küme veya film tabaka oluşturmalarını sağlarlar (25).

Adezin molekülleri epitel hücrelerindeki galaktoz, mannoz veya siyalik asit reseptörlerine bağlanır (26). Bazı ek faktörler bakterinin epitel yüzeyine yapışmasını kolaylaştırabilir. Örneğin epitel dokusunun daha önce başka bir ajan ile zedelenmesi (influenza virus enfeksiyonu gibi) bu adezyonu kolaylaştırır (27). Ayrıca bakterinin ürettiği

bazı proteazlar epitel yüzeyindeki fibronektini yıkararak adezin molekülleri ve pilusların yapışacağı reseptörlerin açığa çıkmasına yardımcı olurlar. *P. aeruginosa* pilusları ile siyalik asit içermeyen gangliyozyd (GM1) reseptörlerine tutunmaktadır (28). Bakteri tarafından üretilen nörominidaz enzimi gangliyozidlerdeki siyalik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşur.

Epitel yüzeyi üzerinde yer alan müsün tabakası bakterinin adezyonunu engelleyen bir savunma mekanizmasıdır (29). Özellikle solunum sistemini döşeyen epitelde bakteri girişini engelleyen faktörlerden biridir. Mukoid karakterdeki *Pseudomonas* suşlarının ürettiği bir ekzopolisakkarit olan alginat bakterinin bronşlardaki müsine yapışmasına yardımcı olur. Yine bakteri yüzeyindeki exoenzim-S epitel hücrelerindeki glikolipitlere bağlanmada rol oynar.

Alginat:

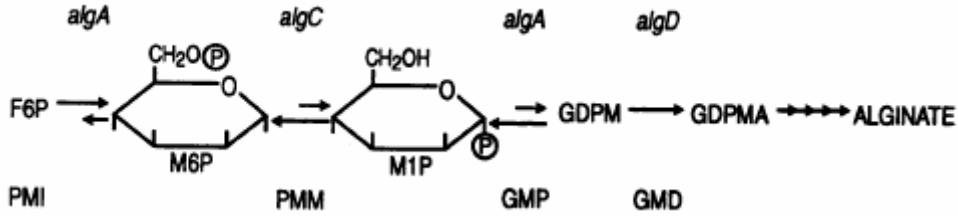
D-mannuronik asit ile L-gulukuronik asit'in lineer kopolimeridir. Kistik fibroz, üriner enfeksiyonlar, biyoprotez ve doğal çevrede oluşan ve tedavisi güç, inatçı *Pseudomonas* enfeksiyonlarına neden olan bakteriyel biyofilmin yapısındaki matriks polimerde önemli rol oynar (30). Alginat biyofilm matriksi içinde hücrelerin bir arada kalmasını sağlayan önemli bir virulans faktörüdür (31). Bu matriks içinde bakterilerin konak savunmasından, lenfosit ve fagositlerden, solunum sisteminde epitelin silier aktivitesinden, antikor ve kompleman sisteminden korunmasını sağlar.

Slime faktör:

P. aeruginosa'nın bazı koşullarda oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına slime tabakası denir. Bu yapı alginatla sonlanan tekrar eden polisakkarit polimerlerinden oluşur. Slime faktörün, konak immün sistemini etkileyerek bakterinin konak savunmasından korunduğu gözlemlenmiştir (32). Mikroorganizmanın nötrofil ve fagositlere karşı korumasını sağlar. Ayrıca bakteriyi opsonizasyondan ve kompleman sisteminden korur. Diğer taraftan monosit ve makrofajları stimüle eder. Lenfositler üzerine mitojenik etkilidir. T hücrelerinde agregasyona neden olur, Monositlerden de TNF salgılanmasını artırır (33). Sonuç olarak sistemik dolaşımdaki septik şok mediatörlerinin artmasına sebep olarak *P. aeruginosa*'ya bağlı septik şok patojenezinde önemli rol oynar.

P. aeruginosa alginat üretiminin promoteri olan algA, algD ve algC genleri çevredeki besin öğelerinin azlığı, düşük nitrojen, yüksek osmolarite gibi ortam değişikliğinde aktive olur (34). AlgC geni alginat sentezinde anahtar rol oynayan

fosfomannomutaz enzimini kodlamaktadır. *P aeruginosa*'da alginat biyosentezinin basamakları ve rol oynayan genler ile bu genlerin kodladığı enzimler şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil-2. *P Aeruginosa*'da Alginat Biyosentezi Yolu ve Rol Oynayan Enzimler

PMI-phosphomannose isomerase, PMM-phosphomannomutase, GMP-GDP-mannose pyrophosphorylase ve GMD- GDP-mannose dehydrogenase. Bu enzimleri kodlayan genler üst tarafta yer almaktadır. Diğer kısaltmalar; F6P- fructose 6-phosphat, M6P-mannose 6-phosphate, M1P-mannose 1-phosphate, GDPM-GDP-mannose ve GDPMA-GDP-mannuronic acid. (34)

İnvazyon ve Ekstrasellüler Virulans Faktörleri:

Epitelyal yüzeye yapışarak kolonize olan *P aeruginosa*'nın doğal bariyerleri geçebilmek için doku invazyonu yapmasında salgıladığı ekstrasellüler enzimler ve toksinlerin rolü büyüktür. Bu yolla fizyolojik bariyerleri bozar, hücre yıkımı ile konakçıya zarar verir, organ fonksiyonlarını bozar. *P aeruginosa*, değişik ekstrasellüler ürünler sentezleyip, hücre dışına salgılayarak ilk aşamada kolonize olmuş bakterinin doku hasarı oluşturması ve yayılmasına katkı sağlar. Histolojik olarak *Pseudomonas* enfeksiyonlarında dokuda yaygın olarak nekroz, mikroapse formasyonları ve damar yapılarında bozulma ve kanama gözlenmiştir (35). Bu doku değişikliklerinin oluşmasında *Pseudomonas*'ın ürettiği Elastaz ve lasA yanında alkalın proteaz, fosfolipaz C, kollajenaz, lesitinaz, jelatinaz gibi ekstrasellüler proteazlar rol oynamaktadır (36).

Elastaz:

P aeruginosa enfeksiyonlarının patogeneğinde elastaz çok önemli rol oynamaktadır. Elastaz; bir metallo proteazdır, kollajeni, IgG, IgA ve komplemanı parçalar. Fibronektini yıkar ve mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak silyer aktiviteyi engeller.

Damar duvarındaki kollajenin yıkılması ve damar bütünlüğünün bozulması ile hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına, akciğerde alveol yapısının bozulmasına yol açar.

Pseudomonas ve oluşan fırsatçı enfeksiyonda elastaz mikroorganizmanın epitelyal bariyer gibi doğal bariyerlerin bütünlüğünü bozacak doku invazyonu yapmasını sağlar (37). Elastaz; tip-3 ve tip-4 kollajeni yıkar. Tip-3 kollajen interstisyel kollajen olarak sınıflandırılır. Deri, Akciğer ve damar duvarında bulunur. Karaciğer ve dalak stromasında yer alır. Tip-4 kollajen; bazal membran da yer alır ve vasküler yapıların majör komponentidir. Tip-1 kollajenin monomer α zincirini çapraz bağlı β zincirine çevirir. Ama tip-1 kollajenin yıkımı tip-3 ve 4'e göre daha yavaştır (38).

Pseudomonas enfeksiyonlarında oluşan doku hasarında kollajen yıkımının önemli rolü vardır. Örn; elastik lamina hasarı ile damar duvarında nekroz olur. Bu olay organlarda hemoraji ve nekroz odaklarının oluşması ile sonuçlanır. Deneysel olarak *P aeruginosa* septisemisi yapılan farelerde yaygın organ kanamaları görülmüştür (39). Deneysel çalışmalarda intratrakeal *Pseudomonas* elastazı uygulanan tavşanlarda hızlı ve yaygın intraalveolar hemoraji gözlemlenmiştir (40). Elastaz eksikliği olan *P aeruginosa* ile oluşturulan deneysel pnömoni modellerinde enfeksiyonun daha az olduğu gözlemlenmiştir (41).

P aeruginosa'nın elastaz üretimi çeşitli faktörlere bağlıdır: Bu faktörlerden biri *P aeruginosa*'nın büyüme hızıdır. Elastazın büyük kısmı hücre büyümesinde geç logaritmik fazda veya hücre yoğunluğu arttığı zaman olur. Logaritmik fazda hızlı hücre büyümesi olur. Bu fazda üreme hızı sabit olup, bakterinin antibiyotik etkisine en duyarlılığı yüksek, hücre boyutları en küçüktür.

Elastaz, elastin proteinini harap eder. Elastin insan akciğer dokusunun majör elamanıdır, ekspansiyon ve kontraksiyondan sorumludur. Ayrıca kan damarlarının önemli komponentidir. Böylece akciğer dokusunda hasarla pulmoner hemorajiye neden olur (42). Elastazın proteolitik etkisi alkalın proteazdan 10 kat, tripsinden 4 kat daha güçlüdür. Elastaz ayrıca IgG, Serum α -1, Proteinaz inhibitör ve komplemanı inaktive ederek virulansa katkıda bulunur.

Las-A:

Las-A, 22-kDa ağırlığında, çinko içeren bir metalloproteazdır. Ayrıca bir ekstraselüler serin proteazıdır. Las-A elastindeki Gly-Gly-Ala zincirindeki Gly-Ala köprülerine bağlanarak elastolitik etki yapar. Elastin yanında fibrin ve kollejeni de hasara

uğrattır. Kendisi elastolitik aktiviteye sahip olduğu gibi elastaz ve diğer proteinazların elastolitik etkisini artırır. Elastaz ile sinerjistik olarak çalışır (43).

Las-A aynı zamanda stafilolitik proteazdır. *S aureus* hücrelerini lizise uğrattır. Bunun için peptidoglikan duvarındaki pentaglisin köprülerine bağlanarak stafilolitik aktivite gösterir. Bu özellik las-A aktivitesini göstermekte kullanılır.

Elastaz geni (LasB), LasA geni (LasA) LasR-LasI sistemi ile düzenlenir. LasR; Las-B, Las-A, alkalın proteaz genlerini ve ekzotoksin A üretimini regüle eder. Bu genler QS sisteminde görevli genlerdir. Diğer QS genleri ise RhlR-RhII sistemi olup, elastaz salgılanması kadar alkalın proteaz, hemolizin, piyosiyenin salgılanmasıyla da ilgilidir (44). İnsan proteinleri; elastin, kollajen tip-III ve tip IV, laminin , IgA ve G , α 1-antiproteinaz elastaza hassastır.

Elastaz ve Las-A nın sinerjik çalışmasıyla oluşan doku hasarı bakterinin doğal bariyerleri aşmasını sağladığı gibi organ yetmezliklerine de sebep olur. Elastinin parçalanması ile bağ dokusunu zayıflatır. Bunun sonucunda örneğin korneada ülserler oluşur, nekrotik cilt enfeksiyonları gelişir, yanık alanında nekroz görülür. Bazal membran yapısındaki elastinin parçalanması ile bütünlüğü bozularak epitelyal bariyer zedelenir. Elastaz ve alkalın proteaz γ -interferon ve TNF' nin inaktivasyonuna yol açar (45).

P aeruginosa'nın invazyonunda rol alan diğer proteazlar da virulansa katkıda bulunurlar. Alkalın proteaz; fibrin oluşumunu engeller ve oluşmuş fibrini yıkar. Lökositin nötrofillere ve çoğu ökaryot hücreye toksik etki yapar. Fosfolipaz ve lesitinaz lipitleri ve lesitini parçalayarak ökaryot hücrelere toksik etki yapar (46).

Yaygın sistemik enfeksiyon:

Adezyon, kolonizasyon ve epitelyal bariyerlerin invazyonunun ardından bakteri ve ürettiği toksinler sistemik dolaşıma geçerler ve yaygın sistemik enfeksiyon belirtileri ortaya çıkar. *P aeruginosa* kan dolaşımında fagositoz ve diğer sistemik bakterisidal savunma mekanizmalarına dirençlidir. Bu dirençte mukoid kapsülünün rolü büyüktür. Sentezlediği proteazlar kompleman sistemini inaktive eder, IgG antikorlarını parçalar, IFN, TNF gibi sitokinleri etkisiz hale getirir. *Pseudomonas* lipopolisakkarit yapısındaki Lipid A molekülleri (endotoksin) ateş, hipotansiyon, intravasküler koagülasyon gibi klasik gram negatif septisemide görülen olaylar zincirini tetikler (47).

P aeruginosa nın ürettiği iki ekstrasellüler toksin, ekzoenzim S ve ekzotoksin A sistemik enfeksiyon tablosunda rol oynar. Ekzoenzim S ökaryot konakçı hücresinde ADP molekülünü ribozilleyerek GTP-bağlayıcı proteini modifiye eder. Bu özellikleri ile

fagositik hücrelerin fonksiyonlarını bozar ve diğer organlarda yaptığı değişikliklerle *Pseudomonas* invazyonuna zemin hazırlar. Ekzotoksin A ise difteri toksinine benzer şekilde konakçı hücresinde Elongasyon Faktör 2'yi ADP ribozilasyonuna uğratar. Hücre protein sentezi bozulur ve hücre ölümü oluşur. Ekzotoksin A'nın oluşturduğu hücre ölümü ve doku hasarı ile bir taraftan sistemik belirtiler ortaya çıkarken bir taraftan da bakterinin üreyip çoğalması için elverişli ortam oluştururlar. Ekzotoksin-A hücre dışı bir enzim olup *P aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından yapılır. Ekzotoksin A'nın lokal doku hasarı ve bakteriyel invazyonda rolü vardır. Ekzotoksin-S hücrelere sitopatik etki gösterir. Bu toksini salgılamayan suşlar yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlarında daha az virülandır (48).

Piyosiyanın:

Piyosiyanın mavi renkli, kloroformda eriyen bir pigmenttir. *P aeruginosa* tarafından üretilir, bakterinin fizyolojisinde ve patojenezinde önemli rol oynarken, oluşturduğu mavi renkte tanı konmasında kolaylık sağlar (49).

Piyosiyanın üretimi ortamdaki karbon ve azot kaynaklarından etkilenir. Ortamda fosfat iyon konsantrasyonu düşük ve yeterli sülfat iyonu var ise üretilir. Demir iyon konsantrasyonu da önemlidir. Düşük fosfat iyonu olan ortamda demir iyonu eklenmesi ile sentezi artar.

Piyosiyanın, N-methyl-1-hydroxyphenazine ve iki elektron alarak redüksiyona uğradığında renksiz lökopyosiyanine dönüşür. Redüksiyon kapasitesi olduğu için *P aeruginosa* metabolizmasında solunum için gereklidir (50).

Piyosiyanınin *Pseudomonas* metabolizmasındaki bir diğer rolü bakterinin dış ortamdan demir iyonu almasını kolaylaştırmasıdır (51). Demir bu bakterinin üremesi için gereklidir. Konakta demir çoktur fakat ulaşılamayacak şekilde hücre içinde; çözünemeyen hidroksit, karbonat, fosfat ile ferik formunda bulunur. Konak demir metabolizması bakterinin üremesi için gerekli demir kaynağını sağlamaz. Demir kullanımı için *P aeruginosa*, pyoşelin ve pyoverdin sideroforlarını kullanır. Sideroforlar; bakteri hücresine demir sağlayan küçük ligantlardır. Bu sideroforlar dış ortamdaki demir iyonunun hücre içine alınmasını sağlar, ancak konakçı organizmanın en önemli demir kaynağı olan transferrinden demir iyonu almakta yeterli olmaz. Piyosiyanın redüksiyon yeteneği olan bir molekül olarak transferinden demiri ayırma özelliğine sahiptir. Bu olayda ilk reaksiyon piyosiyanınin lökopyosiyanine redüksiyonudur. İkinci reaksiyon lökopyosiyanın tarafından Fe^{+3} 'ün redüksiyonudur. Üçüncü reaksiyon demir iyonunun transferrinden ayrılması ve sideroforlar aracılığı ile *P aeruginosa*'ya alınmasıdır. Kültür ortamında piyosiyanınin

redüksiyonu oluşmuş olan mavi rengin açılması ile gözlemlenir. Renksiz olan lökopyosiyenin hem oksijen hem de Fe^{+3} ü redükte eder (52).

Pyosiyenin bakteri metaboizmasındaki bu önemli rolü yanında sitotoksik özelliği ile de virulansa katkıda bulunur. Pyosiyenin ökaryot hücrelerde hücre solunumunu engellediği, silia aktivitesini bozduğu, epitel hücresi ve lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (53). Pyosiyenin otooksidasyon yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açmakta ve böylece sitotoksik etki göstermektedir (54).

Motilite:

Motilite bakterinin simbiyotik ve patojenik özelliklerini göstermesi için gerekli bir fonksiyondur. Motilite sayesinde bakteri besin elemanlarına ulaşır, toksik maddelerden kaçır, konak hücresine translokasyon yapar, oluşturduğu koloni içerisinde yer değiştirir, biyofilm içinde hareket eder. Motilite için bakteri flagella ve pili oluşturmalı ve gereken enerjiyi sağlamalıdır (55).

Motilite bakteri fizyolojisinde oldukça ilginç ve önemli bir yer tutar. Bakteri hareketliliği ile ilgili çalışmalar üç farklı tip motilite olduğunu göstermiştir; swimming, swarming ve twitching (56).

- Swimming; sıvı ortamda olur ve mikromorfolojik pattern organize değildir.
- Swarming; sıvı tabaka nisbeten ince olduğunda bakteri uzar, flagellalar artar ve koordineli bir hareket gösterir.
- Twitching katı yüzeyde gerçekleşir ve swarming den daha az organizedir.

Bu üç hareket tipinden swimming ve swarming flagella bağımlı, twitching ise tip IV pili bağımlıdır.

Gerek flagellar motilite gerekse tip IV pilusa bağımlı twitching için önce bakterinin yüzeye yapışması ve biyofilm oluşturması gereklidir. *P. aeruginosa* aynı polde yer alan tek flajellası ile hareketlidir ve birden fazla tip IV pili içerir. Flajella flajellin adı verilen çok ince, protein yapısında alt birimlerden oluştuğu ve sitoplazmada bulunan blefaroplasttan kaynaklanır (57). Flajella ve pili motilite ve kemotaksiste oynadıkları önemli rol ile patojeniteye katkıda bulunur.

