

**HASTANE KÖKENLİ *Pseudomonas aeruginosa*
SUŞLARININ VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN
QUORUM SENSİNG YÖNÜNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE
EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Ceren YAVUZ

Eskişehir 2018

**HASTANE KÖKENLİ *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARININ VİRÜLANS
FAKTÖRLERİNİN QUORUM SENSİNG YÖNÜNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ**

Ceren YAVUZ

DOKTORA TEZİ

**Doktora Programı/Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS
(İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuba YILDIRIM)**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2018**

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1403F090 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ceren Yavuz'un "Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin quorum sensing yönünden değerlendirilmesi ve epitel hücrelerindeki etkileri" başlıklı tezi 05/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora yeterlilik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Hülya SİVAS	
Üye	: Prof. Dr. Hayrettin TÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Semra İLHAN	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	
Üye	: Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU	

:

Prof. Dr. Ersin YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

HASTANE KÖKENLİ *Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARININ VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN QUORUM SENSİNG YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ VE EPİTEL HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

Ceren YAVUZ

Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS
(İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuba YILDIRIM)

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Sahip olduğu quorum sensing (QS) mekanizması ve virülans faktörleri epitel doku hasarı yaparak sistemik enfeksiyonlara neden olur. Bu çalışmada, seftazidim dirençli klinik izolatların virülans faktörleri QS yönünden değerlendirilerek epitel hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Hastane örneklerinden 100 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemiyle, virülans faktörleri ise biyofilm, slime faktör, homoserin lakton oluşumu, piyosiyanın, elastaz ve proteaz üretimi bakımından fenotipik testlerle analiz edilmiştir. Virülans faktörlerin düzenlenmesinde yardımcı olan QS genlerinin (intakt ve internal *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR*) varlığı PZR yöntemiyle gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden 3-oxo-C₁₂-HSL'nin sitotoksik etkisi MTT ile, *Cox-2* ve *IL-8*'in ifadesi üzerine etkisi gerçek zamanlı PZR ve Western Blot yöntemi ile hTERT-HPNE hücrelerinde araştırılmıştır.

İzolatların servislere göre dağılımı incelendiğinde, birinci sırada %38 ile yoğun bakım üniteleri tespit edilmiştir. Hastane servisleri ile antibiyotik dirençliliği arasında anlamlı fark bulunmuştur (p<0,05). İzolatların %76'sında Biyofilm, %57'sinde slime faktör, %51'inde homoserin lakton oluşturduğu, %65'inde piyosiyanın, %66'sında elastaz ve %88'inde proteaz ürettiği ve hareketli olduğu bulunmuştur. QS analizinde; *las* sistemi için *lasI* geni %96 intakt, %95 internal ve *lasR* geni %91 intakt, %95 internal, *rhl* sistemi için *rhlI* geni %91 intakt, %90 internal ve *rhlR* geni %80 intakt, %90 internal olarak bulunmuştur. hTERT-HPNE hücrelerinde, N-3-oxododecanoly-L-homoserin lakton'un (3-oxo-C₁₂-HSL) sitotoksik olduğu (IC₅₀ 75 µM) belirlenmiştir. 3-oxo-C₁₂-HSL, *Cox-2* mRNA seviyesini 2-5 kat, *IL-8* mRNA seviyesini 1,5-2 kat arttırmıştır. *Cox-2* ve *IL-8* protein seviyeleri de artmıştır.

Sonuç olarak; bu çalışma klinik izolatların, antibiyotik direnç profilinin ve virülans faktör seviyelerinin yüksek olduğunu ayrıca hTERT-HPNE hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini arttırdığını göstermektedir. Bu çalışma pankreasta *P. aeruginosa*'nın kolonizasyon oluşturarak inflamasyona neden olabileceğini göstermekte ve bunun önüne geçilebilecek hedef ilaçların geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, Virülans faktörler, hTERT-HPNE, Gerçek zamanlı PZR, Western Blot.