Swimming: *P. aeruginosa* nın hücre yüzeyi elamanlarından olan flajella bakterinin sıvı ortamdaki motilitesinden sorumludur (swimming). Flagella aynı zamanda swarming hareketinden de sorumludur. Hareket etme yeteneğine sahip bakterilerin sıvı ortamda yer değiştirmeleri flajellalarının dönerek hareket etmesi ile olur. *P. aeruginosa* tek polar

swarmingin makroskopik görünümünü göstermektedir.Swarming yapan hücrelerin boyu normal haline göre uzar ve flajella yapısı değişir. Normal şartlarda tek polar flajellası olan *P aeruginosa* swarming yaparken çift polar flajellaya sahiptir (62).

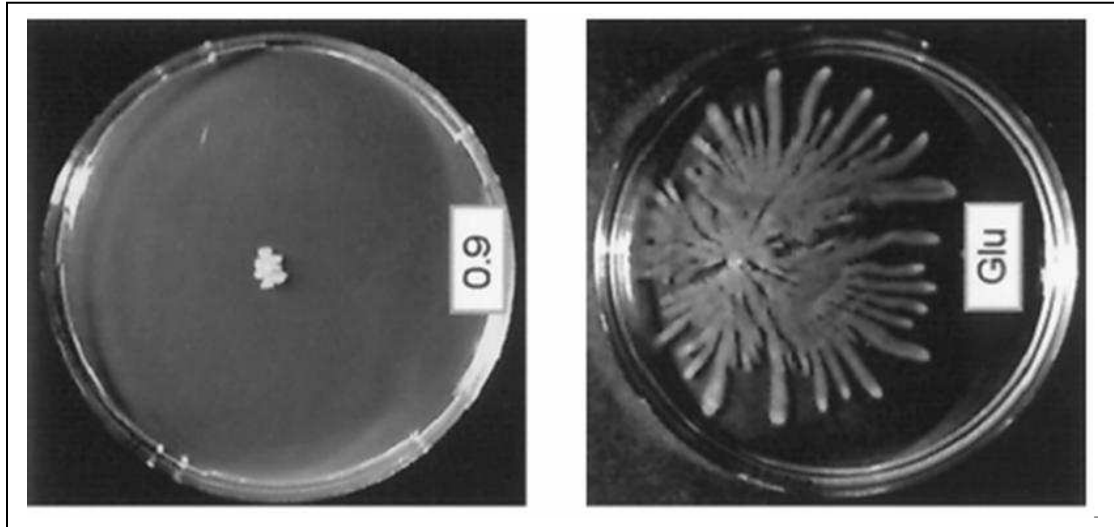
Swarming flajella yapısındaki bu değişikliğe ek olarak tip-IV pili ve yüzey aktif madde olarak rhamnolipit sekresyonunu gerektirmekte, bunlardan birisinin eksikliği bakterinin bu tür motiliteyi yapamamasına neden olmaktadır (63).

Swarming yapan hücrelerin karakteristikleri;

-Elongasyon,

-Koordine hareketle koloni ile birlikte veya bazen koloniden geçici ayrılma şeklinde yer değiştirme,

-Polisakkarit, alginat, biyosurfaktan ve rhamnolipid ten oluşan ekstrasellüler slime üretimidir (64).



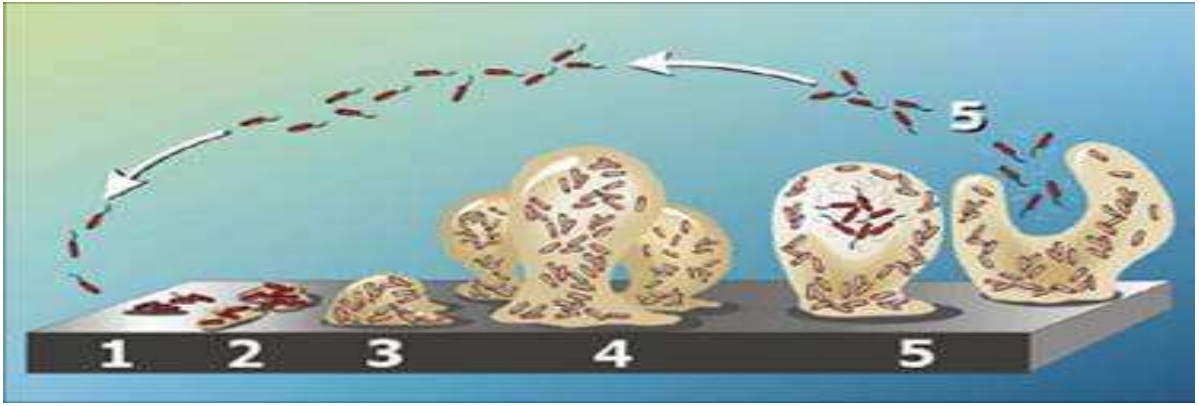
Şekil-6.. Solda swarming yapmayan ve sağda yapan *P aeruginosa* görülmektedir. (63)

BIYOFİLM:

Biyofilm; yüzeye yapışmış ve bir matriks ile çevrelenmiş mikroorganizma topluluğudur. Bu mikroorganizmalar bakteri, mantar veya protozoalardan oluşabilir. Biyofilm oluşurken mikroorganizmalar bir sıvı içinde serbestçe hareket eden “planktonik” formdan, bir yüzeye yapışarak matriks ile kaplı hücre topluluklarının oluşturdukları “sesil” forma geçmektedirler. Biyofilmlerde üreyen bakteriler, planktonik eşlerinden 1000 kat daha dirençlidirler. Biyofilmler geniş enfeksiyon grubu için; “kistik fibrozis

zemininden gelişen akciğer enfeksiyonları, diş çürükleri, endokardit, kontak lenslerle ilgili göz enfeksiyonları, iç kulak enfeksiyonları ve böbrek taşları gibi önemlidir (65).

Biyofilm oluşumunda yer alan bakteriler serbest olanlardan farklı fenotipik özellikler gösterirler. Bunun nedeni; ekzopolisakkarit sentezleyen enzimler, adezyonda görevli proteinlerin sentezinde rol oynayan enzimler gibi bakterinin çevresel koşullara adaptasyonunu ve yaşamını sürdürmesini sağlayacak mekanizmalarla ilgili genlerin aktifleşmesidir. Bunun sonucunda çok sayıda hücre yüzey elemanları, membran proteinleri, adezyon ve agregasyon molekülleri ve koloni morfolojisi ile ilgili proteinler sentezlenir ve bakteri yeni koşullara uyum sağlar (66).



Şekil-7. Biyofilm Oluşumu ve Döngüsünün Şematik Görünümü (67)

Biyofilm gelişimi oldukça karmaşık mekanizmaları içeren dinamik bir süreçtir. Bu süreç şekil 7 de şematik olarak gösterilmiştir. Biyofilm yapısı içinde mikroorganizmaların davranışları planktonik forma göre oldukça farklıdır. Mikroorganizmalar bir ekstrasellüler polimerik madde içinde yer alarak bir anlamda dış etkenlere karşı korunurlar. Çoğalma hızları azalır ve belirli genlerde farklı düzenlemeler olur. Mikroorganizmalar bu matriks içinde birbiri ile haberleşir ve genetik materyal değişimi yaparlar. Matriks içinde biyofilmin oluştuğu ortama bağlı olarak mineral kristalleri, korozyon parçaları, kil ve kum taneleri veya kan elemanları gibi hücre dışı materyallerde bulunabilir (67).

Biyofilmin oluşumu mikroorganizmaların hücrenin yüzeye yapışması ile başlayan aktif bir süreçtir. Mikroorganizmanın bir yüzeye yapışmasında yüzeyin özellikleri, film oluşumu, sıvının hidrodinamik özelliği ve karakteristiği ile hücre yüzeyinin özellikleri rol oynamaktadır.

Katı yüzey yapışma için önemli bazı özellikler taşıyabilir. Pürüzlü yüzeylerde kolonizasyonun daha fazla olduğunu gösterilmiştir. Çünkü pürüzlü yüzeyde sıvının akış

hızı azalır ve yüzey alan artar. Yüzeyin fizikokimyasal özellikleri yapışma hızı ve yaygınlığında rol oynar. Mikroorganizmaların plastik gibi hidrofobik ve nonpolar yüzeylere cam ve metal gibi hidrofilik materyallerden daha fazla yapıştığı gösterilmiştir (68).

Sıvı ortama maruz kalan yüzeyde kaçınılmaz olarak ve hızla polimer bir film tabakası oluşur ki, bu mikrobiyal yapışma hızı ve yaygınlığını kolaylaştıran kimyasal bir olaydır. Bu filmin dakikalar içinde oluşup saatler içinde geliştiği ilk kez deniz suyunda gösterilmiştir. Bu filmin yapısal özellikleri insan dokuları üzerinde daha farklıdır. Örneğin diş minesinde gelişen bir film; albumin, lizozim, glikoprotein, fosfoprotein, lipidler ve gingival sıvıdan oluşur. Ağız boşluğundaki bakteriler saatler içinde bu film üzerinde kolonize olur. Kan, gözyaşı, idrar, tükürük, damar içi sıvı ve solunum sekresyonlarının ön film oluşturarak bakterilerin biomateryallere bağlanmasını kolaylaştırdığını gösterilmiştir (69).

Biyofilm oluşumunda; tip-4 pili adezyon ve mikrokoloni oluşumu için gereklidir. Tek bakterinin adezyonu ve bakteri tabakası oluşturmasından sonra twitching motiliteside mikrokoloni oluşumunda rol oynar. Bunu biyofilmin olgunlaşması izler (70).

Teorik olarak yüzey-sıvı birleşiminin hemen yakınında, sıvının akım hızı ihmal edilebilir düzeydedir. Bu zon sınır tabaka olarak isimlendirilir. Sınır tabaka akım hızına bağlıdır ve akım hızı ne kadar yüksekse kalınlığı o kadar azdır. Sınır tabakanın hemen dışında da türbülans vardır. Sıvı akımı laminar veya türbülant olabilir ve bu hücre-yüzey ilişkisini etkiler. Hücreler sıvı içinde bir partikül gibi davranırlar ve yüzeye yerleşmeleri sıvının akım hızına bağlıdır. Akım hızı düşük iken hücreler daha kalın bir sınır tabakada yer alır ve yüzeye yapışma daha çok hücre büyüklüğü ve hareket yeteneğine bağlı olur. Akım hızı arttıkça sınır tabaka inceler. Hücreler daha fazla türbülans ve karışmaya uğrar ve bu akım hızı hücreleri zorla yüzeyden ayıracak büyüklüğe erişinceye kadar hücrenin yüzeye daha yaklaşmasına ve yapışmasına yol açar (71).

Hücre yüzeyinin hidrofobisitesi, fimbria ve flagella varlığı, ve EPS üretimi mikroorganizmanın yapışmasını etkiler. Hücre yüzeyinin hidrofobik olması hücre yüzeyi veya yapışma yüzeyinden birinin nonpolar olması anlamına gelir ki buda yapışmayı artırır. Yüzeylerin polaritesi hücre-yüzey arasındaki elektrostatik itme ile yapışmayı azaltan bir faktördür. Bakterilerin çoğu aslında negatif yüklüdür ancak yine de hidrofobik yüzey komponentleri içerirler. Fimbrialar genellikle yüksek oranda hidrofobik amino asit rezidüsü içerirler ve hücre yüzeyi hidrofobisitesine katkıda bulunurlar (72).

Özet olarak mikroorganizmanın yüzeye yapışması oldukça kompleks bir işlemdir. Yüzeyin pürüzlü olması, hidrofobik olması ve yapışmayı kolaylaştırıcı film ile kaplı olması hücre yapışmasını kolaylaştırır. Akım hızı artışı, sıvının ısısı ve nutrisyonel elemanlar ise kritik seviyeyi aşmadıkça yine hücre yapışmasını kolaylaştırır. Fimbria, flagella ve yüzey polisakkaritleri gibi hücreye ait faktörler ise aynı ortamdaki diğer bakterilere karşı avantaj sağlar. Biyofilm oluşumuna etkili faktörler tablo 2 de sıralanmıştır.

Tablo 2: Hücre Yapışması ve Biyofilm Oluşumunda Etkili Faktörler

Yüzey özellikleri	Sıvının Özellikleri	Hücrenin özellikleri
Pürüzlü olması	Akım hızı	Hücre yüzeyi hidrofobisitesi
Hidrofobisite	pH	Fimbria
Ön film oluşumu	Isı	Flagella
	Katyonlar	EPS

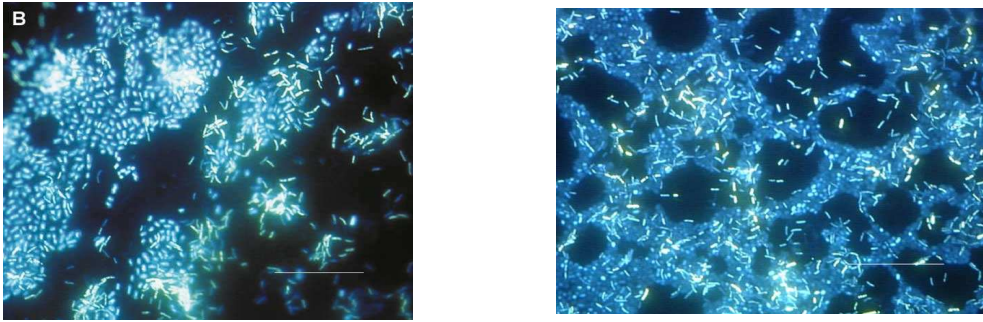
Hücre ile yüzey arasında ilk ilişki sırasında çok sayıda gende düzenlemeler oluşmaktadır. *P. aeruginosa* biyofilminde *algD*, *algU*, *rpoS*, ve polifosfokinaz sentezini kontrol eden genlerin aktive olduğunu gösterilmiştir (73).

Biyofilm temel olarak mikroorganizma ve ekstrasellüler polimerik substanstan (EPS) oluşur. EPS biyofilmdeki tüm karbonun yaklaşık % 50-90 ını oluşturur ve biyofilmin ana matriks kısmını oluşturduğu kabul edilir. Kimyasal ve fiziksel yapılanma olarak değişken olmakla birlikte temel olarak polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkaritlerin bir kısmı gram negatif bakterilerde olduğu gibi nötral ve polianyoniktir. Uronik asit (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asit gibi) veya keton bağlı piruvatların varlığı anyonik özelliği belirler. Bu özellik önemlidir. Çünkü kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonlarla bağlanmayı sağlar ki, bu da polimer zincirleri arasında çapraz bağlanma ile biyofilm içinde güçlü bağlanma oluşturur.

EPS yapısındaki hidrojen bağları ile çok miktarda suyu içinde tutabilir. EPS hidrofobik olabilir ancak çoğu tipi hem hidrofilik hem de hidrofobiktir. EPS nin çözünürlüğü de değişkendir. EPS nin iki önemli özelliğinin biyofilm üzerinde belirgin etkisi vardır. Birincisi polisakkaritlerin kompozisyon ve yapısı primer yapıyı belirler. İkincisi ise biyofilm yapısındaki EPS tek bir biçimde değildir ve 3 boyutlu yapı zaman içerisinde farklı konfigürasyonlarda görülebilir. EPS metal iyonlar, divalent katyonlar ve diğer makromoleküller (proteinler, DNA, lipidler gibi) ile birlikte olabilir. EPS üretimi ortamda besleyici elemanların durumundan etkilenir, karbon fazlalığına karşılık, nitrojen,

potasyum ve fosfatın azlığı sentezi artırır. Yavaş bakteri çoğalması da artırır. EPS yüksek su tutucu özelliği ile biyofilmin kurummasını önler. Antimikrobial rezistansa katkıda bulunabilir. Bunu muhtemelen ya antibiyotiklerin biyofilm içine transportunu engelleyerek ve/veya bu ajanları doğrudan bağlayarak yapar.

Biyofilm; oldukça heterojen yapıda olup, matriks içinde birbirinden su kanalları ile ayrılmış, EPS ile çevrelenmiş bakteri mikrokolonileri oluşturur. Kanallardan sıvı akışı, besleyici elemanlar, oksijen ve hatta antimikrobial ajanların diffüzyonuna olanak sağlar. Bir örnek olarak çelik yüzeyde oluşmuş biyofilmin yapısı şekil 8 de gösterilmiştir. Bu heterojen yapı, sadece doğada rastlanan karışık mikroorganizma biyofilmlerine özgü olmayıp tıp alanında rastlanan tek bakterinin oluşturduğu biyofilmlerde örneğin tıbbi protezlerde görülür. Biyofilmin yapısına biyofilmi oluşturan bakterinin de etkisi vardır. *K pneumoniae* veya *P aeruginosa* tek başlarına ince biyofilm oluştururken bir arada iken bu yapı daha kalın olmaktadır. Bunun nedeni; bir bakterinin diğer bakterinin stabilitesini artırdığı ve bu nedenle biyofilmin daha da kalınlaştığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca *P aeruginosa* ve *P putida*'nın başlangıçta kendi mikrokolonilerini oluşturduklarını daha sonra hücrelerin bir mikrokoloniden diğerine göçü ile birbirlerine karıştıklarını gözlemlenmiştir. Bu karışma sonucunda mikrokoloni yapısının zamanla zayıflayıp, hareketli hücrelerin biyofilmden atıldığı ve mikrokolonilerin çözüldüğü saptanmıştır. Bu nedenle de bir genel tanımlama olarak “biyofilm yapısı dış ve iç etmenlerle sürekli değişim halindedir” denebilir (74).



Şekil-8. Çelik yüzeyde oluşan biyofilmin 7. ve 14. günde görünümü. Aradaki siyah alanlar su kanalcıklarına ait olup matriks içinde yer alan mikroorganizma toplulukları izlenmektedir. (68)

Biyofilmin yapısı çevreden gelen mikroorganizma dışı partiküllerden de etkilenebilir. Örneğin eritrosit ve fibrin biyofilm içinde toplanabilir. Kalp kapakçıklarında oluşan ve bakteriyel mikrokoloniler yanında trombosit, fibrin ve EPS içeren biyofilmler buna örnek gösterilebilir. Fibrin kapsül, biyofilmdeki mikroorganizmaları lökositlerden koruyarak infektif endokardite yol açar.