ABSTRACT

EVALUATION OF VIRULENCE FACTORS OF HOSPITAL-ACQUIRED *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS FOR QUORUM SENSING AND THEIR EFFECTS ON EPITHEL CELLS

Ceren YAVUZ

Department of Biology
Program in Molecular Biology
Anadolu University, Graduate School of Sciences, January 2018

Supervisor: Prof. Dr. Hülya SIVAS
(Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tuba YILDIRIM)

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is an important cause of morbidity and mortality in individuals with suppressed immunity system. The quorum sensing (QS) mechanism and virulence factors which it possesses produce epithelial tissue damage, causing systemic infections. In this study, virulence factors of clinic isolates resistant to ceftazidime were evaluated in terms of QS and their effects on epithelial cells were investigated.

Antibiotic susceptibility of 100 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to ceftazidime among hospital samples were analyzed with the disk diffusion and the microdilution method, and their virulence factors were analyzed with phenotypic tests in terms of formation of biofilm, slime factor, homoserin lactone existence, and production of pyocyanin, elastase and protease. The existence of QS genes (intact and internal *lasI*, *lasR*, *rhlI* and *rhlR*) that involved in the regulation of virulence factors was shown with PCR method. Effects of N-3-oxododecanoly-L-homoserin lakton (3-oxo-C₁₂-HSL) which is one of the virulence factor of *P. aeruginosa*, on the cytotoxicity and *Cox-2* and *IL-8* expression were investigated by the MTT, real time PCR and Western Blotting method in hTERT-HPNE cells.

Intensive care units were found to be at the first rank with 38%, when the distribution of the isolates was evaluated according to hospital services. A significant difference was found between hospital services and antibiotic resistance ($p < 0.05$). It was found that 76% of isolates formed biofilm, 57% slime factor and 51% homoserin lactone, 65% of isolates produced pyocyanin, 66% elastase, and 88% protease and they were found to be mobile. In QS analysis, *lasI* gene was found to be 96% intact and 95% internal and *lasR* gene was found to be 91% intact 95% internal for las system; *rhlI* gene was found to be 91% intact 90% internal and *rhlR* gene was found to be 80% intact and 90% internal for rhl system. 3-oxo-C₁₂-HSL was determined to be cytotoxic on hTERT-HPNE cells (IC₅₀ 75 μ M). 3-oxo-C₁₂-HSL increased the mRNA level by 2-5 fold and *IL-8* mRNA level by 1.5-2 fold. *Cox-2* and *IL-8* proteins were also increased.

Consequently, this study shows that the antibiotic resistance profile and virulence factor levels of clinical isolates were high and also they increase the levels of proinflammatory cytokines in hTERT-HPNE cells. This study shows that *P. aeruginosa* in the pancreas causes colonization and induces inflammation, and emphasizes the importance of developing targeted drugs to prevent this inflammation.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Virulence factors, hTERT-HPNE, Real Time PCR, Western Blotting.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca benden sevgi, destek ve ilgisi esirgemeyen gerek bilgi ve tecrübeleriyle gerekse güler yüzüyle tez konumun belirlenmesi ve araştırma projesinin yazılmasından tez aşamasına kadar her konuda yardımcı olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hülya SİVAS hocama sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yardımcı olan, ikinci danışmanım Doç. Dr. Tuba YILDIRIM hocama teşekkür ederim.

Tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Hayrettin TÜRK ve Doç. Dr. Emel ERGENE hocalarıma ve ayrıca değerli vaktini ayırarak sunumlarımda bulunan Doç. Dr. M. Burçin MUTLU hocama katkı ve önerilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimde aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Amasya üniversitesi Dekanı Prof. Dr. Mehmet Fatih KÖKSAL ve biyoloji bölüm başkanı Prof. Dr. Vahit KONAR'a teşekkür ederim. Bilgi, tecrübe ve güler yüzüyle bana yardımcı olan Amasya Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Birsen AYDIN ve Doç. Dr. D. Duygu KILIÇ hocalarıma teşekkür ederim.

Her konuda bilgi, tecrübe ve manevi desteğini benden esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Belgin SIRIKEN hocama her zaman bana içtenlikle cevap verdiği için ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Bakterilerin temininde yardımcı olan Uzm. Dr. Melek Bilgin'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Amasya üniversitesi, Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı imkanlarını kullanımına sunduğu için Doç. Dr. Tuba YILDIRIM ve Doç. Dr. Melek Gül hocalarıma teşekkür ederim.