Biyofilm ekstrakromozomal DNA (plazmid) değişimi için ideal ortamı sağlar. Plazmid transferi mekanizması olan konjugasyon biyofilm içinde serbest haldeki hücrelerde daha fazla oluşur. Konjugatif plazmid içeren ve birbirine yakın suşlar daha kolay biyofilm oluştururlar. Biyofilm, hücre-hücre yakınlaşması sağlayarak konjugasyonu kolaylaştırır. Transformasyon sıklığı biyofilm içinde serbest hücrelere göre 10-600 kat fazla olmaktadır (75).

Biyofilm içindeki bakteri sayısının biyofilmi etkilediğı ve bunun genetik olarak kontrol edilmesi ile biyofilmin yapısı ve dayanıklılığının da kontrol edildiğı gösterilmiştir (67).

Biyofilmin yıkılması; aktif olarak çoğalan hücrelerin dökülmesi, besleyici elemanların azalması ile hücre ayrılması veya akım etkisi ile küçük parçalar halinde kopması ile olabilir. Aktif olarak çoğalan hücrelerin dökülme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Hücreler bölündükçe hücre yüzeyi hidrofobitesinde değişme olması bir neden olabilir. Biyofilmin yıkılması; aktif olarak çoğalan hücrelerin dökülmesi, besleyici elemanların azalması ile hücre ayrılması veya akım etkisi ile küçük parçalar halinde kopması ile olabilir (69).

P. aeruginosa nın ürettiğı EPS nin büyük kısmı alginattan oluşur. Alginat hücre adezyonunu sağlayan önemli bir moleküldür. Alginat-lyaz ise alginat üretimini azaltarak hücrelerin biyofilmden ayrılmalarına yol açar. Bu enzimi kodlayan *algL* geninin hücre ayrılması ile biyofilm yıkılmasına yol açtığı düşünülmektedir. Buna benzer polisakkarit üretiminde rolü olan enzimlerin biyofilm gelişiminin farklı dönemlerinde rol oynadığı düşünülmektedir (73).

Biyofilmin fizik güçlerle ayrılması daha detaylı çalışılmıştır. Fiziki ayrılma; biyofilmden akım etkisi ile küçük parçalar kopması ile , hızlı ayrılma olarak ta tanımlanan dökülme ve sıvı içindeki partiküllerin çarpması ile biyofilmin ayrılması ile şekillenen sıyrılmayla olabilir. Biyofilm kalınlığının artış fiziki ayrılmayı kolaylaştırır. Akım hızının artması ile biyofilm yakınında türbülans olur ve erozyon artar. Dökülme ise beslenme ve oksijenlenme bozulması ile olur (71).

Bu karmaşık olayların sonunda bakteri biyofilm yapmayı başarır. Bakterinin kendine ait özellikleri de biyofilmi şekillendirir. Örneğin; type IV pili biyofilmin mikrokoloni oluşumu ve matürasyonunda görev alır. QS sisteminde sekrete edilen 3-oxo-C12 HSL ve C4HSL ile biyofilm oluşumu kontrol edilir. Bu moleküllerin sentezi de las ve rhl olarak adlandırılan iki gen sistemi ile sağlanır (67).

QUORUM-SENSING (QS:Çoğunluğu algılama)

“Çok sayıdaki bakterinin birkaç bakteriden güçlü olduğunu, ancak bu birkaç bakterinin de birlik olarak engelleri aşabileceğini söyleyebilirim. Erwin F. Smith, 1905”.

İşte bu sözlerden yıllar sonra, yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirleri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir. Quorum sensing: Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile birbirleri ile haberleşmeleri ve iletişim kurmalarıdır. QS sözcük olarak bir oturma veya toplantı için gerekli olan en az birey sayısının bir araya gelmesi anlamına gelmektedir. Biyoloji açısından ise, bir bakteri topluluğunda birey sayısı belli bir düzeye ulaştığında ortaya çıkan özel bir tip hücrelerarası iletişim anlamına gelir (18).

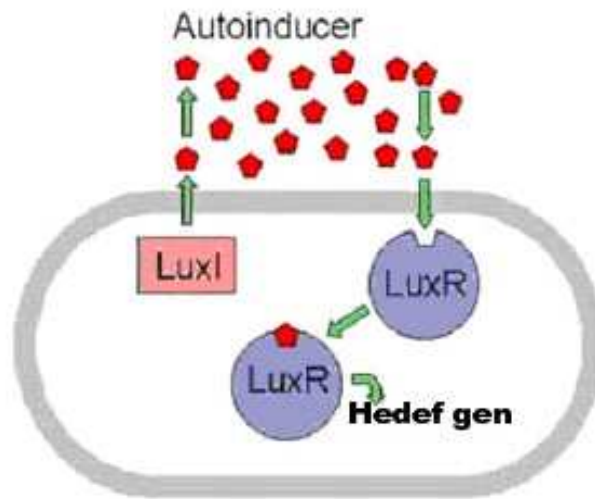
Hücrenin bireysel davranış yerine, organize bir topluluk olarak davranış göstermesi QS olarak tarif edilir. QS; bakterilerde pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar; kümeleşme (swarming), hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virülans (ekzoenzim ve proteaz üretimi) gibi. Bu düzenlenme sonucunda bakteri ortamdaki besin maddelerinin daha rasyonel kullanımı, bulunduğu ortama uyum sağlama, çevresel etkenlere karşı korunma, aynı ortamdaki diğer mikroorganizmalarla yarışma veya konağın savunma mekanizması ile mücadele etme, popülasyondaki birey sayısını ortamın gereklerine göre kontrol etme gibi fonksiyonları yerine getirme olanağı bulur (67).

Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile genetik mekanizmalar harekete geçer ve yeni davranışlar ortaya çıkar. Bir cümle ile özetlemek istenirse QS bakterinin otoinducer (autoinducer, AI) adı verilen bir uyarı molekülünü sentezlemesi, ekstrasellüler ortama salması, eşik değer konsantrasyonuna ulaştığında onu algılaması ve gen transkripsiyonu ile bir yanıt geliştirmesidir. QS sistemi bakterinin popülasyon içinde yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir ve bakteri bu bilgiyi kullanarak genetik materyalini kontrol edip yönlendirir.

QS; yüksek hücre yoğunluğunda spesifik genlerin aktivasyonu ile kimyasal uyarıların salınmasını içeren bir mekanizmadır. Otoinduser difüzyon yapabilen bir moleküldür. Hücre miktarı arttığı zaman otoinduser (N-acetylated homoserine lactone) konsantrasyonu artar, hedef hücrelere bağlanır. (örn; LasR-LasI, RhlR-RhlI) ve otoinduser protein kompleksi QS’i kontrol eden genleri aktive eder.

QS sisteminde kilit rol **otoinducer**'e aittir. Hücre içinde sentezlenen **otoinducer** ekstrasellüler ortama salınır. Bu otoinducer komşu hücre membranındaki reseptörlerce algılanır. Bu algılanma ise hücre içinde gen transkripsiyonuna kadar giden bir sinyal iletimini başlatır. Oluşan gen ekspresyonu ile de hücre topluluğu ortak bir yanıt geliştirmiş olur. QS gerçekleşmesi için ekstrasellüler ortamdaki **otoinducer**'in yeterli düzeye ulaşması gerekir. Bunun için de hücre sayısının artarak popülasyonda belli bir yoğunlaşma sağlanması gereklidir. Hücre sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmadan QS gerçekleşmez. QS sistemi temel olarak gram negatif bakterilerde bir çift **regulätör protein** ve bir **otoinducer**den, gram pozitif bakterilerde ise bir **prekursör peptid**, ondan oluşan **otoinducer peptid**, hücre membranında autoinducer peptidi algılayan **histidin kinaz reseptöründen** oluşur (76).

Gram negatif bakterilerde regulätör protein çifti LuxI/LuxR homologu olarak adlandırılır. LuxI/LuxR çifti QS in ilk kez tanımlandığı *Vibrio harveyi*'de bulunan regulätör protein çiftidir. QS in saptandığı diğer tüm gram negatif bakterilerde regulätör protein çifti yapı olarak LuxI/LuxR çiftine çok benzediğinden genel bir tanımla LuxI/LuxR homologu olarak adlandırılırlar. Otoinducer görevi, açillenmiş homoserin lakton (HSL) molekülü tarafından yapılır ve tüm gram negatif bakterilerde aynıdır. Gram negatif bakterilerde LuxI homologu olan protein HSL sentezini indükler. Sentezlenen HSL şekil 9 da gösterildiği gibi hücre dışına çıkar. Hücre dışında belli bir yoğunluğa erişen HSL hücre membranı tarafından algılanarak, tekrar hücre içine girer ve diğer regulätör protein olan LuxR ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Oluşan HSL-LuxR kompleksi gen transkripsiyonunu başlatır (22).



Şekil-9.: Quorum Sensing işleyiş mekanizmasının şematik gösterimi

QS sisteminin en fazla araştırıldığı bakterilerden biri *P aeruginosa*'dır. *P aeruginosa* virulansın quorum sensing ile nasıl düzenlendiğini gösteren çarpıcı bir örnektir. *Vimbrío fischerii*'de QS'den sorumlu *luxI luxR* genlerinin *P aeruginosa*'daki homoloğu olan *LasI/LasR –RhII/RhIR* genleri quorum sensingi düzenler. *P aeruginosa* belli hücre yoğunluğuna ulaştınca, hücreden hücreye ileti ile ekstraselüler virülans faktörlerinin salınımını kontrol eder. LasR HSL otoinducer ile birleşerek bazı virülans faktörlerini kodlayan genlerde transkripsiyonu başlatır. lasB ile kodlanan elastaz, lasA ile kodlanan proteaz, toxA ile kodlanan exotoksin A ve aprA geni ile kodlanan alkalin fosfataz üretilmeye başlanır ve bakterinin virulansı artar.

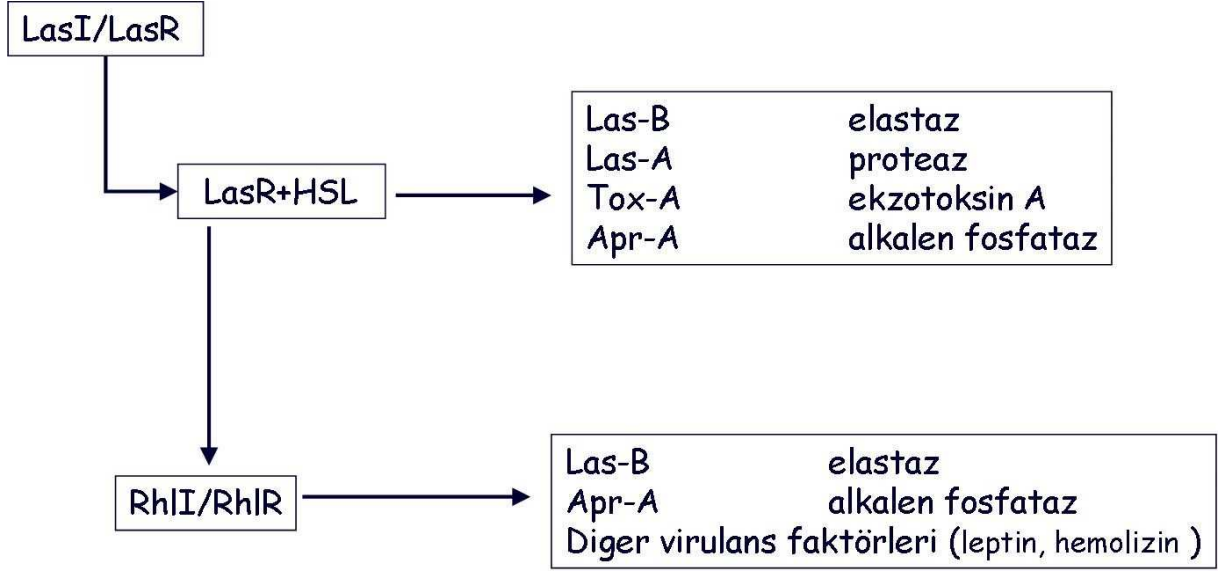
LasR-HSL kompleksi *P aeruginosa* daki diğer quorum sensing sistemi olan RhII /RhIR sistemini aktive eder. Bu sistem bir öncekinin aktive ettiği genlerden ikisi olan lasB ve aprA genleri yanında sitotoksik leptin ve hemolizin gibi patojeniteyle yakından ilgili bazı faktörlerin sentezini aktive eder.

Quorum sensing *P aeruginosa*'nın biofilm oluşturmada kritik rol oynar. lasI üretemeyen mutant *P aeruginosa*'nın sağlam biofilm oluşturamadığı ve biofilm oluşumunun mikrokoloni evresinde iken durduğu gösterilmiştir (62).

Biofilm formasyonu özellikle kistik fibrozlu hastalarda ortaya çıkan *P aeruginosa*'ya bağlı dirençli akciğer enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Kistik fibrozlu hastalarda balgam incelemelerinde biofilm oluşturmuş *P aeruginosa* sık olarak gözlenmiştir. Ayrıca bu hastaların balgamında lasI ve rhII saptanmıştır (36). *P aeruginosa*'nın bronşlarda biofilm oluşturmada kistik fibroziste dirençli ve kronik enfeksiyonu gelişmesinin en önemli nedenidir. Biofilm oluşumunda kritik rol oynayan iki önemli faktör QS ve *P aeruginosa*'nın alginat üretimidir. Alginat üretimini sentezleyen genler aynı zamanda QS üzerinde regülatör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (34).

P aeruginosa'nın ürettiği bir proteaz olan Las A ve elastaz olarak ta adlandırılan LasB sinerjik olarak akciğerde doku yıkımı yapmakta ve bronşektazi ve fibroze yol açmaktadır. Her iki enzimin üretimi de QS ile regüle edilmektedir.

P aeruginosa'nın ürettiği ekzotoksin ve hemolizin gibi diğer virülans faktörleri de QS ile düzenlenmektedir. QS sistemlerinin aktivasyonu bakteri sayısı ile ilgilidir. Bu nedenle *P aeruginosa*'nın başlangıçtaki kolonizasyon döneminde mikroorganizma sayısı az olduğundan QS aktive olmamaktadır. Bu dönemde hücre virülans faktörleri salmamaktadır. Aslında mikroorganizma belli bir sayıya erişene dek kendini gizlemekte, böylece konak savunma mekanizmalarından korunmaktadır.



Şekil-10. *P aeruginosa*'da Las ve Rhl sistemlerinin şematik gösterimi

P aeruginosa da en az iki N asetil homoserin lakton çifti (LasI/lasR)- (RhlI/RhlR) QS'i düzenlenmekte rol oynar (Şekil 10). LasI; QS'de otoinduser sentaz olan N- (3 oxodode canoyl) homoserin lacton (3OC12-HSL) sentezletirken, RhlI; N-butyryl homoserin lactone (C4-HSL) sentezletir.

LasI ----- N- (3 oxodode canoyl) homoserin lacton (3OC12-HSL)

RhlI ----- N-butyryl homoserin lactone (C4-HSL)

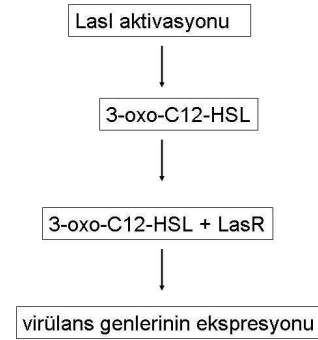
LasI; LasR ile kodlanan transkripsiyon aktivatörünü tetikler. LasR; LasA, LasB, toxA, apr gibi virülans genlerini indükler.

Yüksek hücre yoğunluğu 3OC12-HSL ve C4-HSL'nin kritik düzeye çıkmasına böylece farklı virülans genlerinin kopyalanmasına, QS genlerinin aktivasyonuna neden olur (Şekil 11).

P aeruginosa'da QS sisteminin LasB elastazın regülasyonunda rolü gösterilmiş ve bu sisteme Las sistemi denilmiştir. (22)

LasI; 3-oxo-C12HSL (N- (3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone sentezinden sorumlu gendir. LasR ise transkripsiyonel aktivatör proteindir.

LasI aktivasyonu ile 3-oxo-C12-HSL miktarı artar. LasR'ye bağlanır Bu otoinducer virülans genlerinin



Şekil-11. LasI, LasR ve virulans faktörleri ilişkisi

ekspresyonunun artmasından sorumludur.

P aeruginosa'daki ikinci QS sistemi Rhl'dir. Ramnolipid üretiminin kontrolünden sorumludur. RhlI 'yi oluşturan sistem C4- HSL (N-butyrylhomoserin lactone) otoinducer sentaz genidir. RhlR gende transcriptional aktivatör proteindir. Bu sistem rhlAB operonunun aktivasyonu ile regüle edilir. Rhl sistemi LasA proteaz, LasB elastaz, piyosiyenin, siyanit ve alkalın proteaz üretimi için gereklidir. Ayrıca Rhl sistemi strese cevap genlerinin (rpoS, sigma faktör) regülasyonunu da sağlar (67).

Hücrelerarası iletişim *P aeruginosa*'nın konak savunmasına karşı koymasında rol oynar. Bakteri sayıca az iken üreteceği ekstrasellüler virulans faktörleri konak savunma sistemlerini tetikleyecek ve bu etken hızla nötralize edilecektir. Buna karşılık quorum sensing yoluyla tüm bakteri popülasyonunun bir koordinasyon içinde davranması ile bakteri sayısı belli bir düzeye ulaşana dek virulans faktörleri salgılanmaz. Konak savunmasını yenebilecek miktarda virulans faktörü üretebilecek bakteri yoğunluğuna erişildiğinde ilgili genler aktive edilir. Böylece bakteri toksinleri ile vücut direnci arasındaki denge bakteri lehine bozulur ve damar duvarı invazyonu, disseminasyon, sistemik enflamatuvar yanıtın tetiklenmesi ile organ yetmezlikleri ve ölüme kadar gidebilecek süreç başlar. Bu aşamada uygun antibiyotik tedavisi bile gidişi değiştiremeyebilir.