Deney aşamalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Sevgi MARAKLI, Arş. Gör. Oğuzhan KARAOSMANOĞLU, Arş. Gör. Burak BERBER'e ve özellikle son üç ayda hayatıma girerek zor deney aşamalarında geç vakitlere kadar çalıştığımız Duygu ABBASOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bendeki yeri kelimelere sığmayacak kadar büyük olan canım dedem Hacı Burhan ŞAHİN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Sadece mutlu anlarımda değil aynı zamanda en stresli anlarımda da bana hep destek olan ve güvenen Ahmet BAŞKAN'a ayrıca sonsuz teşekkür ederim.

Ceren YAVUZ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ceren YAVUZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Tarihçesi	4
2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Morfolojik ve Mikrobiyolojik Özellikleri	5
2.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Biyokimyasal Özellikleri.....	6
2.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Epidemiyolojik Özellikleri	6
2.5. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Patojenezi	8
2.5.1. Patojenez oluşumunda <i>P. aeruginosa</i> 'ya ait virülans faktörler.....	8
2.5.1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın hücre yüzeyine ait virülans faktörleri	9
2.5.1.2. <i>P. aeruginosa</i> tarafından hücre dışına salgılanan virülans faktörler ...	11
2.5.2. <i>P. aeruginosa</i> patojenezinde konak faktörleri.....	13
2.5.2.1. Kistik fibrozis transmembran proteini.....	13
2.5.2.2. Kompleman sistem.....	14
2.5.2.3. Sitokinler	14
2.5.2.4. Siklooksijenaz	15
2.6. <i>P. aeruginosa</i> Kaynaklı Enfeksiyonlar	18
2.6.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	18
2.6.2. Üriner sistem enfeksiyonları	19
2.6.3. Gastrointestinal sistem enfeksiyonları	19
2.6.4. Göz enfeksiyonları	19

2.6.5. Kulak enfeksiyonları	19
2.6.6. Endokardit enfeksiyonları	20
2.6.7. Bakteriyemi enfeksiyonları	20
2.6.8. Solunum yolu enfeksiyonları.....	20
2.6.9. Kemik eklem enfeksiyonları	21
2.6.10. Pakreatit.....	21
2.7. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarında Tedavi, Koruma ve Kontrol.....	21
2.8. <i>P. aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Direnci	22
2.8.1. <i>P. aeruginosa</i> 'da doğal direnç.....	22
2.8.1.1. <i>Dış zar geçirgenliğinin az olması</i>	23
2.8.1.2. <i>Efluks pompa (dışa atım) sistemleri</i>	24
2.8.2. Kazanılmış direnç.....	25
2.8.2.1. <i>Ekstrakromozomal direnç</i>	25
2.8.2.2. <i>Antibiyotiklerin inaktivasyonu sonucu kazanılan direnç</i>	25
2.8.2.3. <i>Hedef molekülün değişimi sonucu gelişen direnç</i>	26
2.8.2.4. <i>Biyofilm sonucu gerçekleşen direnç</i>	26
2.9. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi	27
2.9.1. Biyofilmin yapısı	28
2.9.2. Biyofilm oluşum aşamaları	30
2.10. Quorum Sensing (Çoğunluğu algılama).....	31
3. MATERYAL ve METOT	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Kullanılan antibiyotikler.....	37
3.1.2. Mikrobiyolojik ve moleküler analizlerde kullanılan kimyasallar	37
3.1.3. Hücre kültürü ve protein analizlerinde kullanılan kimyasallar	38
3.1.4. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması	38
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Mikrobiyolojik analizler.....	45
3.2.1.1. <i>Klinik isolatlar, referans suşlar ve bakterin saklanma koşulları</i> .	45
3.2.1.2. <i>Seftazidim dirençli P. aeruginosa izolatlarının bakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesi</i>	46
3.2.1.2.1. <i>Disk difüzyon yöntemi</i>	46
3.2.1.2.2. <i>Mikrodilüsyon yöntemi</i>	47
3.2.1.3. <i>Biyofilm oluşumu</i>	48
3.2.1.3.1. <i>Tüpte biyofilm üretimi yöntemi</i>	48