Sonuç olarak *P aeruginosa* patogenezi çok sayıda virulans faktörünü içeren kompleks bir yapıya sahiptir. Doku invazyonu ve disseminasyonu için bu ekstrasellüler virulans faktörleri gereklidir. Bu faktörlerin üretimi ve kontrolü büyük oranda hücrelerarası iletişim sistemlerine, homoserin lakton (HSL) tabanlı sinyal moleküllerine ve spesifik transkripsiyonal aktivatör proteinlerine bağlıdır. Bu düzenleyici sistemler, *P aeruginosa*'nın virülans faktörlerini koordinasyon içinde ve hücre yoğunluğu gözetilerek üretmesini ve böylece konak savunma mekanizmasının üstesinden gelmesini sağlar. Bu sistemlerin araştırılarak daha iyi anlaşılması yeni tedavi yaklaşımlarının bulunmasına olanak sağlayacak ve yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bu enfeksiyonla mücadelede farklı seçenekler sunabilecektir.

Bu çalışmanın amacı farklı örneklerden izole edilen *P aeruginosa* suşlarını virulans faktörleri, biofilm yapma yeteneği ve quorum sensing kabiliyeti yönünden incelemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi değişik klinik ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait; kan, trakeal aspirat, idrar, yara, ve kateter örneklerinden Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarında izole ve identifiye edilen 100 adet *P aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alındı. Hastane dışı örnekleri elde edebilmek amacıyla şehrin değişik havuz, gölet, yağmur suları ve kaplıca sularından 60 adet örnek toplandı. Ancak 4 örnekte *P aeruginosa* izolasyonu sağlandı. İstatiksel değeri olmadığı için çalışma kapsamına alınmadı.

P aeruginosa suşlarının izolasyonu klasik yöntemler ile yapıldı. İdentifikasyonunda BD Phoenix TM tanı sistemi (Becton-Dickinson, ABD) kullanıldı. Bakteriler çalışılincaya kadar Mikrobank boncuklu tüplerde -20°C’de dondurularak saklandı. Çalışma sırasında kanlı besiyerine pasaj yapıldı. Üreyen kolonilerden pasaj yapılarak elde edilen bakterilerle çalışıldı. Çalışmada kullanılan kontrol suşu *P aeruginosa* (PAO1, ATCC-15692), *Agrobacterium tumefaciens*, (*Rhizobium*, ATCC-51350) ve *S aureus* (ATCC 25904) LGC Promochem’den sağlandı.

Tüm suşlarda biyofilm oluşumu, quorum sensing ve değişik virulans faktörleri araştırıldı.

Homoserin Lakton saptanması için Cross-feeding test:

LB agar 40µl X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ile kaplandı. Bu işlem için 1 ml Dimetil sülfoksit içine 20 mg X-Gal konarak eritildi. LB besiyeri konmuş plaklara 40 µl X-Gal damlatılıp, cam çubukla tüm yüzeye yayıldı. 37°C’de 1-2 saat beklenerek kuruması sağlandı. Besiyerleri kuruduktan sonra HSL reporter suşu olarak *Agrobacterium tumefaciens* A136 (ATCC no:51350) ve *P aeruginosa* 1cm ara ile çizgi ekim olarak ekildi. 48-72 saat süresince inkube edilerek renk değişikliği gözlemlendi. *P aeruginosa* HSL üretiyorsa agara difüze olur ve *A tumefaciens*’teki tra-I, lac-Z genlerini aktive eder. Aktivasyon sonucu şeffaf, saydam koloniler yapan *A tumefaciens* renk değişikliği ile mavi pigmentasyon oluşturur. Oluşan mavi renk HSL üretildiğini gösterir .

Motilite:

P aeruginosa twitching, swimming ve swarming olarak adlandırılan üç farklı motilite karakteri göstermektedir.

Twitching: Bakteri 3 mm kalınlığında hazırlanan % 1'lik LB agara iğne öze ile inokule edildi. 30°C de 24-48 saat inkübe edildi. Agar-polistiren yüzey birleşimindeki bulanık alan gözlemlendi. Besiyerinin kenarı öze kullanılarak ucundan kaldırıldı ve petri kutusu ters çevrilerek agar öze yardımı ile uzaklaştırıldı. Distile su ile petri kutusunun yüzeyi yıkanıp yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Zemin % 1'lik kristal viyole ile kaplanarak 15-20 dk beklendi. Boya uzaklaştırılıp distile su ile yıkanıp yüzeye yapışmış olan bakterilerin boyanması gözlemlendi.

Swimming: Bakteri iğne öze kullanılarak % 1 tripton (Sigma Lot/Ch-B:310783), % 0,5 NaCl, % 0,3 agar (Acumedia Lot10-09-VA) içeren plağa ekilerek 30°C de 16 saat inkübe edildi. Ekilen bölgede bakteri üremesi gözlemlendikten sonra inokulasyon bölgesinden dışarıya doğru oluşan bulanık zon ölçülerek swimming değerlendirildi.

Swarming: Swarming plate % 0,5 agar, 8 g/l broth, 5 g/l dekstroz ile hazırlandı. İğne öze ile bakteri inokulasyonu yapıldı. 30°C de 24 saat inkübe edildi. Bu yarı katı besiyerinde *P aeruginosa* için tipik olan düzensiz dallanmalar gösteren kümeleşme gözlenerek swarming değerlendirildi.

Biyofilm oluşumu:

U plate biyofilm: *P aeruginosa* suşları, Luria Bertani (LB) broth'a (Difco Lot:5053293) ekim yapılarak 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda tüpler vortexlendi. Tüpten 10 µl örnek alınarak 990 µl LB broth ile karıştırıldı ve 1/100'lük bakteri dilüsyonu hazırlandı. Tekrar vortexlendi. Doksanaltı gözlü U plate alınarak bir çukura 1/100'lük bakteri dilüsyonundan 100µl ve LB brothdan 100µl konuldu. Yirmidört saat süresince 37°C'de bekletildi. Kuyucuklar pipetle boşaltılıp distile su ile 3 kez yıkandı. Çukurlara 1/100'lük kristal viyole ilave edilip 20 dakika beklenerek, biyofilm oluşturmuş hücrelerin boyanması sağlandı. Tekrar distile su ile 3 kez yıkanıp kuyucuklara 200 µl etanol eklendi. 15 dakika beklenip bu sıvı eppendorf tüplere alındı. Volüm distile su ile 1000µl'ye tamamlandı. Spektrofotometrede (UV-1202 UV-VIS Shimadzu) 540 nm de okutuldu.

Tüpte biyofilm: Polistren 12X75 mm tüplere 0,5 ml LB broth konuldu. LB kültürde bir gece inkübe edilerek üretilmiş olan bakteriden bir öze alınarak inokulasyon yapıldı. 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Distile suyla 3 kez yıkandıktan sonra % 1 lik kristal viyole ile oda sıcaklığında 20 dk boyandı. Tekrar distile suyla 3 kez yıkanıp 2 ml % 95 etanol konularak boyalı biyofilm eritildi. 600nm de spektrofotometrede (UV-1202 UV-VIS Shimadzu) okundu.

Pyosiyenin ölçümü:

GA mediumda (GA medium; %1 Glycerol, 6 gr/lit L-alanin, 2 gr/lit MgSO₄, 0,1 gr/lit K₂HPO₄, 0,018 gr/lit FeSO₄) 24 saatte üretilen *P aeruginosa* santrifüj edildi, 2 ml süpernatant alınarak 2 ml kloroform ile karıştırıldı. Shaker'da 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Alt organik tabaka ayrıldı. Kloroformda renk değişikliği meydana geldikten sonra (GA mediumda inkübasyon sırasında oluşmuş olan mavi, yeşil renk değişikliği kloroforma geçer.) bu kısım alınarak 1,5 ml 0,2N HCl eklendi, karıştırıldı, pembeden kırmızıya değişen renk A520 de okunarak pyosiyenin miktarı ölçüldü.

Elastaz aktivitesi (Elastin kongo red testi):

LB broth da 12-14 saat bakteri inkübe edildi. Ölçüm öncesi hücre konsantrasyonu 3 Mcfarland olarak ayarlandı. Tüpler santrifüj edildi. 100 ul süpernatant alınarak 2ml 10 mMol NaHPO₄ içine eklendi. Buna 20 mg elastin Kongo red karıştırıldı. 37°C de 16 saat rotasyonla inkübe edildi. 3000g de 10 dakika santrifüjlendi, supernatant alınarak spektrofotometrede (UV-1202 UV-VIS Shimadzu) 495nm.de okundu.

Las A aktivitesi (stafilolitik aktivite):

S aureus (ATCC 25904) 0,02 M tris-HCl (Sigma T3253-100G) içinde süspansiyon haline getirildi. 10-15 dk benmari de kaynatıldı. Hücre süspansiyonu aynı tampon ile optik dansitesi 595 nm de 0,8 olacak şekilde dilüe edildi. Dilüe stafilokok hücreleri soğumakta olan LB agara eklendi. (Besiyeri soğutulurken 40°C'ye gelince besiyerine solüsyon konuldu). LB agara *Pseudomonas* suşları ile çizgi ekim yapıldı. 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Las-A stafilolitik aktiviteyi göstermesi beklenen çizgi etrafındaki temiz alan gözlenmeye çalışıldı. Ancak bu yöntemle deney sonunda beklenen sonuca ulaşamadı. Yapılan denemeler sonunda *S aureus* +tris-HCl solüsyonu optik dansite OD595'de 0,8 olacak şekilde dilüe edilmiş ve kaynatılmadan besiyerine eklendiği zaman deney kaynak makalede belirtilen sonuca ulaşmıştır. Üstte belirtildiği gibi solüsyon kaynatıldığı veya otoklavlandığı zaman istenen reaksiyon elde edilememiştir.

Quorum sensing genleri için PCR:

Kromozomal DNA ekstrakte edildi. *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri için oligonükleotid primerler kullanılarak değişik sıcaklık dereceleri ve sikluslar kullanılarak PCR yapıldı.

DNA ekstraksiyonu: Bakteri %5 koyun kanlı Columbia agarda 18-24 saat inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüpüne 250µl distile su konup, 3-4 koloni *P aeruginosa* distile suya homojen olarak dağıtıldı. Dondurularak -80°C’de en az 24 saat bekletildi. Amplifikasyon yapılacağı gün dondurulan bakteriler buzdolabından çıkarılarak çözünmesi sağlandı, vortekslendi. Thermalcycler cihazında 99°C’de 10dk kaynatıldı. Soğutmalı santrifüjde 11000g’de 3dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 20µl alınarak PCR çalışmalarında DNA kaynağı olarak kullanıldı.

PCR için hazırlık: Dört gen için ikişer çift internal ve intakt primer olmak üzere toplam 8 primer kullanıldı. PCR işlemi için primerler 1 µl de 100 pikomol olacak şekilde 16 ohm’luk deiyonize steril distile su ile sulandırıldı.

Kromozomal DNA; PAO1 ve QS araştırılan klinik izolatlardan ekstrakte edildi. İki farklı oligonükleotit primer seti kullanıldı. (las-l, las-r, rhl-l, rhl-r genlerindeki farklı bölgelere uygun olarak üretilmiş olan bir set 4 tane intakt gen, diğer set de 4 tane internal gen bulunan primerler kullanıldı). PCR toplam 50 µl volum içinde 30 ng kromozomal DNA ile yapıldı.

Bir örnek için 50 µl miks hazırlanması: 5µl buffer, 1µl DNTP, 3µl MgCl₂, 0,5µl primer, 0,5µl Tag polimeraz , 29,5µl deiyonize steril distile sudan oluşan mastermiks hazırlandı. 40’ar µl alınarak 0,5 ml lik tüplere paylaştırıldı. Üstüne *P aeruginosa* ekstraksiyonlarından elde ettiğimiz genetik materyalden 10µl eklendi. Termocycle cihazına kondu.

İnternal gen için PCR koşulları:

95°C’de 5 dk ısıtmanın ardından 32 siklus ;

95 °C’de 30 sn

59 °C’de 60 sn

72 °C’de 90 sn

Son siklusta 72 °C’de 10 dk işlem gördü.

İntakt gen için PCR koşulları:

34 siklus;

94 °C’de 30 sn

50 °C’de 30 sn

72 °C’de 2dk işlem gördü.

DNA fragmanları agaroz jel üzerinde etidyum bromit boyaması ile saptandı. 120 ml 0,5 TBE’a (Tris borate EDTA buffer) 2gr agar (agarose low EEO) eklendi. 700watt da 3-4 dk mikrodalgada eritilir. Üzerine 2 damla etidyum bromit damlatılarak elektroforez

tablasına taraklar yerleştirilip döküldü, donması beklendi, jel hazırlandı. Donduktan sonra taraklar çıkarılıp üzeri tris borate EDTA buffer örtecek şekilde küvete konuldu.

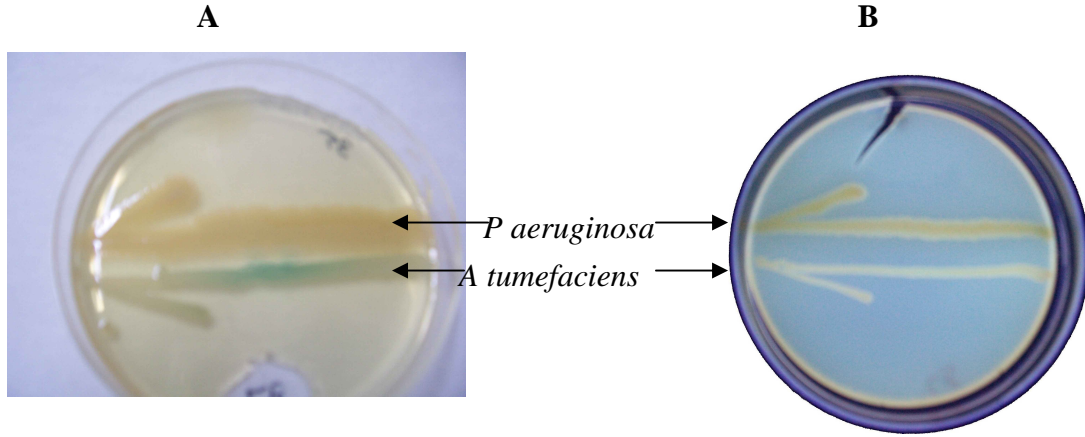
Jele konacak karışımın hazırlanması: Aliminyum folyo üzerine 2'şer µl loading damlatıldı. Size için; 2µl size, 2µl loading, 8µl TBE karıştırılıp 10µl'si alındı. Örnekler için; 2µl loading, 10µl PCR ürünü karıştırılıp 10µl'si alındı. İlk kuyucuklara size konup diğer kuyucuklar elde ettiğimiz PCR ürünleri ve loadingden oluşan karışım konuldu. 130 voltta 30 dk elektroforez uygulandı. DNA size olarak 100BP-1.5KB DNA Ladder (MSM34/MSM35) kullanıldı.

Deneilerin sonunda çalışılan suşlarla elde edilen sayısal değerler PAO1 kontrol suşu ile elde edilen değere bölünerek normalize edildi. Verilerin karışlaştırılmasında t-test kullanılarak, $p \leq 0.05$ ve altı değerler anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 100 adet *P aeruginosa* suşundan 3 tanesi canlandırılmadığından 97 örnek kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Bu örneklerin 6 tanesi idrar, 24 tanesi kan, 12 tanesi kateter, 40 tanesi trakeal aspirat, 15 tanesi yara kültüründen izole edilmişti. Pozitif kontrol olarak PAO1 (ATCC 15692) kullanıldı. Sayısal değer olarak elde edilen verilerin hepsi pozitif kontrol ile kıyaslanarak normalize edildi. Buna göre her deneyde pozitif kontrol suşundan elde edilen değer 1 olarak kabul edildi ve örneklerin kontrol suşuna göre aldıkları değer hesaplanarak kaydedildi. Sonuçların değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında örneklerde QS yeteneği ve izole edildikleri örnek göz önüne alınarak iki farklı gruplandırma yapıldı. Örneklerde Homoserin lakton üretimi saptanmasına göre QS (+) ve QS (-) olarak iki gruba ayrıldı. Ayrıca örneklerin izole edildiği lokalizasyona göre idrar, kan, kateter, trakeal aspirat ve yara olmak üzere beş grup ele alınarak kendi içinde karşılaştırma yapıldı. Gruplar arası değerlendirmede $P \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Homoserin lakton saptanması için Cross-feeding test:



Şekil-12. Bakteri HSL üretiyorsa ortama salınan HSL molekülleri agara difüze olur ve *A tumefaciens*'teki tra-I, lac-Z genlerini aktive eder. Aktivasyon sonucu şeffaf, saydam koloniler yapan *A tumefaciens* renk değişikliği ile mavi pigmentasyon oluşturur. Oluşan mavi renk HSL üretildiğini gösterir. Şekilde A da mavi renk izlenmesi *P aeruginosa*'nın HSL ürettiğini gösterirken, B de renk değişiminin olmaması ortamda HSL bulunmadığını göstermektedir.

Doksanyedi örnekten 43'ünde HSL üretimi gözlemlendi ve QS (+) olarak değerlendirildi. Kalan 54 suş ile beklenen renk değişikliği olmadığından QS (-) olarak kabul edildi (Şekil 12).

Altı idrar örneğinden 4 tanesinde, 24 kan örneğinden 13 tanesinde, 12 kateter örneğinin 4 tanesinde, 40 TAS örneğinin 13 tanesinde, 15 yara örneğinin 9 tanesinde QS (+) bulundu (Tablo 3).

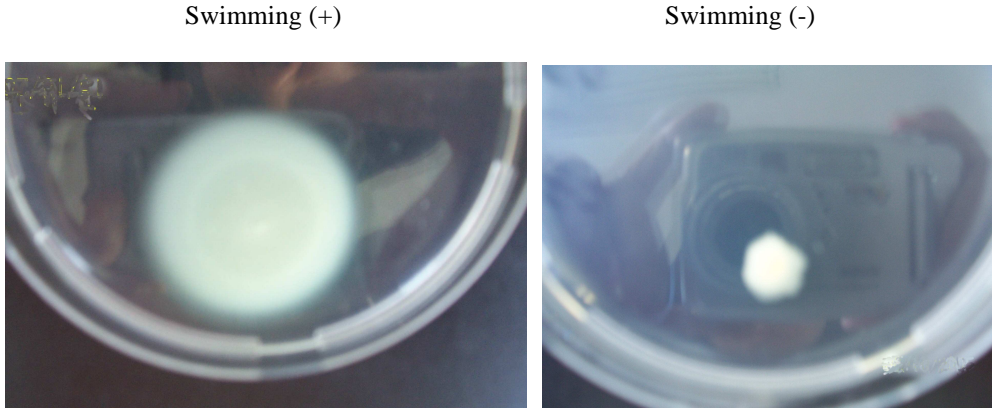
Tablo-3. QS (+) ve QS (-) Suşların Üretildikleri Örneğe Göre Dağılımı

	QS (+)	QS (-)
İdrar (6)	4 (%67)	2 (%33)
Kan (24)	13 (%54)	11 (%46)
Kateter (12)	4 (% 33)	8 (%67)
TAS (40)	13 (%32)	27 (%68)
Yara (15)	9 (%60)	6 (%40)
Toplam	43 (%44)	54 (%56)

Örneklerin diğer fenotipik incelemelerinin değerlendirilmesinde bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma yapılırken ayrıca HSL üretimi saptanmasına göre QS (+) ve QS (-) olarak iki gruba ayrılarak ta değerlendirme yapıldı.