3.2.1.3.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi	49
3.2.1.4. Kongo kırmızısı agar yöntemi ile biyofilm üretiminin belirlenmesi.....	49
3.2.1.5. Homoserin lakton (HSL) oluşumu için cross-feeding test	50
3.2.1.6. Hareketlilik testleri	50
3.2.1.6.1. Titreme hareketi testi.....	50
3.2.1.6.2. Kayma hareketi testi.....	51
3.2.1.6.3. Yüzme hareketi testi.....	51
3.2.1.7. Piyosiyanın miktarının ölçümü.....	51
3.2.1.8. Elastaz miktarının ölçümü	52
3.2.1.9. Proteaz miktarının belirlenmesi	52
3.2.2. Moleküler analizler.....	52
3.2.2.1. Quorum sensing genlerinin PZR ile saptanması	53
3.2.2.2. DNA izolasyonu	53
3.2.2.2.1. QS intakt gen profillerinin belirlenmesi.....	54
3.2.2.2.2. QS internal gen profillerinin belirlenmesi	55
3.2.3. Hücre kültürü analizleri.....	56
3.2.3.1. Test maddelerinin hazırlanması	57
3.2.3.2. MTT testi ile hücre canlılıklarının (sitotoksik aktivitesinin) belirlenmesi	57
3.2.3.3. hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 genlerinin ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi.....	58
3.2.3.3.1. Total RNA izolasyonu ve analizi	58
3.2.3.3.2. cDNA sentezi	59
3.2.3.3.3. Gerçek zamanlı PZR analizi.....	60
3.2.3.4. hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 proteinlerinin ifadesinin Western Blot ile analizi.....	61
3.2.3.4.1. Protein izolasyonu.....	62
3.2.3.4.2. Western Blot analizi	63
3.2.3.1.5. Dot Blot yöntemi.....	65
3.2.4. İstatistiksel analizler	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Mikrobiyolojik Analizler.....	67
4.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının tanımlanması	67
4.1.2. Seftazidim dirençli <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları	69