Motilite:

Swimming: İnokulasyon yerini çevreleyen bulanık zon kenarının merkezden uzaklığı mm cinsinden ölçüldü (Şekil13). QS (+) bulunan suşlarda swimming QS (-) olanlara göre anlamlı şekilde daha fazla gözlemlendi. İdrardan üretilen suşlar diğer tüm örneklerden anlamlı derecede daha fazla swimming yaparken, diğer örnekler arasındaki karşılaştırmada sadece TAS ile kandan alınan örnekler arasında kan lehine anlamlı farklılık gözlemlendi (Tablo 4 ve 5).



Şekil-13. Solda belirgin swimming tarzı motilite göstermiş ve sağda çok kısıtlı swimming yapmış *P aeruginosa* izlenmektedir.

Tablo-4. QS (+) ve QS (-) Suşların Swimming Değerleri

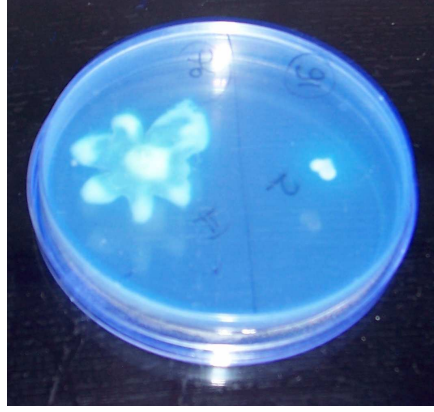
Swimming	PAO1	QS (+)	QS (-)
Ortalama \pm SD	1	0,73 \pm 0,2	0,59 \pm 0,2
		$P=0,0002^*$	

Tablo-5. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Swimming Değerleri

Swimming	PAO1	İdrar	Kan	Kateter	TAS	yara
Ortalama \pm SD	1	0,82 \pm 0,1	0,54 \pm 0,2	0,56 \pm 0,1	0,61 \pm 0,1	0,62 \pm 0,2
<i>İdrar</i>			$P=0,0001^*$	$P=0,001^*$	$P=0,003^*$	$P=0,01^*$
<i>Kan</i>				$P=0,3$	$P=0,04^*$	$P=0,1$
<i>Kateter</i>					$P=0,2$	$P=0,2$
<i>TAS</i>						$P=0,4$

Swarming: İnokulasyon bölgesinden çevreye doğru oluşan dallanmaların merkeze uzaklığı en az üç yerden ölçülüp ortalamaları alınarak her bir suşun swarming değeri ölçüldü (Şekil 14). QS (+) bulunan suşlarda swarming QS (-) olanlara göre anlamlı şekilde daha fazla gözlemlendi. İdrardan üretilen suşlar sadece kateterden üretilen suşlardan anlamlı derecede daha fazla swarming yaparken, diğer örnekler arasındaki karşılaştırmada anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo 6 ve 7).

Swarming (+) Swarming (-)



Şekil-14. Aynı besiyerinde swarming yapan ve yapmayan iki farklı suş.

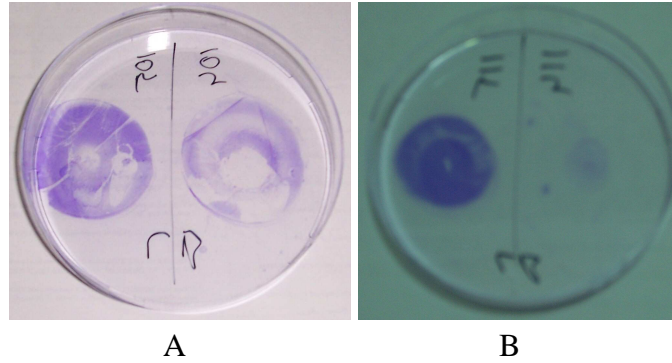
Tablo-6. QS (+) ve QS (-) Suşların Swarming Değerleri

Swarming	PAOI	QS (+)	QS (-)
Ortalama ± SD	1	0,32 ± 0,2	0,25 ± 0,1
		$P=0,03^*$	

Tablo-7. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Swarming Değerleri

Swarming	PAOI	İdrar	Kan	Kateter	TAS	yara
Ortalama ± SD	1	0,47 ± 0,2	0,29 ± 0,2	0,25 ± 0,1	0,29 ± 0,2	0,36 ± 0,2
İdrar			$P=0,07$	$P=0,04^*$	$P=0,08$	$P=0,2$
Kan				$P=0,2$	$P=0,5$	$P=0,2$
Kateter					$P=0,2$	$P=0,09$
TAS						$P=0,2$

Twitching: QS (+) bulunan suşlarda twitching QS (-) olanlara göre anlamlı şekilde daha fazla gözlemlendi (Şekil 15). İdrar, kan ve kateter örneklerinden alınan suşlar yaradan üretilen suşlardan anlamlı derecede daha fazla twitching yaparken, diğer örnekler arasındaki karşılaştırmada sadece TAS ile kateterden alınan örnekler arasında kateter lehine anlamlı farklılık gözlemlendi (Tablo 8 ve 9).



Şekil-15. A; belirgin twitching yapmış iki ayrı *P aeruginosa* suşu
B aynı petri kutusunda solda twitching yapan ve sağda twitching yapmayan *P aeruginosa* suşları.

Tablo-8. QS (+) ve QS (-) Suşların Twitching Değerleri

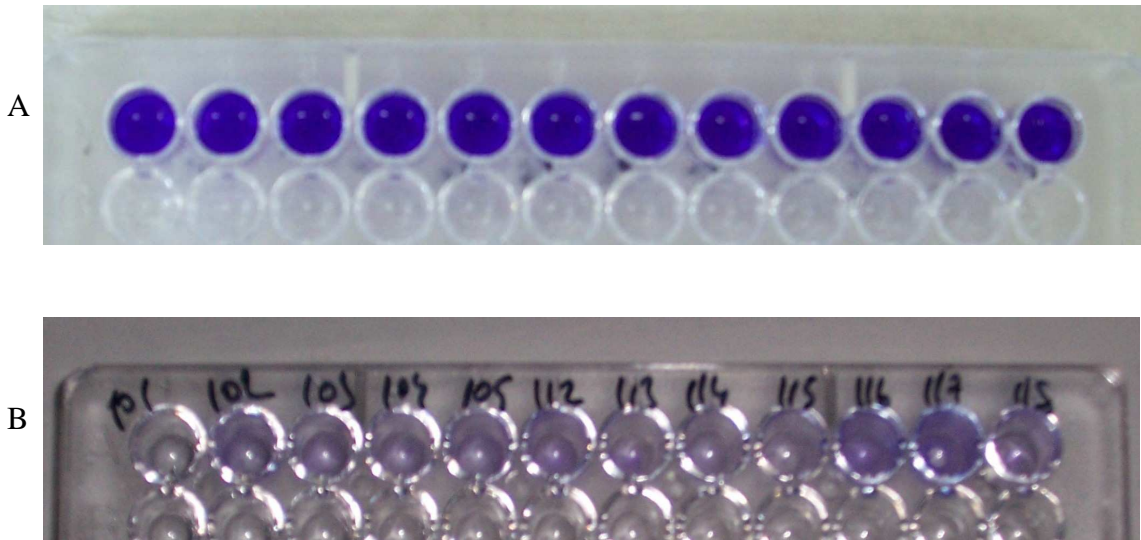
Twitching	PAO1	QS (+)	QS (-)
Ortalama ± SD	1	0,75± 0,3	0,63 ± 0,2
		<i>P=0,009*</i>	

Tablo-9. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Twitching Değerleri

Twitching	PAO1	İdrar	Kan	Kateter	TAS	yara
Ortalama ± SD	1	0,81 ± 0,3	0,71 ± 0,3	0,77 ± 0,2	0,63 ± 0,3	0,49 ± 0,3
<i>idrar</i>			<i>P=0,2</i>	<i>P=0,3</i>	<i>P=0,1</i>	<i>P=0,04*</i>
<i>kan</i>				<i>P=0,2</i>	<i>P=0,1</i>	<i>P=0,03*</i>
<i>kateter</i>					<i>P=0,05*</i>	<i>P=0,01*</i>
<i>TAS</i>						<i>P=0,1</i>

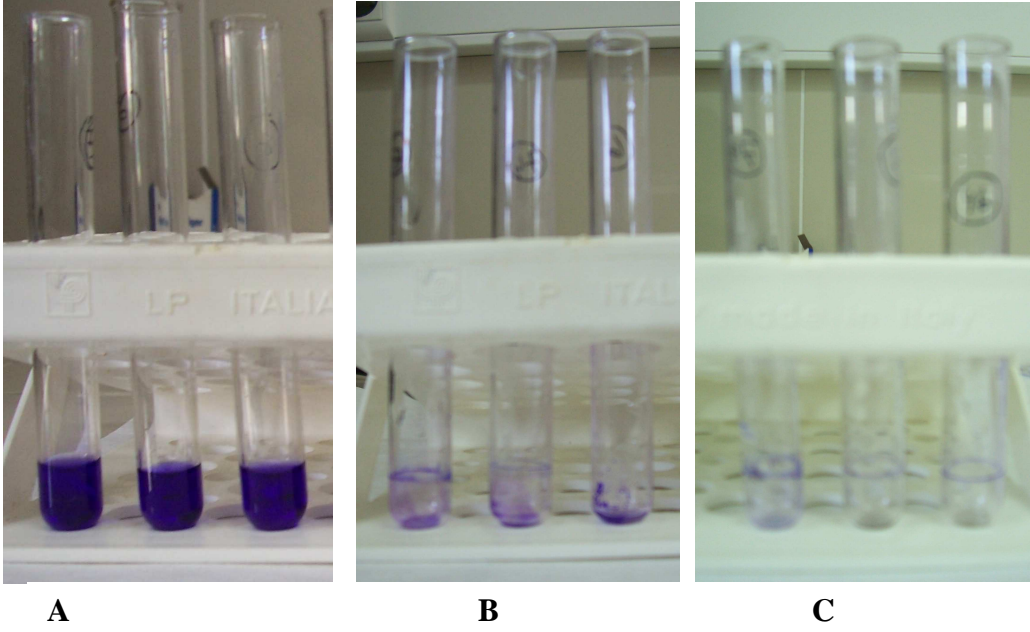
Biyofilm :

QS (+) olan suşlar hem tüp hem de plate'de anlamlı olarak daha fazla biyofilm oluşturdular (Şekil 16 ve 17). Bakterilerin izole edildikleri örneğe göre yapılan karşılaştırmada kan ve kateter örnekleri, TAS ve yara örneklerine göre hem tüpte, hem de plate de daha fazla biyofilm oluşturdular. Diğer örnekler arasındaki farklılık ise anlamlı bulunmadı (Tablo 10 ve 11)

**Şekil-16.** U plate de biyofilm.

A: Her biri farklı suşları içeren kuyucuklara kristal viyole konulmuş,

B: Boya uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra farklı düzeylerde biyofilm yapmış *P aeruginosa* boyalı olarak izlenmektedir.



Şekil-17. Tüpde biyofilm.

- A: Kristal viole ile boyanmış *P aeruginosa* kültürleri
 B: Boya yıkandıktan sonra boyalı kalan biyofilm tabakası
 C: Biyofilm yapmamış *P aeruginosa* kültürü

Tablo-10. QS (+) ve QS (-) Suşların Tüp ve Plate'de Biyofilm Oluşturma Değerleri

Biyofilm oluşumu	PAO-1	TÜP QS (+)	TÜP QS-	PLATE QS (+)	PLATE QS-
Ortalama \pm SD	1	$0,93 \pm 0,4$	$0,79 \pm 0,3$	$0,83 \pm 0,4$	$0,70 \pm 0,3$
		$P=0,04^*$		$P=0,04^*$	

Tablo-11. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Tüp ve Plate'de Biyofilm Oluşturma Değerleri

Tüpde biyofilm	PAO-1	İdrar	kan	kateter	TAS	yara
Ortalama \pm SD	1	$0,89 \pm 0,4$	$0,90 \pm 0,3$	$0,84 \pm 0,3$	$0,59 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,3$
<i>idrar</i>			$P=0,5$	$P=0,4$	$P=0,06$	$P=0,08$
<i>kan</i>				$P=0,3$	$P=0,0001^*$	$P=0,005^*$
<i>kateter</i>					$P=0,0001^*$	$P=0,03^*$
<i>TAS</i>						$P=0,4$

Plate biyofilm	PAO-1	İdrar	kan	kateter	TAS	yara
Ortalama \pm SD	1	$0,99 \pm 0,5$	$0,83 \pm 0,2$	$0,94 \pm 0,3$	$0,70 \pm 0,2$	$0,64 \pm 0,2$
<i>idrar</i>			$P=0,2$	$P=0,4$	$P=0,09$	$P=0,07$
<i>kan</i>				$P=0,1$	$P=0,01^*$	$P=0,002^*$
<i>kateter</i>					$P=0,01^*$	$P=0,004^*$
<i>TAS</i>						$P=0,2$

Piyosiyenin

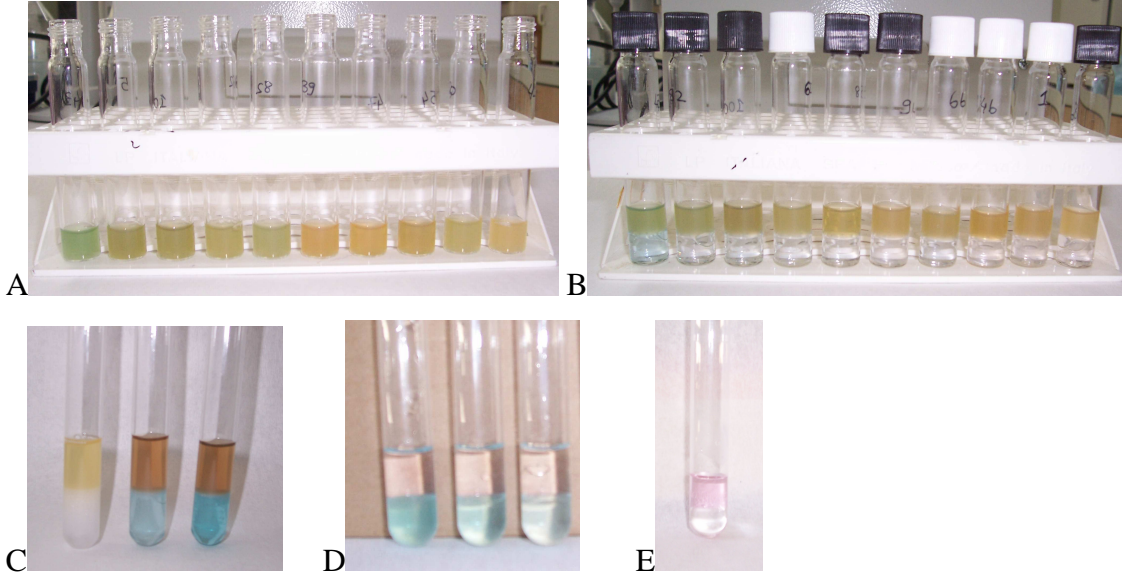
Piyosiyenin üretimi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu (Şekil 18). Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise yara örnekleri diğer tüm örneklerden anlamlı olarak daha az piyosiyenin üretirken, kan örnekleri kateter ve TAS örneklerine göre anlamlı olarak daha fazla piyosiyenin oluşturdu. Diğer örnekler arasındaki farklılık ise anlamlı bulunmadı (Tablo 12 ve 13).

Tablo-12. QS (+) ve QS (-) Suşların Piyosiyenin Değerleri

piyosiyenin	PAO1	QS (+)	QS (-)
Ortalama \pm SD	1	1,27 \pm 0,7	1,25 \pm 0,7
		$P=0,4$	

Tablo-13. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Piyosiyenin Değerleri

piyosiyenin	PAO1	idrar	Kan	kateter	TAS	yara
Ortalama \pm SD	1	1,54 \pm 0,8	1,53 \pm 0,7	1,19 \pm 0,4	1,19 \pm 0,7	0,88 \pm 0,4
<i>idrar</i>			$P=0,5$	$P=0,2$	$P=0,2$	$P=0,05^*$
<i>Kan</i>				$P=0,04^*$	$P=0,04^*$	$P=0,0005^*$
<i>Kateter</i>					$P=0,5$	$P=0,03^*$
<i>TAS</i>						$P=0,02^*$



Şekil-18. Piyosiyenin saptanması için izlenen aşamalar gözlenmektedir.

A-GA mediumda üretilen *P. aeruginosa*

B- A'daki tüplere kloroform ilave edilmiş

C-B'deki tüpler 24 saat shakerda bırakılmış, piyosiyenin kloroforma geçmiş

D-piyosiyani içeren kloroforma HCl ilave edilmiş

E-HCl de renk değişikliği meydana gelmiş

Elastaz

Elastaz varlığında Kongo red kırmızı renk aldı (Şekil 19). Elastaz üretimi QS (+) ve (-) olan suşlarda birbirine yakın değerlerde bulundu. Bakterilerin izole edildikleri örneğe göre yapılan karşılaştırmada ise sadece idrar örnekleri TAS ve yara örneklerinden ve kan örnekleri yara örneklerinden anlamlı olarak daha fazla elastaz üretirken, diğer örnekler arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı. (Tablo 14 ve 15)



Şekil-19. Kongo red ile elastaz varlığında oluşan renk değişimi.

Tablo-14. QS (+) ve QS (-) Suşların Elastaz Değerleri

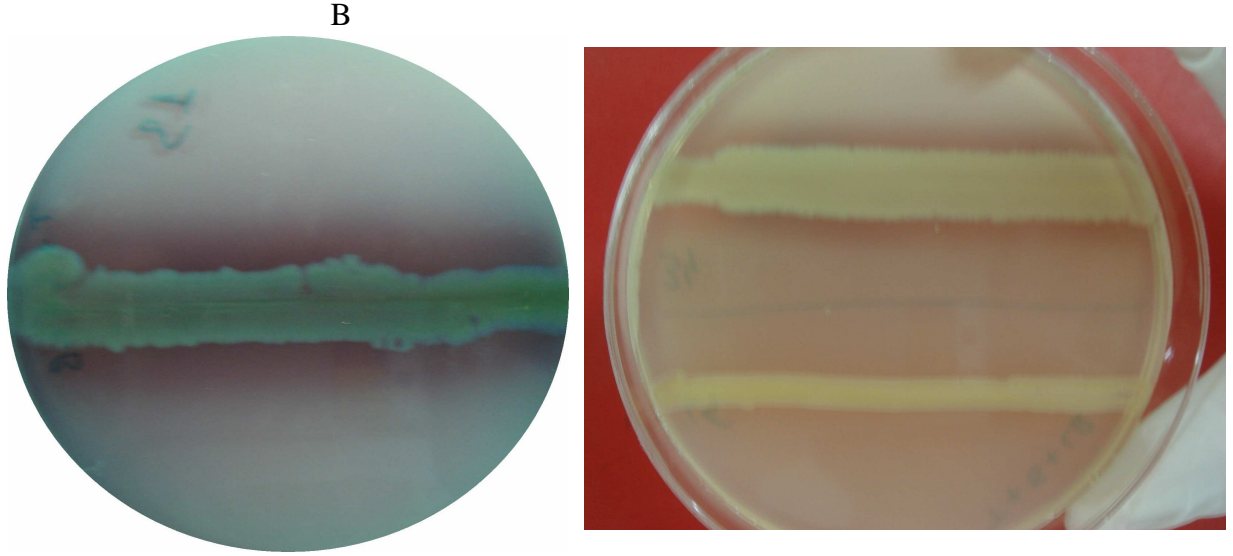
Elastaz	PAO1	QS (+)	QS (-)
Ortalama ± SD	1	0,71 ± 0,2	0,72 ± 0,2
		<i>P=0,43</i>	

Tablo-15. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların Elastaz Değerleri

Elastaz	PAO1	İdrar	kan	kateter	TAS	yara
Ortalama ± SD	1	0,85 ± 0,2	0,78 ± 0,2	0,72 ± 0,2	0,69 ± 0,2	0,60 ± 0,2
<i>idrar</i>			<i>P=0,2</i>	<i>P=0,08</i>	<i>P=0,04*</i>	<i>P=0,01*</i>
<i>kan</i>				<i>P=0,19</i>	<i>P=0,07</i>	<i>P=0,01*</i>
<i>kateter</i>					<i>P=0,38</i>	<i>P=0,08</i>
<i>TAS</i>						<i>P=0,08</i>

lasA:

Petri kutusuna çizgi ekim yapıldıktan sonra oluşan berrak zonun genişliği mm cinsinden ölçüldü (Şekil 20). LasA aktivitesi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu. Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise yine gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 16 ve 17).



Şekil-20. A: LasA aktivitesi gösteren *P aeruginosa*.

B: Aynı petri kutusunda LasA aktivitesi gösteren (üstte) ve göstermeyen (altta) iki ayrı suş.

Tablo-16. QS (+) ve QS (-) Suşların LasA Değerleri

lasA	PAO1	QS (+)	QS (-)
Ortalama ± SD	1	0,45 ± 0,4	0,53 ± 0,5
		$P=0,2$	

Tablo-17. Farklı Kaynaklardan Üretilmiş Suşların LasA Değerleri

lasA	PAO1	idrar	Kan	kateter	TAS	yara
Ortalama ± SD	1	0,67 ± 0,6	0,48 ± 0,5	0,46 ± 0,4	0,46 ± 0,5	0,58 ± 0,6
<i>idrar</i>			$P=0,2$	$P=0,2$	$P=0,2$	$P=0,4$
<i>kan</i>				$P=0,5$	$P=0,4$	$P=0,3$
<i>kateter</i>					$P=0,5$	$P=0,3$
<i>TAS</i>						$P=0,2$

Quorum sensing genleri için PCR:

Kromozomal DNA ekstrakte edildikten sonra *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri için oligonükleotid primerler kullanılarak değişik sıcaklık dereceleri ve sikluslar kullanılarak PCR yapıldı. PCR analizinde hem intakt gen hem de internal gen için ayrı ayrı primerler kullanıldı (Tablo 18). *Las I* için 605 bp gen intakt geni, 363 bp gen internal geni, *lasR* için 725 bp gen intakt geni, 362 bp gen internal geni, *RhlI* için 625 bp gen intakt geni, 143 bp gen internal geni ve *RhlR* için 730 bp gen intakt geni, 207 bp gen internal geni temsil etti (76).

Tablo-18. *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* Molekül Ağırlıkları

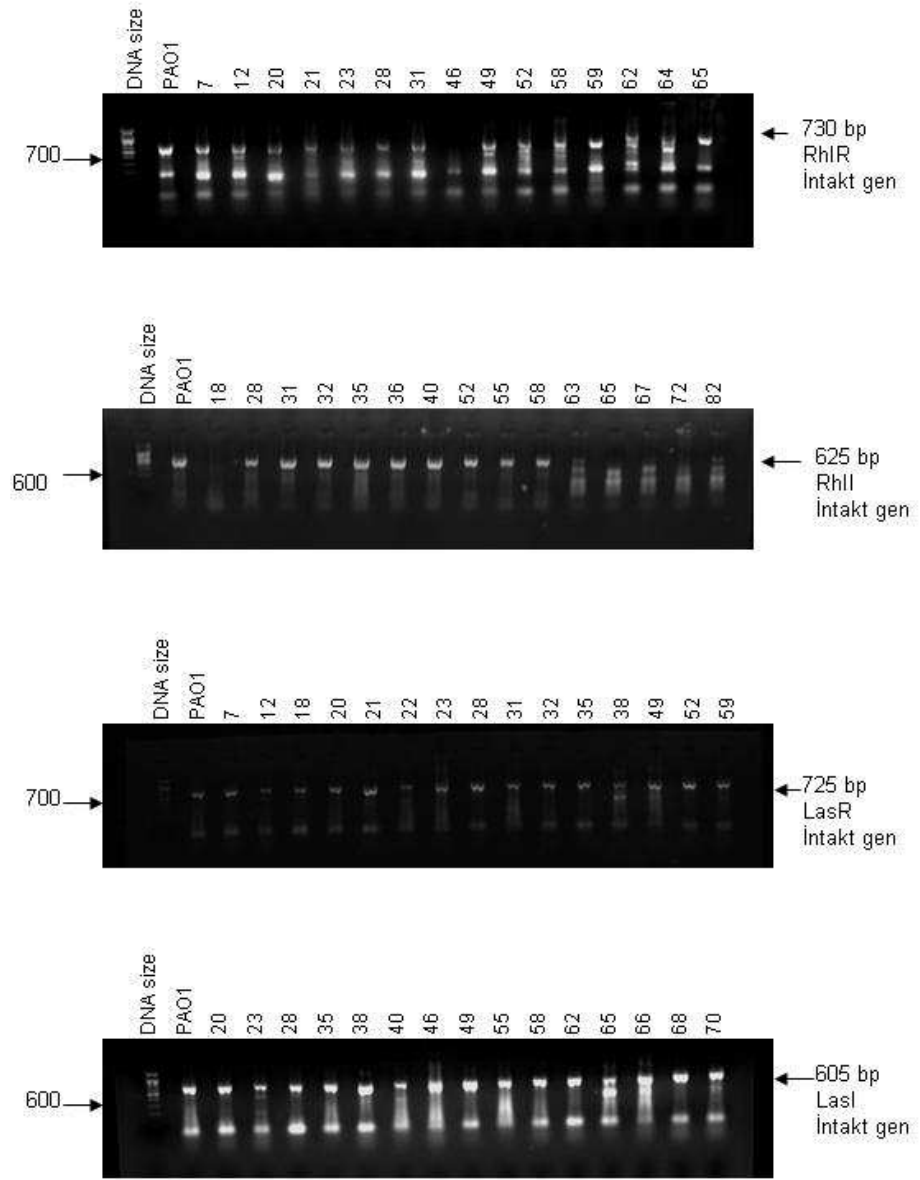
	İntakt gen	İnternal gen
<i>LasI</i>	605 bp	363 bp
<i>lasR</i>	725 bp	362 bp
<i>RhlI</i>	625 bp	143 bp
<i>RhlR</i>	730 bp	207 bp

QS (+) ve QS (-) olan tüm örneklerde *LasI* intakt geni ve internal geni sentezlendi. QS (+) olan 43 suşun 36 sında *lasR* intakt geni gösterilirken tümünde internal gen gözlemlendi. QS (-) olan 54 suşun 45 inde *lasR* intakt geni gösterilirken internal gen 53 suşta gözlemlendi. QS (+) suşların 30 unda *RhlI* intakt geni gösterilirken tümünde internal gen gözlemlendi. QS (-) suşların 38 inde *RhlI* intakt geni gösterilirken internal gen tümünde gözlemlendi. QS (+) suşların 37 sında *RhlR* intakt geni gösterilirken 39 unda internal gen gözlemlendi. QS (-) suşların 42 sinde *RhlR* intakt geni gösterilirken internal gen 49 suşta gözlemlendi (Tablo 19) (Şekil 21, 22).

Tablo-19. QS (+) ve QS (-) Suşların PCR Bulgularının Dağılımı

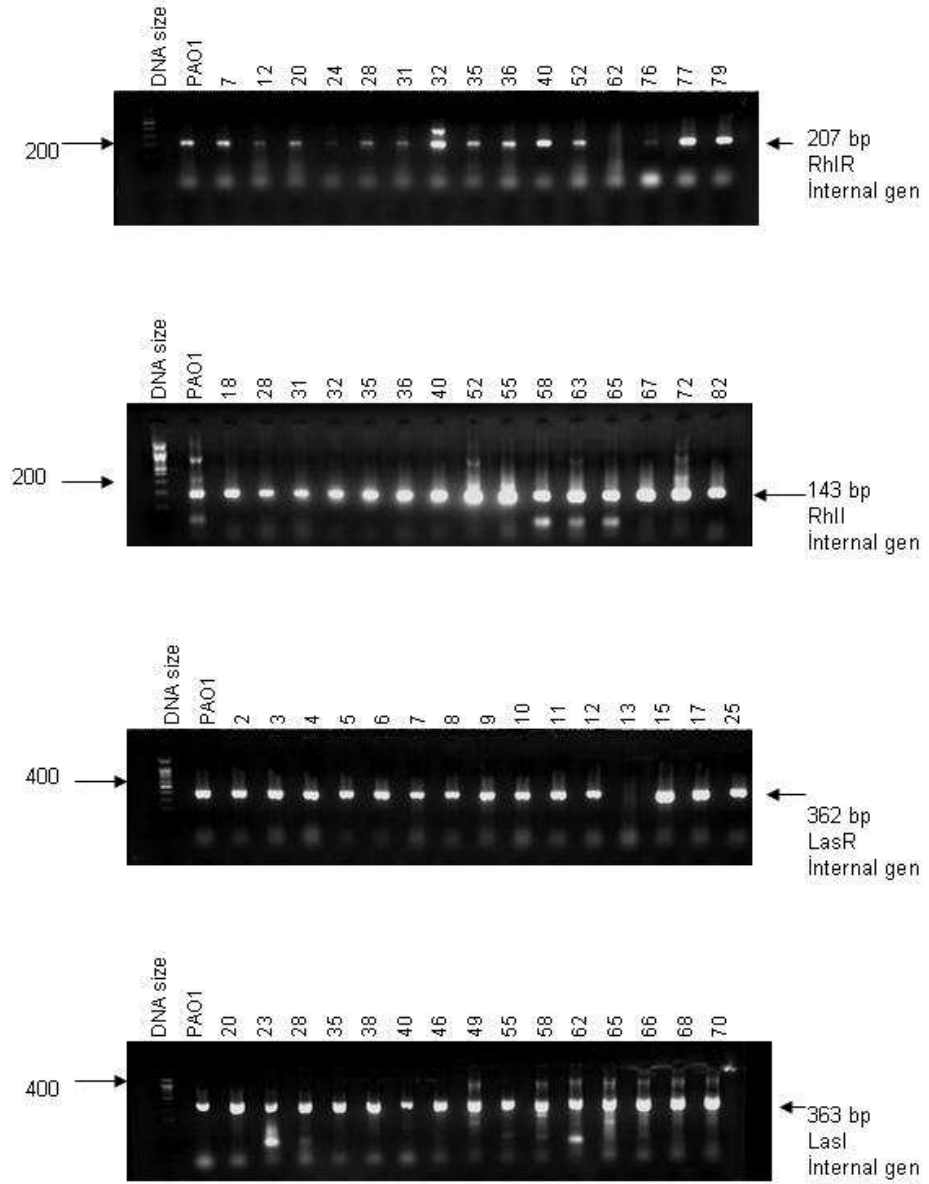
	lasI				lasR				RhlI				RhlR			
	intakt		internal		intakt		İnternal		intakt		internal		intakt		internal	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
QS(+) (n=43)	43	0	43	0	36	7	43	0	30	13	43	0	37	6	39	4
QS(-) (n=54)	54	0	54	0	45	9	53	1	38	16	54	0	42	12	49	5

intakt



Şekil-21. Etidium bromid ile boyanmış % 1 agaroz jelde amplifiye edilmiş intakt genler izlenmektedir.

internal



Şekil-22. Etidium bromid ile boyanmış % 1 agaroz jelde amplifiye edilmiş internal genler izlenmektedir.

TARTIŞMA

Bir fırsatçı enfeksiyon ajanı olan *P aeruginosa* hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen gram-negatif bakteriler arasındadır. Nozokomial pnömoni, üriner enfeksiyon, yara enfeksiyonları ve septisemiden sorumlu tutulmaktadır. Özellikle immun yetmezlikli hastalarda oluşturduğu fırsatçı enfeksiyonlar, antibiyotik direnci ve neden olduğu yüksek mortalite bu bakterinin daha yakından incelenmesini gerektirmiştir.

Hücrelerarası iletişim *P aeruginosa*'nın konakçı savunmasına karşı koymasında önemli rol oynamaktadır. Bakteri sayıca az iken sessiz kalarak konakçı savunma sistemlerini uyaracak özelliklerini gizlemekte, yeterli bakteri yoğunluğuna erişildiğinde ilgili genleri aktive ederek virulans faktörlerini üretmeye başlamaktadır (77). Böylece quorum sensing yoluyla tüm bakteri popülasyonunun bir koordinasyon içinde davranması sağlanmaktadır. *P aeruginosa*'da iki luxI/luxR homologu olan LasI/LasR – RhII/RhIR sistemi quorum sensingi düzenlemektedir. Yüksek hücre yoğunluğu ile ortamda quorum sensing otoindüceri olan homoserin lakton (3-OC12-HSL ve C4-HSL) yoğunluğunun yeterli düzeye çıkması sonucu sistem aktive olur. LasR HSL otoindüceri ile birleşerek bazı virulans faktörlerini kodlayan genlerde transkripsiyonu tetikler ve virülans faktörleri ekspresyonu başlar. Çalışmamızda kan, kateter, cerrahi yara gibi farklı lokalizasyonlardan izole edilen 97 suş ile elde edilen bulgular *P aeruginosa*'nın virulansla ilgili fenotipik özellikleri yönünden oldukça heterojen bir karakter sergilediğini göstermektedir.