4.1.2.1. İzolatların disk difüzyon sonuçları	69
4.1.2.2. İzolatların MİK değerleri	72
4.1.3. Biyofilm oluşumu	73
4.1.4. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında slime faktör (biyofilm) üretimi	75
4.1.5. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında homoserin lakton üretimi	76
4.1.6. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının hareketlilik testleri	77
4.1.7. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında piyosiyanın miktarının ölçümü	79
4.1.8. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında elastaz miktarı	80
4.1.9. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında proteaz üretimi	81
4.2. Moleküler Analizler	82
4.2.1 Quorum sensing genlerinin PZR ile belirlenmesi	84
4.2.1.1. <i>QS</i> intakt gen profillerinin belirlenmesi	84
4.2.1.2. <i>QS</i> internal gen profillerinin belirlenmesi	85
4.3. Hücre Kültürü Analizleri.....	87
4.3.1. hTERT-HPNE hücrelerinde <i>Cox-2</i> ve <i>IL-8</i> gen ifadeleri.....	89
4.3.2. hTERT-HPNE hücrelerindeki <i>Cox-2</i> ve <i>IL-8</i> proteinlerinin analizi.....	93
5. TARTIŞMA.....	97
5.1. İzolatların Klinik Örneklerle ve Hastane Servislerine göre Dağılımı	97
5.2. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	98
5.3. Biyofilm Oluşumu.....	102
5.4. Quorum Sensing ve Virülans Faktörler.....	104
5.5. Önemli Bir Sinyal Molekülü Olan 3-oxo-C ₁₂ -HSL'nin hTERT-HPNE Hücreleri Üzerine Etkileri	110
6. SONUÇLAR.....	114
7. ÖNERİLER.....	116
KAYNAKÇA.....	117
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Disk difüzyon için test edilecek olan antibiyotikler ve sınır değerleri	47
Tablo 3.2. İntakt ve internal primer dizileri	53
Tablo 3.3. İntakt <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> genleri için PZR karışım oranları	55
Tablo 3.4. İntakt <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> genlerinin amplifikasyon programı	55
Tablo 3.5. İnternal <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> genleri için PZR karışım değerleri	56
Tablo 3.6. İnternal <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> genlerinin amplifikasyon koşulları.....	56
Tablo 3.7. cDNA sentezi için birinci aşamada kullanılan bileşenler	59
Tablo 3.8. cDNA sentezi için ikinci aşamada kullanılan bileşenler	60
Tablo 3.9. Primer dizileri	60
Tablo 3.10. Gerçek zamanlı PZR bileşenlerinin oranları.....	61
Tablo 3.11. Gerçek zamanlı PZR için amplifikasyon koşulları	61
Tablo 3.12. Bovin serum albümin standartları.....	62
Tablo 3.13. Protein örneklerinin hazırlanması.....	63
Tablo 4.1. Seftazidim dirençli <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının hastane servislerine göre sayı ve yüzde dağılımı.....	68
Tablo 4.2. Seftazidim dirençli <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarının elde edildiği klinik örneklerinin sayı ve yüzde dağılımı.....	68
Tablo 4.3. Seftazidim dirençli <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının disk difüzyon sonuçları.....	69
Tablo 4.4. Hastane servisleri ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişkinin dair ki kare ile elde edilen analizi.....	71
Tablo 4.5. Seftazidim dirençli <i>P. aeruginosa</i> izolatlarına karşı 8 antibiyotiğin minimum inhibisyon konsantrasyonu sonuçları	72
Tablo 4.6. Mikrotitrasyon oluşum değerleri bakımından hastane servisleri arasındaki farklılığa ilişkin kruskal wallis H testi sonuçları	74
Tablo 4.7. Göğüs hastalıkları servisinden elde edilen izolatların gentamisin ile istatistiksel olarak ilişkisi.....	75
Tablo 4.8. Hastane servisleri ile biyofilm üretimi arasındaki ilişkinin ki kare test sonuçları.....	76
Tablo 4.9. Klinik örnekler ile hareketlilik testleri arasındaki ilişki	79
Tablo 4.10. Hastane servisleri ve elastaz arasındaki ilişki (kruskal wallis H testi)	81
Tablo 4.11. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu.....	83
Tablo 4.12. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu	89
Tablo 4.13. β -aktin geni ile normalize edilen <i>Cox-2</i> ve <i>IL-8</i> ifadesindeki değişimler... 92	
Tablo 4.14. β -aktin ile normalize edilen <i>Cox-2</i> proteininin ifadesindeki değişimler	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'ya ait virülans faktörler.....	9
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın filajel yapısı	10
Şekil 2.3. <i>P. aeruginosa</i> 'da Tip IV pili	10
Şekil 2.4. IL-8 sinyal yolağı	15
Şekil 2.5. Siklooksijenazların genel yapısı.....	16
Şekil 2.6. Prostaglandin sentez yolu	17
Şekil 2.7. Cox-2'nin hücre içi lokalizasyonu	18
Şekil 2.8. Gram negatif bakterilerde zar yapısı ve porin proteinleri	23
Şekil 2.9. <i>P. aeruginosa</i> 'da efluks pompa sistemi	24
Şekil 2.10. Biofilm antibiyotik dirençliliğinin olası dört farklı mekanizması.....	27
Şekil 2.11. Quorum sensing mekanizması.....	32
Şekil 2.12. <i>Vibrio fischeri</i> ve <i>Vibrio harveyi</i> 'de biyoluminesans oluşumu.....	33
Şekil 2.13. Oto uyarıcı sentez genlerinin molekül yapısı	34
Şekil 2.14. PQS'nın (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) molekül yapısı.....	34
Şekil 2.15. <i>P. aeruginosa</i> 'da QS sinyal iletişim yolağının şematik gösterimi	35
Şekil 2.16. <i>P. aeruginosa</i> enfeksiyonlarında konağa 3-oxo-C ₁₂ -HSL sinyal molekülünün etkisi.....	36
Şekil 4.1. 3-oxo-C ₁₂ -HSL maddesinin hTERT-HPNE hücreesindeki canlılık analizi.....	88
Şekil 4.2. Gerçek zamanlı PZR'da erime eğrisi analizi.....	91
Şekil 4.3. hTERT-HPNE hücrelerinde gen anlatım seviyeleri.....	92
Şekil 4.4. BCA yöntemi standart kalibrasyon eğrisi	93
Şekil 4.5. 3-oxo-C ₁₂ -HSL ile muamele edilen hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 proteini kat değişimi	95
Şekil 4.6. 3-oxo-C ₁₂ -HSL ile muamele edilen hTERT-HPNE hücrelerinde IL-8 protein yoğunluğu	96