İn vitro ortamda bakterinin quorum sensing yeteneklerinin araştırılmasında kullanılan en yaygın yöntem quorum sensing oto-indüceri olan homoserin lakton (HSL) oluşumunu cross-feeding testi ile incelenmesidir. Bu testte agara *P aeruginosa* ve *A tumefaciens* yan yana çizgi ekim yapılır. *P aeruginosa* HSL üretiyorsa ortama salınan HSL molekülleri agara difüze olur ve *A tumefaciens*'teki tra-I, lac-Z genlerini aktive eder. Aktivasyon sonucu şeffaf, saydam koloniler yapan *A tumefaciens* renk değişikliği ile mavi pigmentasyon oluşturur. Oluşan mavi renk HSL üretildiğini gösterir (78). *A tumefaciens* ile yapılan cross-feeding testinde mavi renk oluşumu HSL yapımı ve quorum sensing varlığının gösterilmesinde hassas bir göstergedir (79). Boşgelmez ve arkadaşlarının (80) yoğun bakımdan üretilen bakterilerle ilgili çalışmasında ortamda HSL miktarı düşük olduğunda bu testin negatif sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada üretilen 50 *P aeruginosa* suşunun 46'sının pozitif sonuç verdiği, 4 tanesinde HSL üretimi saptanmadığı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise suşların yarıya yakını quorum sensing oto-indüceri

olan ve quorum sensing göstergesi olarak kabul edilen homoserin lakton üretimi yaptığı görülmüştür. HSL üretimi gözlenmemesini sadece ilgili genetik materyaldeki defekt ile açıklanması yeterli olmamaktadır. Schaber ve arkadaşları (76, 81) yara, trakeal aspirat ve idrardan izole edilen 5 QS-deficient suş üzerinde yaptığı genetik analiz sonucunda HSL üretemeyen bu suşların sadece ikisinde *rhlR* ve *lasR* genlerinin bulunmadığını saptamışlardır . HSL üretimi yapılmamasının diğer olası nedenleri genetik materyalde henüz saptanamayan defektler veya bakterinin çevre koşullarını QS için uygun olarak değerlendirmemesi nedeniyle var olan genlerin aktifleşmemesi ile açıklanabilir. Bu konuda daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Quorum sensing ve biyofilm

P aeruginosa enfeksiyonlarının önemli bir özelliği biyofilm oluşumudur. Alginat ağırlıklı ekstrasellüler polisakkarit üretimi ile oluşturulan biyofilm içinde kolonize olan bakteri, fagositlerden, kompleman aktivitesinden ve antibiyotiklerden korunarak yaşamını sürdürme olanağı bulur (82). Quorum sensing ile biyofilm oluşumu arasında yakın ilişki ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Davies ve arkadaşlarının (83) yapmış olduğu bir çalışmada HSL-defektif mutant *P aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmin oldukça zayıf yapıda olduğu ve çok düşük konsantrasyonda sodyum dodesil sülfatın deterjan etkisine dayanamadığı, ortama HSL eklenmesi ile biyofilmin dayanıklılığının arttığını göstermişlerdir . Schaber de (76) quorum sensing yapamayan suşların daha zayıf biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Shrouf ve arkadaşları (62) ise quorum sensing'in biyofilm oluşumunu kontrol etmesinde ortamdaki karbon, azot gibi nutrisyonel elemanların konsantrasyonunun da önemli olduğunu göstermişlerdir. Klinik çalışmalarda da biyofilm ile quorum sensing arasındaki ilişkiyi gösteren veriler elde edilmiştir. Favre-Bonte ve arkadaşları (84) ventilatöre bağlı *Pseudomonas* pnömonisi gelişen entübe hastalarda entübasyon tüpü ve trakeal aspirattan üretilen suşları biyofilm ve HSL üretimi yönünden karşılaştırmışlar, entübasyon tüpünden üretilenlerin daha fazla biyofilm oluşturduğu ve daha yüksek HSL üretimi yaptıklarını göstermişlerdir. Bulguların yorumlanmasında entübasyon tüpünde üretilen bakteriler biyofilm yaparken trakeal aspirattan üretilen suşların daha çok planktonik formda kaldıkları ve bu nedenle biyofilm oluşturma ve HSL üretme yeteneklerinin buna paralel olduğu vurgulanmıştır. Hentzer ve arkadaşları (85) fare pulmoner enfeksiyon modeli ile yaptıkları bir çalışmada furanon bileşikleri ile quorum sensing inhibisyonu yapıldığında *P aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmin tobramisin penetrasyonuna karşı daha az dirençli olduğunu göstermişlerdir . Tüm bu

çalışmalar *P aeruginosa*'da quorum sensing'in diğer virulans faktörleri ile olduğu gibi biyofilm oluşumu ile de önemli ilişkisi olduğunu göstermektedir (86). Bizim çalışmamızda HSL üretimi düşük olan suşların biyofilm oluşturma yeteneği iki ayrı abiyotik yüzey (cam tüp ve polistren plate) kullanılarak değerlendirilmiş ve her ikisinde de HSL üretimi yüksek olan suşlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Quorum sensing ile biyofilm ilişkisini göstermesi açısından bulgularımız literatürle uyum göstermektedir. Bakterinin izole edildiği kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise trakeal aspirat ve yaradan üretilen suşlar kan ve kateterden üretilen suşlara göre daha az biyofilm oluşturmuşlardır. Bu sonuçların yorumlanmasında yukarıda geçen Favre-Bonte ve arkadaşlarının (84) yaptığı entübasyon tüpü ve trakeal aspiratın karşılaştırıldığı çalışma göz önüne alınırsa *P aeruginosa*'nın ortamın özelliklerini göz önüne alarak biyofilm oluşturma yeteneğini değiştirdiği ve oldukça karmaşık bir sistem olan biyofilm regülasyonunda gerekli değişikliği yaptığı düşünülebilir.

Quorum sensing ve motilite

P aeruginosa üç tip motilite göstermektedir. Sıvı ortamda flagella yardımı ile olan hareketi **swimming**, katı yüzeyde tip IV pili yardımı ile olan hareketi **twitching**, yarı katı ortamda her iki motilite tipinin kombinasyonu ve biyosurfaktan görevi yapan rhamnolipid yardımı ile olan hareketi ise **swarming** olarak adlandırılır. Bu motilite fonksiyonları bakterinin yüzeye yapışması ve kolonizasyonu için gereklidir (87). Quorum sensing ile motilite arasındaki düzenleyici ilişki daha önce de incelenmiştir. Reimmann ve arkadaşları (88) HSL blokajı yapılan *P aeruginosa* suşlarında swarming'in engellendiğini ancak swimming ve twitching'in gözlenmeye devam edildiğini ve bakterilerin kolonize olabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada HSL nin engellenmesi ile elastaz, pyosiyenin gibi virulans faktörleri yanında rhamnolipid sentezinin de azaldığı saptanmış, swarming'in bu nedenle gözlenmediği belirtilmiştir . Glessner ve arkadaşları (89) *lasI* ve *rhII* defektif suşların twitching yapmadığını göstermişlerdir. Buna karşılık Beatson ve arkadaşları (90) *lasI*, *rhII*, *lasR* ve *rhIR* defektif suşlarla yaptıkları çalışmada twitching'in etkilenmediğini göstermişlerdir. Deziel ve arkadaşları (91) ise *lasI* ve *rhII* mutant suşlarla yaptıkları çalışmada swimming ve twitching'in azaldığını bulmuşlardır. Bu çelişkili sonuçlar motiliteyi kontrol eden hiyerarşik mekanizmaların karmaşıklığı yanında çalışılan mutant suşların farklı koşullar altında diğer düzenleyici genler aracılığı ile kompensatuar mekanizmalar geliştirerek farklı davranışlar sergilediği şeklinde yorumlanmıştır (92).

Bizim çalışmamızda QS (+) olan suşlar her üç motilite tipinde de QS (-) olan suşlara göre anlamlı derecede daha fazla motilite gösterdiler. Aradaki farklılık swarming için daha az olmakla beraber tüm motilite şekillerinde anlamlı olarak farklı bulundu. Literatürde çelişkili sonuçlar olmakla beraber gözlemlerimiz Deziel (91) ve Glessner'in (89) bulgularına uyum göstermektedir.

Bakterinin izole edildiği kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise swimming için idrardan üretilen suşlar diğer örneklerden belirgin olarak daha fazla motilite gösterdiler. Trakeal aspirattan üretilen suşlar da sadece kana göre anlamlı olarak daha yüksek motilite değerine ulaştılar. Diğer örnekler arasındaki fark ise anlamlı bulunmadı. Swarming için yapılan karşılaştırmada sadece idrar örneği kateter örneğine göre daha fazla motiliteye sahip olarak gözlemlendi. Diğer örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadı. Twitching'e gelince yara örnekleri idrar, kan ve kateter örneklerine göre daha az twitching yaparken trakeal aspirat ile aralarında belirgin fark bulunmadı. Kateter ile trakeal aspirat arasındaki karşılaştırmada ise kateter lehine istatistiksel anlamlılık saptandı. Diğer örnekler arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Literatürde motilite karakterinin bakterinin izole edildiği kaynağa göre farklılık gösterip göstermediği ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bizim bulgularımızda gruplarda elde edilen ortalama değerlerin standart sapmasının yüksek olması farklılıkların istatistiksel anlamlılık düzeyine erişmesini engellemektedir. Bu sonuçlar *P aeruginosa*'nın motilite konusundaki davranışının oldukça heterojen olduğunu düşündürmektedir.

Piyosiyenin üretimi

Pyosiyenin *P aeruginosa*'nın bir sekonder metabolit olarak ortaya çıkardığı, mavi-yeşil renkli fenazin pigmentidir (93). Bakterinin oksijen uptake'inde ve demir iyonu alımında rol oynaması yanında sitotoksik özelliği ile de virulansa katkıda bulunur (94).

Piyosiyenin üretimi ile quorum sensing arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bir quorum sensing inhibitörü olan N-octanoyl cyclopentylamide (C8-CPA) kullanılarak yapılan bir çalışmada HSL üretimi yanında elastaz, rhamnolipid ve pyosiyenin gibi virulans faktörlerinin de engellendiği gösterilmiştir (95). Benzer şekilde Dietrich ve arkadaşları (96) pyosiyenin'in quorum sensing ile kontrol edilen genlerin regülasyonunda bir sinyal molekülü olarak görev aldığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda piyosiyenin üretimi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu. Daha önceki çalışmalarda pyosiyenin ile quorum sensing arasında

bağlantı saptanmış olmakla birlikte her iki komponentin de tam bağımsız olmayışı ve up-regulasyon ve down-regulasyonlarında çevresel koşullar ve diğer düzenleyici elemanlar gibi çok sayıda faktörün yer almasını göz önünde bulundurarak, sonuçlarımızın literatürle çelişmediğini ancak bakterinin ne kadar heterojen davranabildiğini gösterdiğini düşünmekteyiz. Schaber ve arkadaşlarının (76) beş adet QS-deficient izolat ile yaptıkları çalışmada da 4 tanesinde pyosiyenin üretimi düşük bulunmuşken bir tanesinde kontrol suşu olan PAO-1 ile yakın düzeyde bulunmuş olması bu çıkarımı desteklemektedir. Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise yara örnekleri diğer tüm örneklerden anlamlı olarak daha az piyosiyenin üretirken, kan örnekleri kateter ve TAS örneklerine göre anlamlı olarak daha fazla piyosiyenin oluşturdu. Diğer örnekler arasındaki farklılık ise anlamlı bulunmadı. Bu konuda yapılan benzer bir çalışmaya literatürde rastlayamadığımızdan sonuçları karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ancak *P. aeruginosa*'nın genel karakteristiği göz önüne alınırsa elde ettiğimiz sonuçlar yine bakterinin farklı çevresel koşullarda gösterdiği farklı fenotipik özellikler ile açıklanabilir.

Elastaz

Elastaz ile quorum sensing arasındaki ilişki pek çok çalışmanın konusu olmuştur. Pesci ve arkadaşları (97) *P. aeruginosa*'da las ve rhl sistemleri ile düzenlenen quinolone sinyal iletim yolunun elastaz üretimini kontrol ettiğini göstermişlerdir. Bunun yanında quorum sensing'in inhibisyonu ile elastaz üretiminin azaldığı gösterilmiştir (88, 98). Rashid ve arkadaşlarının (99) bir çalışmasında polyphosphate kinase (ppk) gen mutasyonu olan *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu, quorum sensing ve elastaz üretiminin azaldığı ve buna paralel olarak farelerde oluşturulan yanık modelinde enfeksiyon oluşturma kapasitelerinin de azaldığı gösterilmiştir. Buna karşılık elastaz ve quorum sensing arasındaki ilişkinin bu denli doğrusal olamayacağına ilişkin çalışmalar da vardır. Garske ve arkadaşları (100) tobramisin ve seftazidimin subMIC (minimum inhibitör konsantrasyonunun altında) dozlarında her ikisinin de *P. aeruginosa*'nın homoserin lakton üretimini belirgin bir şekilde azalttığını, ancak tobramisin elastaz üretimini azaltırken seftazidimin azaltmadığını göstermişler ve homoserin lakton'un elastaz üretiminde tek faktör olamayacağı sonucuna varmışlardır. Kontakt lens ve *P. aeruginosa* enfeksiyonu ile ilgili bir çalışmada da QS inhibitörü olan furanon bileşiklerinin normal ve QS-deficient suşlarda elastaz üretimi üzerine etkisi incelenmiş, furanon bileşikleriyle normal suşlarda elastaz üretiminin azaldığı, buna karşılık QS-

deficient suşlarda ise elastaz üretiminin arttığı bulunmuş, bu sonuçlar QS sisteminin karmaşıklığı ve *P. aeruginosa* suşlarının farklılığı ile açıklanmıştır (101).

Bizim çalışmamızda da elastaz üretimi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu. Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise sadece idrar örnekleri TAS ve yara örneklerinden ve kan örnekleri yara örneklerinden anlamlı olarak daha fazla elastaz üretirken, diğer örnekler arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı.

lasA

Çinko içeren ve stafilolitik özelliğe sahip bir metalloproteaz olan Las-A kendi elastolitik aktivitesi yanında elastaz ile sinerjistik olarak çalışır ve diğer proteinazların elastolitik etkisini artırır. lasA ile quorum sensing arasındaki ilişki uzun amandır bilinmektedir. RhIR ve RhII defektif mutantların diğer virulans faktörleri gibi lasA üretimlerinin de azaldığı gösterilmiştir (44). Ancak bu ilişkinin daha detaylı incelendiği çalışmalarda quorum sensing ile lasA arasındaki ilişkinin oldukça karmaşık olduğu görülmüştür. Schuster ve arkadaşları (102) yaptıkları çalışmada quorum sensing aracılığıyla virulansla ilgili en az 300 genin kontrol edildiğini, bunlardan elastaz reseptör protein düzeyinde doğrudan kontrol edilirken, lasA'nın kontrolünde RhIR ve RhII sistemi yanında diğer transkripsiyon faktörlerinin de rol oynadığı, hatta post-transkripsiyonel düzeyde ko-regülasyonunun yapıldığı, bu karmaşık kontrol mekanizması ile oluşan çoklu sinyal yollarının bakteriye çevresel faktörlere daha fazla uyum yeteneği kazandırdığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da LasA aktivitesi QS (+) ve (-) olan örneklerde birbirine yakın değerlerde bulundu. Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise yine gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. Elde ettiğimiz sonuçlarda ortalama değerlerin standart sapmasının yüksek olması bu sonucu elde etmemizde rol oynamaktadır. Standart sapmanın bu denli yüksek olması da bakterinin heterojen davranışı ile açıklanabilir.

RhIR, RhII, LasI ve LasR

Örneklerin kromozomal DNA'sı ekstrakte edildikten sonra *LasI*, *lasR*, *RhII* ve *RhIR* genleri için hem intakt gen hem de internal gen ait oligonükleotid primerler kullanılarak PCR yapıldı. QS (+) ve QS- olan tüm örneklerde *LasI* intakt geni ve internal geni sentezlenirken *lasR*, *RhII* ve *RhIR* intakt ve internal genleri QS (+) ve QS- suşlarda farklı sayılarda izlendi. Bazı suşlarda intakt gen sentezlenirken internal genin sentezlenemediği,

bazı suşlarda ise tam tersine intakt gene rastlanamazken internal genin sentezlendiği görüldü.

Cabrol ve arkadaşlarının (103) 66 adet suş ile yaptıkları bir çalışmada sadece lasR araştırılmış, suşların 54 ünde lasR geni bulunurken, diğerlerinde sentezlenememiş, bu suşların incelenmesinde de 9 tanesinde nükleotid değişikliği, 3 tanesinde de insersiyon sıra değişikliği olduğu ve bu nedenle PCR de görüntülenemediği sonucuna varılmıştır.

İntakt gen ve internal fragman sentezlenmesi ile ilgili bulgularımıza benzer çelişkili sonuçlar Schaber ve arkadaşlarının (76) QS-deficient 5 adet suş üzerinde yaptıkları çalışmada da saptanmıştır. Bu çalışmada intakt rhlR geni 2 suшта saptanmış, 3 suшта saptanamamış, internal fragman ise 3 suшта saptanırken 2 suшта saptanamamıştır, yani 5 suşun birinde intakt gen olduğu halde internal fragman saptanamazken, bir suшта da intakt gen sentezlenemediği halde internal fragman sentezlenmiştir. Bulgulardaki bu çelişkili görünüm bu suşların gende region içinde değişiklik taşıyabilecekleri ve bunun da PCR sırasında primer ile hibridizasyonu engelleyebileceği ile açıklanmıştır. Bilindiği gibi ökaryot hücrelerde protein sentezinden sorumlu gen kendi içinde **intron** ve **exon** denilen internal fragmanlardan oluşmakta olup **exon** üretilen proteinden sorumlu iken **intron** mRNA sentezi sonrası zincirden ayrılır ve fonksiyonu henüz bilinmemektedir. Prokaryot hücrelerde ise intron son derecede seyrek bulunur ve genetik materyal tek uzun bir DNA iplikçisi üzerinde kodlanır. Bu DNA iplikçisi üzerinde de **operon** adı verilen ve kodlanan proteinin sentezini düzenleyen **promoter** ve **operator** olarak adlandırılan internal fragmanlar bulunmaktadır. Gerek Cabrol (103) gerekse Schaber ve arkadaşları (81) bulgularını *P.aeruginosa*'nın bir özelliği olan genomik diversite nedeniyle genetik materyalde internal fragmanın farklı yerlerde yerleşmiş olabileceğini, bu nedenle bazı suşlarda intakt gen sentezlenirken internal fragmanın sentezlenemediğini, bazı suşlarda ise tam tersi olduğunu bildirmişlerdir. Yu ve Head (104) da kistik fibrozlu fare modelinde *P.aeruginosa* suşları ile yaptıkları bir çalışmada genomik çeşitlilik özelliğini incelemişler, bu bakteride sık yaşanan horizontal gen transferi sonucu oluşan gen değişimine bağlı olarak genetik materyalde fragman polimorfizmi olduğunu bildirmişlerdir. Literatürde hem intakt gen hem de internal fragman ile yapılan Schaber'inkinden başka çalışma bulunamadığından bu düşüncüyü destekleyecek ek kanıt rastlanamamıştır. Bizim bulgularımızda da benzeri sonuçların elde edilmiş olması genomik diversity ile açıklanabilir ancak konunun daha detaylı irdelenmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

P aeruginosa'nın sahip olduğu çok sayıda virulans faktörü ve bu faktörlerin ortam ve koşullara göre farklı düzeylerde ekspresyonu bu bakterinin oluşturduğu enfeksiyonların ve dolayısı ile de tedavi yaklaşımının oldukça karmaşık olmasına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar ve bizim sonuçlarımız bakterinin kendi arasında kurduğu iletişim sistemi ve biyofilm oluşumunun tüm virulans faktörleri arasında anahtar rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte *P aeruginosa* içinde bulunduğu ortam, çevresel koşullar, besin kaynakları, konakçı savunması gibi değişkenler karşısında farklı yanıtlar geliştirmekte bu da farklı virulans faktörlerinin farklı düzeylerde ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Buna *P aeruginosa*'nın iyi bilinen bir özelliği olan genomik değişkenlik eklendiğinde bakterinin davranışı da çeşitlilik göstermektedir. Bizim çalışmamızda incelediğimiz klinik örneklerden elde edilmiş 97 suşun fenotipik davranışlarındaki çeşitlilik bu bulguları desteklemektedir. *P aeruginosa* sahip olduğu özellikleri ile her olguda farklı şekilde karşımıza çıkabilmekte, doğru tedavi stratejisinin belirlenmesinde zorluklara ve halen var olan tedavi seçeneklerinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu açıdan bakıldığında *P aeruginosa* virulans faktörlerinin hangi mekanizmalarla düzenlendiği ile ilgili bilgilerimizin artması tedavi başarısını olumlu yönde etkileyecektir. Sonuçlarımız bakterinin kendi arasında kurduğu iletişim sistemi ve biyofilm oluşumunun tüm virulans faktörleri arasında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte incelediğimiz 97 suşun fenotipik davranışlarındaki çeşitlilik *P aeruginosa* farklı davranışlar geliştirme özelliğini vurgulamaktadır. *P aeruginosa* virulans faktörlerinin hangi mekanizmalarla düzenlendiği ile ilgili daha ileri çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. MAH TF, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9 (1):34-39, 2001.
2. ROSSOLINI GM, MANTENGOLI E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 11 Suppl 4:17-32, 2005.
3. MESAROS N, NORDMANN P, PLESIAT P, ROUSSEL-DELVALLEZ M, VAN ELDERE J, GLUPCZYNSKI Y, VAN LAETHEM Y, JACOBS F, LEBECQUE P, MALFROOT A. *Pseudomonas aeruginosa*. resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, 13 (6):560-578, 2007.
4. HILBI H, WEBER SS, RAGAZ C, NYFELER Y, URWYLER S. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol*, 9 (3):563-575, 2007.
5. DRISCOLL JA, BRODY SL, KOLLEF MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007, 67 (3):351-368.
6. PEABODY CR, CHUNG YJ, YEN MR, VIDAL-INGIGLIARDI D, PUGSLEY AP, SAIER MH, JR.. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149 (Pt 11):3051-3072, 2003.
7. PALLERONI NJ. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*. a personal view. *Microbiology*, 149 (Pt 1):1-7, 2003.
8. DERETIC V, SCHURR MJ, YU H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol*, 3 (9):351-356, 1995.
9. MEYER JM. Pyoverdines. pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, 174 (3):135-142, 2000.
10. STEIN GE. Antimicrobial resistance in the hospital setting. impact, trends, and infection control measures. *Pharmacotherapy*, 25 (10 Pt 2):44S-54S, 2005.
11. WOODFORD N, ELLINGTON MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect*, 13 (1):5-18, 2007.
12. CHILLER K, SELKIN BA, MURAKAWA GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, (3):170-174, 2006.
13. CHAN J, HADLEY J. The microbiology of chronic rhinosinusitis. results of a community surveillance study. *Ear Nose Throat J*, 80 (3):143-145, 2001.
14. SHANNON KP, FRENCH GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother*, 53 (5):818-825, 2004.
15. SASAKI M, HIYAMA E, TAKESUE Y, KODAIRA M, SUEDA T, YOKOYAMA T. Clinical surveillance of surgical imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. *J Hosp Infect*, 56 (2):111-118, 2004.
16. MICEK ST, KOLLEF KE, REICHLEY RM, ROUBINIAN N, KOLLEF MH. Health care-associated pneumonia and community-acquired pneumonia. a single-center experience. *Antimicrob Agents Chemother*, 51 (10):3568-3573, 2007.
17. ESEL D, DOGANAY M, ALP E, SUMERKAN B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital. epidemiology, microbiology and patient outcome. *Clin Microbiol Infect*, 9 (10):1038-1044, 2003.

18. BJARNSHOLT T, GIVSKOV M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*, 387 (2):409-414, 2007.
19. WOODS DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*, 12 (10):437-439, 2004.
20. PIER GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*, 297 (5):277-295, 2007.
21. SITKIEWICZ I, STOCKBAUER KE, MUSSER JM. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes. better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol*, 15 (2):63-69, 2007.
22. RUMBAUGH KP, GRISWOLD JA, IGLEWSKI BH, HAMOOD AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun*, 67 (11):5854-5862, 1999.
23. VON GOTZ F, HAUSSLER S, JORDAN D, SARAVANAMUTHU SS, WEHMHONER D, STRUSSMANN A, LAUBER J, ATTREE I, BUER J, TUMMLER B. 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*, 186 (12):3837-3847, 2004.
24. WU LR, ZABORINA O, ZABORIN A, CHANG EB, MUSCH M, HOLBROOK C, TURNER JR, ALVERDY JC. Surgical injury and metabolic stress enhance the virulence of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Surg Infect (Larchmt)*, 6 (2):185-195, 2005.
25. SMEDLEY JG, 3RD, JEWELL E, ROGUSKIE J, HORZEMPA J, SYBOLDT A, STOLZ DB, CASTRIC P. Influence of pilin glycosylation on *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilus function. *Infect Immun*, 73 (12):7922-7931, 2005.
26. SCHROEDER TH, ZAIDI T, PIER GB. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM (1) on epithelial cells. *Infect Immun*, 69 (2):719-729, 2001.
27. SCHARFMAN A, ARORA SK, DELMOTTE P, VAN BRUSSEL E, MAZURIER J, RAMPHAL R, ROUSSEL P. Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 69 (9):5243-5248, 2001.
28. YAGCI A, YAGCI T, SENER B, SUZIKI Y, AHMED K. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. *New Microbiol*, 30 (2):167-171, 2007.
29. ADAMO R, SOKOL S, SOONG G, GOMEZ MI, PRINCE A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30 (5):627-634, 2004.
30. RYDER C, BYRD M, WOZNIAK DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*, 10 (6):644-648, 2007.
31. JAIN S, OHMAN DE. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 73 (10):6429-6436, 2005.
32. LAGOUMINTZIS G, CHRISTOFIDOU M, DIMITRACOPOULOS G, PALIOGIANNI F. *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect Immun*, 71 (8):4614-4622, 2003.

33. YING QL, KEMME M, SIMON SR. Alginate, the slime exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*, binds human leukocyte elastase, retards inhibition by alpha 1-proteinase inhibitor, and accelerates inhibition by secretory leukoprotease inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15 (2):283-291, 1996.
34. RAMSEY DM, WOZNIAK DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*, 56 (2):309-322, 2005.
35. POLLACK M, KOLES NL, PRESTON MJ, BROWN BJ, PIER GB. Functional properties of isotype-switched immunoglobulin M (IgM) and IgG monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 63 (11):4481-4488, 1995.
36. TINGPEJ P, SMITH L, ROSE B, ZHU H, CONIBEAR T, AL NASSAFI K, MANOS J, ELKINS M, BYE P, WILLCOX M. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 45 (6):1697-1704, 2007.
37. ALCORN JF, WRIGHT JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*, 279 (29):30871-30879, 2004.
38. MAEDA H, OKAMOTO T, AKAIKE T. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem*, 379 (2):193-200, 1998.
39. DELCLAUX C, REZAIGUIA-DELCLAUX S, DELACOURT C, BRUN-BUISSON C, LAFUMA C, HARF A. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol*, 273 (1 Pt 1):L104-112, 1997.
40. WIENER-KRONISH JP, SAKUMA T, KUDOH I, PITTET JF, FRANK D, DOBBS L, VASIL ML, MATTHAY MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol*, 75 (4):1661-1669, 1993.
41. HAMOOD AN, GRISWOLD J, COLMER J. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 64 (8):3154-3160, 1996.
42. JAFFAR-BANDJEE MC, LAZDUNSKI A, BALLY M, CARRERE J, CHAZALETTE JP, GALABERT C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 33 (4):924-929, 1995.
43. GRANDE KK, GUSTIN JK, KESSLER E, OHMAN DE. Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. *J Bacteriol*, 189 (11):3960-3968, 2007.
44. BRINT JM, OHMAN DE. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol*, 177 (24):7155-7163, 1995.
45. COWELL BA, TWINING SS, HOBDEN JA, KWONG MS, FLEISZIG SM. Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology*, 149 (Pt 8):2291-2299, 2003.
46. KASSIM SY, GHARIB SA, MECHAM BH, BIRKLAND TP, PARKS WC, MCGUIRE JK. Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in airway epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 75 (12):5640-5650, 2007.

47. VANCE RE, RIETSCH A, MEKALANOS JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun*, 73 (3):1706-1713, 2005.
48. ROCHA CL, COBURN J, RUCKS EA, OLSON JC. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun*, 71 (9):5296-5305, 2003.
49. MAVRODI DV, BONSALE RF, DELANEY SM, SOULE MJ, PHILLIPS G, THOMASHOW LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 183 (21):6454-6465, 2001.
50. BRITIGAN BE, RAILSBACK MA, COX CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor. implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun*, 67 (3):1207-1212, 1999.
51. BUCKLING A, HARRISON F, VOS M, BROCKHURST MA, GARDNER A, WEST SA, GRIFFIN A. Siderophore-mediated cooperation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Ecol*, 62 (2):135-141, 2007.
52. VASIL ML, OCHSNER UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron. genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*, 34 (3):399-413, 1999.
53. LAU GW, RAN H, KONG F, HASSETT DJ, MAVRODI D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*, 72 (7):4275-4278, 2004.
54. DENNING GM, WOLLENWEBER LA, RAILSBACK MA, COX CD, STOLL LL, BRITIGAN BE. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*, 66 (12):5777-5784, 1998.
55. TOUTAIN CM, ZEGANS ME, O'TOOLE GA. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187 (2):771-777, 2005.
56. RASHID MH, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (9):4885-4890, 2000.
57. KLAUSEN M, HEYDORN A, RAGAS P, LAMBERTSEN L, AAES-JORGENSEN A, MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*, 48 (6):1511-1524, 2003.
58. DOYLE TB, HAWKINS AC, MCCARTER LL. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 186 (19):6341-6350, 2004.
59. PATRIQUIN GM, BANIN E, GILMOUR C, TUCHMAN R, GREENBERG EP, POOLE K. Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189 (22):8357-8360, 2007.
60. MATTICK JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56:289-314, 2002.
61. HUANG B, RU K, YUAN Z, WHITCHURCH CB, MATTICK JS. tonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J Bacteriol*, 186 (13):4387-4389, 2004.
62. SHROUT JD, CHOPP DL, JUST CL, HENTZER M, GIVSKOV M, PARSEK MR. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol*, 62 (5):1264-1277, 2006.

63. KOHLER T, CURTY LK, BARJA F, VAN DELDEN C, PECHERE JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, 182 (21):5990-5996, 2000.
64. HEURLIER K, WILLIAMS F, HEEB S, DORMOND C, PESSI G, SINGER D, CAMARA M, WILLIAMS P, HAAS D. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 186 (10):2936-2945, 2004.
65. WALKER TS, TOMLIN KL, WORTHEN GS, POCH KR, LIEBER JG, SAAVEDRA MT, FESSLER MB, MALCOLM KC, VASIL ML, NICK JA. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun*, 73 (6):3693-3701, 2005.
66. MOSKOWITZ SM, FOSTER JM, EMERSON J, BURNS JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 42 (5):1915-1922, 2004.
67. SAKURAGI Y, KOLTER R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 189 (14):5383-5386, 2007.
68. KUJUNDZIC E, FONSECA AC, EVANS EA, PETERSON M, GREENBERG AR, HERNANDEZ M. Ultrasonic monitoring of early-stage biofilm growth on polymeric surfaces. *J Microbiol Methods*, 68 (3):458-467, 2007.
69. O'TOOLE GA. To build a biofilm. *J Bacteriol*, 185 (9):2687-2689, 2003.
70. HEAD NE, YU H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect Immun*, 72 (1):133-144, 2004.
71. KIRISITS MJ, MARGOLIS JJ, PUREVDORJ-GAGE BL, VAUGHAN B, CHOPP DL, STOODLEY P, PARSEK MR. Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*, 189 (22):8357-8360, 2007.
72. CHIANG P, BURROWS LL. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185 (7):2374-2378, 2003.
73. SAUER K, CAMPER AK, EHRLICH GD, COSTERTON JW, DAVIES DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*, 184 (4):1140-1154, 2002.
74. STEWART PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*, 185 (5):1485-1491, 2003.
75. HILL D, ROSE B, PAJKOS A, ROBINSON M, BYE P, BELL S, ELKINS M, THOMPSON B, MACLEOD C, AARON SD. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol*, 43 (10):5085-5090, 2005.
76. SCHABER JA, CARTY NL, MCDONALD NA, GRAHAM ED, CHELUVAPPA R, GRISWOLD JA, HAMOOD AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 53 (Pt 9):841-853, 2004.
77. WU L, ESTRADA O, ZABORINA O, BAINS M, SHEN L, KOHLER JE, PATEL N, MUSCH MW, CHANG EB, FU YX. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 309 (5735):774-777, 2005.
78. DONG W, LUO F, DU Y, BAI X, LI X. Production and properties of an inhibitor of the *Pseudomonas* autoinducer by *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 51 (9):783-789, 2005.
79. MCLEAN RJ, PIERSON LS, FUQUA C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods*, 58 (3):351-360, 2004.

80. BOSGELMEZ-TINAZ G, ULUSOY S, ARIDOGAN B, EROGLU F, KAYA S. N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiol Res*, 160 (4):399-403, 2005.
81. SCHABER JA, HAMMOND A, CARTY NL, WILLIAMS SC, COLMER-HAMOOD JA, BURROWES BH, DHEVAN V, GRISWOLD JA, HAMOOD AN. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 56 (Pt 6):738-748, 2007.
82. GOVAN JR, DERETIC V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis. mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 60 (3):539-574, 1996.
83. DAVIES DG, PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280 (5361):295-298, 1998.
84. FAVRE-BONTE S, CHAMOT E, KOHLER T, ROMAND JA, VAN DELDEN C. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiol*, 7(15):33-42, 2007.
85. HENTZER M, WU H, ANDERSEN JB, RIEDEL K, RASMUSSEN TB, BAGGE N, KUMAR N, SCHEMBRI MA, SONG Z, KRISTOFFERSEN P. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J*, 22 (15):3803-3815, 2003.
86. KIRISITS MJ, PARSEK MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol*, 8 (12):1841-1849, 2006.
87. O'TOOLE GA, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 30 (2):295-304, 1998.
88. REIMMANN C, GINET N, MICHEL L, KEEL C, MICHAUX P, KRISHNAPILLAI V, ZALA M, HEURLIER K, TRIANDAFILLU K, HARMS H. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 148 (Pt 4):923-932, 2002.
89. GLESSNER A, SMITH RS, IGLEWSKI BH, ROBINSON JB. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol*, 181 (5):1623-1629, 1999.
90. BEATSON SA, WHITCHURCH CB, SEMMLER AB, MATTICK JS. Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184 (13):3598-3604, 2002.
91. DEZIEL 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*, 183 (4):1195-1204, 2001.
92. BEATSON SA, WHITCHURCH CB, SARGENT JL, LEVESQUE RC, MATTICK JS. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184 (13):3605-3613, 2002.
93. PARSONS JF, GREENHAGEN BT, SHI K, CALABRESE K, ROBINSON H, LADNER JE. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 46 (7):1821-1828, 2007.
94. ALLEN L, DOCKRELL DH, PATTERY T, LEE DG, CORNELIS P, HELLEWELL PG, WHYTE MK. Pyocyanin production by *Pseudomonas*

- aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol*, 174 (6):3643-3649, 2005.
95. ISHIDA T, IKEDA T, TAKIGUCHI N, KURODA A, OHTAKE H, KATO J. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Appl Environ Microbiol*, 73 (10):3183-3188, 2007.
 96. DIETRICH LE, PRICE-WHELAN A, PETERSEN A, WHITELEY M, NEWMAN DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 61 (5):1308-1321, 2006.
 97. PESCI EC, MILBANK JB, PEARSON JP, MCKNIGHT S, KENDE AS, GREENBERG EP, IGLEWSKI BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20):11229-11234, 1999.
 98. PECHERE JC. Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing. *Jpn J Antibiot*, 54 Suppl C:87-89, 2001.
 99. RASHID MH, RUMBAUGH K, PASSADOR L, DAVIES DG, HAMOOD AN, IGLEWSKI BH, KORNBERG A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (17):9636-9641, 2000.
 100. GARSKE LA, BEATSON SA, LEECH AJ, WALSH SL, BELL SC. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathology*, 36 (6):571-575, 2004.
 101. GEORGE M, PIERCE G, GABRIEL M, MORRIS C, AHEARN D. Effects of quorum sensing molecules of *Pseudomonas aeruginosa* on organism growth, elastase B production, and primary adhesion to hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens*, 31 (2):54-61, 2005.
 102. SCHUSTER M, GREENBERG EP. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, 8:287, 2007.
 103. CABROL S, OLLIVER A, PIER GB, ANDREMONT A, RUIMY R. Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185 (24):7222-7230, 2003.
 104. YU H, HEAD NE. Persistent infections and immunity in cystic fibrosis. *Front Biosci*, 7:442-457, 2002.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi'nde doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Okan Töre'ye, eğitimim süresince ve tezimin oluşumunda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na, Prof. Dr. Güher Görál'a, Prof. Dr. Safiye Helvacı'ya, Prof. Dr. Reřit Mıstık'a, Prof. Dr. Beyza Ener'e, Prof. Dr. Halis Akalın'a, Doç. Dr. Barbaros Oral'a, Doç. Dr. Cüneyt Özakın'a, Doç. Dr. Emel Yılmaz'a, Yrd. Doç. Dr. Melda Sınırtaş'a, Yrd. Doç. Dr. Yasemin Heper'e, Yrd. Doç. Dr. Oktay Alver'e, Uzm. Dr. Sevim Akçađlar'a, Arş.gör. Dr. Canan Evcı'ye, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın diğer tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca bana her konuda destek olan eşim ve aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Polatlı'da tamamladım. Tıp eğitimimi 1985-1992 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde aldım. Mecburi hizmetimi 1993-1995 yılları arasında Adıyaman Besni ilçesinde yaptım. 1995-1997 yılları arasında Şanlıurfa'da sağlık ocağı hekimliği yaptım. 1997 de bir yıl süre ile A.B.D de kalarak dil eğitimi aldım. 1998 yılında Polatlı Yassihöyük sağlık ocağında , 1999-2002 yıllarında Şanlıurfa Ana-Çocuk Sağlığı merkezinde çalıştım. 2002-2003 yıllarında Hatay Antakya'da sağlık ocağında çalıştım. 2003 yılından bu yana Bursa İl Sağlık Müdürlüğü Acil Sağlık Hizmetleri 112 Komuta merkezinde çalışmaktayım. 2003 Bahar döneminde Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda başladığım Mikrobiyoloji Doktora eğitimimi 2003 Güz döneminden bu yana Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda devam ettirmekteyim.