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Görsel 2.2. Biyofilmin elektron mikroskopisi.....	28
Görsel 2.3. Biyofilm matriks oluşumu	30
Görsel 4.1. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının farklı agarlarda tanımlanması	67
Görsel 4.2. Oksidaz pozitif <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında mor renk oluşumu.....	67
Görsel 4.3. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının disk difüzyon görüntüsü	70
Görsel 4.4. Tüpte biyofilm oluşumu	73
Görsel 4.5. Biyofilm oluşumunun belirlendiği mikrotitrasyon plağı.....	74
Görsel 4.6. Kogo kırmızısı agarda inkübe edilen izolatların slime faktör üretimi.....	75
Görsel 4.7. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında HSL üretimi.....	77
Görsel 4.8. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında titreme hareketi	77
Görsel 4.9. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında kayma hareketi	78
Görsel 4.10. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında yüzme hareketi	78
Görsel 4.11. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında piyosiyenin miktarının belirlenmesi.....	80
Görsel 4.12. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında elastaz miktarının ölçümü	81
Görsel 4.13. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında proteaz üretimi	82
Görsel 4.14. QS intakt genlerinin optimizasyon sonuçları	84
Görsel 4.15. QS mekanizması kontrolü altında olan <i>las</i> intakt sistemine ait gen bölgeleri.....	85
Görsel 4.16. QS mekanizması kontrolü altında olan <i>rhl</i> intakt sistemine ait gen bölgeleri.....	85
Görsel 4.17. QS internal genlerinin optimizasyon sonuçları	86
Görsel 4.18. QS mekanizması kontrolü altında olan <i>las</i> internal sistemine ait gen bölgeleri.....	86
Görsel 4.19. QS mekanizması kontrolü altında olan <i>rhl</i> internal sistemine ait gen bölgeleri.....	87
Görsel 4.20. 3-oxo-C ₁₂ -HSL uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinin ters faz mikroskopisi	89
Görsel 4.21. İzole edilen RNA örneklerinin formaldehit agaroz jel görüntüsü.....	90
Görsel 4.22. Bisinkoninik asit yöntemiyle konsantrasyonun belirlenmesi	93
Görsel 4.23. Cox-2 ifadesi Western Blot sonucu.....	94
Görsel 4.24. IL-8 proteininin ifadesi Dot Blot sonucu.....	95

SİMGELER DİZİNİ

Simgeler	Açıklamalar
α	: Alfa
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
g	: Gram
χ	: Kappa
lt	: Litre
M	: Molar
mm	: Milimetre
μg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram
pmol	: Pikomol
rpm	: Revolution per minute
U	: Unit
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABC	: ATP binding cassette super family
AHL	: Açıl homoserin lakton
AI	: Oto uyarıcı
ATCC	: Amerikan kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin tri fosfat
BCA	: Bisinkoninik asit
BHI	: Brain heart infusion broth
BSA	: Bovin serum albümin
CDC	: Hastalık kontrol merkezi
cDNA	: Komplementer DNA
C ₄ -HSL	: N-bütil-L-homoserin lakton
CF	: Kistik fibrozis
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör protein
CFU	: Colony forming unit (Koloni oluşturan birim)
CLSI	: Clinical laboratory standart institute
Cox	: Siklooksijenaz
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
eDNA	: Ekstrasellüler DNA
EDTA	: Etilendiamintetra asetikasit
EF-2	: Elongasyon faktör-2
EMB	: Eozin metilen blue
EPS	: Ekstrasellüler polimerik matriks
ERC	: Elastin kongo kırmızısı tamponu
ExoT	: Ekzoenzim T
ExoS	: Ekzoenzim S
FBS	: Föetal bovin serum
HSL	: Homoserin lakton
hTERT-HPNE	: Human pancreatic epithelial nestin expressing

LBA	: Luria bertani agar
LB	: Luria bertani broth
IgG	: İmmün globulun G
IL-8	: İnterlökin-8
MATE	: Multidrug and toxic compound extrusion super family
MFS	: Major facilitator super family
MHA	: Mueller hinton agar
MHB	: Mueller hinton broth
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MOPS	: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
MTT	: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NADH	: Nükotinamid adenin dinüklotit
NF χ β	: Nükleer faktör kappa β -
NHI	: Ulusal sağlık enstitüsü
NNIS	: Ulusal nozokomiyal enfeksiyonları sürveyans sistemi
PQS	: 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon
QS	: Quorum sensing
RANTES	: Regulated Activation Normal Tcell Expressed Secreted
RND	: Resistance nodulation cell division super family
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektrofezi
SMR	: Small multidrug resistance super family
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TSA	: Triptik soy agar
TSB	: Triptik soy broth
UAMDS	: Ulusal antimikrobiyal direnç sürveyans sistemi
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
3-oxo-C ₁₂ -HSL	: N-3-oxododecanolyl-L-homoserin lakton

1. GİRİŞ

Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Gram negatif bir bakteridir. Birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra tedavi sırasında bile direnç kazanabilme özelliğinden dolayı çoklu antibiyotik direnci gösteren, son yıllarda artan insidansı ile güncel bir problemdir (Rasamiravaka vd., 2015; Davis ve Brown, 2016; Xiong vd., 2017).

P. aeruginosa neden olduğu akut enfeksiyonlara ilaveten kemoterapi alan ve immün sistemi baskılanan bireylerde kronik enfeksiyonların oluşumundan sorumludur. Yoğun bakım ünitelerinde gerçekleşen pnömoniler başta olmak üzere hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni Gram negatif bakteriler arasında ise ikinci sırada yer alır. Ayrıca üriner sistem enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, konjonktival eritem, korneal enfeksiyonlar, katater ilişkili enfeksiyonlar, menenjit, abse, kistik fibrozis (CF), ventilatör ilişkili pnömoni ve nozokamiyal enfeksiyonlara neden olan önemli nonfermantatif bir patojendir. Özellikle solunum cihazı gibi nemli yüzeylerde biyofilm oluşturarak mortalitesi ve morbiditesi yüksek enfeksiyonlara sebep olur (Chatterjee vd., 2016).

Biyofilm, tek hücreli mikroorganizmaların canlı ya da cansız katı bir yüzeye tutunup üretmiş oldukları ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) ile etraflarını çevreleyip bir araya gelmesiyle oluşturdukları film tabakasıdır (Satpathy vd., 2016). EPS, genel olarak glikokaliks yapısında olup polimerik maddeler, kompleks polisakkaritler, glikopeptitler, lipitler, proteinler, lipopolisakkaritler, nükleik asit ve hücre kalıntılardan meydana gelir (Cortés, Bonilla ve Sinisterra, 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturarak antimikrobiyal ajanlardan, immün sistem elemanlarından fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunduğunu göstermiştir (Nouraldin vd., 2016; Davis ve Brown, 2016; Mukherjee vd., 2017). Ayrıca, biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğu bilinmektedir. Böylece, biyofilm içindeki bakteriler yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olur (Hassan vd., 2011). Bakteriler ayrıca biyofilm içerisinde sentezlemiş olduğu hücrelerarası sinyal molekülleri ile haberleşerek koordineli bir şekilde hareket edebilir. Quorum sensing (QS, çoğunluğu algılama) olarak adlandırılan bu haberleşme sistemi sayesinde bakteriler yalnız yapamadıkları işleri topluluk olarak başarabilir (Bassler ve Losick, 2006). QS hakkında yapılan araştırmalar bakterilerin büyük bir

çoğunluğunda, sinyal molekülü olarak oto uyarıcı (AI) adı verilen N-açil-homoserin lakton'un (HSL) görev aldığını ortaya koymuştur. Hücre içerisinde sentezlenen oto uyarıcılar ekstrasellüler ortama salınır ve komşu hücre zarındaki reseptörlerce algılanır. Bu moleküllerin yoğunlukları sınır değere ulaştığı zaman, transkripsiyonel aktivatöre bağlanarak hedef genlerin ifadesini başlatır (Nealson, Platt ve Hastings, 1970).

P. aeruginosa'da biyofilm ve virulans faktörlerinin üretimi *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* genleri ile kontrol edilir (Fuqua, Parsek ve Greenberg 2001; Whitehead vd., 2001). *lasI* ve *rhlI*, N-3-oxododecanoly-L-homoserin lakton (3-oxo-C₁₂-HSL) ve N-bütül-L-homoserin lakton (C₄-HSL) olmak üzere iki oto uyarıcı üretiminde görev alır. Üretilen oto uyarıcılar sınır değere ulaştığı anda *lasR* ve *rhlR* adı verilen regülatör proteinlerine bağlanarak hedef genlerin uyarılmasını ya da baskılanmasını sağlar. *P. aeruginosa* özellikle yüksek yapılı organizmalarda kolonize olmaları sırasında, bu sinyal moleküllerini kullanarak popülasyon davranışlarını düzenler (Hentzer, Givskov ve Parsek, 2002). Dolayısıyla konak üzerinde kendi kritik popülasyon yoğunluğunu algılayarak, gerekli virulans faktörleri üretebilir (Parsek ve Greenberg, 2002; Pearson vd., 2000).

Biyofilm, içerisindeki *P. aeruginosa* virulans faktörlerin salınımını artırarak patojenezde önemli rol oynar. Bu virülans faktörler hücrelerdeki sıkı bağlantıları parçalayarak epitel hücre geçirgenliğini artırır ve infeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar. Bu durum interlökinlerin üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki gösterir (Salyers ve Whitt, 1994). Virülans faktör oluşumundan sorumlu 3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL moleküllerinin yüksek yapılı canlılarda immün sistem elemanlarını baskılayarak epitelyal hücrelerin zar bütünlüğünü bozması sonucu sitokin ifadesini, apoptozisi ve hücre göçünü başlattığına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Wu vd., 2005; Taguchi vd., 2014; Everett vd., 2017). Özellikle proinflamatuvar belirteçlerden Cox-2, IL-1 α , IL-6, IL-8 ve daha birçoğunun artışına da neden olduğu bildirilmiştir (Alcorn ve Wright, 2004).

Bu çalışmada, Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına polikliniklerden gönderilen ve hastanede yatan hastalara ait klinik örneklerden elde edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n:100) izolatlarının;

1. Antipseudomonal antibiyotikler kullanılarak antibiyotik duyarlılık profillerini ve antibiyotiğin bakteri üzerinde etkili olan minimum konsantrasyonunu belirlemek,
2. Biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemek,

3. Virülans faktörlerini (slime faktör, biyofilm, piyosiyenin, hareketlilik testleri, homoserin lakton, elastaz ve proteaz) üretip üretmediklerini belirlemek,

4. Virülans faktörlerin üretiminde düzenleyici rol üstlenen *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* genlerine sahip olup olmadıklarını belirlemek

5. QS mekanizmasında rol alan önemli bir virülans faktör olan 3-oxo-C₁₂-HSL'nin epitel hücre hatları üzerine olası sitotoksik etkisini *in vitro* koşullarda belirlemek,

6. 3-oxo-C₁₂-HSL molekülü ile muamele edilmiş hTERT-HPNE (immortalized human pancreatic epithelial nestin expressing) hücrelerinde *Cox-2* ve *IL-8* genlerinin ifadesi gerçek zamanlı PZR ile ayrıca *Cox-2* ve *IL-8* proteinlerinin ifadesini Western Blot yöntemiyle belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Gammaproteobacteria sınıfı ve Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan *Pseudomonas* cinsi bakteriler; su, toprak, bitki, insan ve diğer memeliler gibi farklı ekolojik nişlerde yaşayan, hücre duvar yapısına göre Gram negatif özellikte olan, nonfermentatif aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türleri kapsar (Roquigny vd., 2017). Birçok Gram negatif bakteride olduğu gibi, *Pseudomonas* grubu bakteriler de glukozu Entner-Doudorof metabolik yolu aracılığıyla aktive eder (Madigan ve Martinko, 2009).

Ribozomal RNA (rRNA) homolojisine göre yapılan sınıflandırmada floresan alt grubunda *Pseudomonas* cinsi içerisinde; *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola*, *P. diminuta*, *P. vesicularis* ve *P. oryzihabitans* gibi çeşitli türler bulunur (Kıska ve Gilligan, 2003). Bu türler arasında *P. aeruginosa*, birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olması ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen insan patojeni olması nedeniyle klinik öneme sahip bir bakteridir (Mukherjee vd., 2017). Özellikle son yıllarda artan insidansı, hızla yükselen antibiyotik dirençliliği, hücreler arası sinyal molekülleri aracılığıyla haberleşebilme yeteneği ve çeşitli virülans faktörlere sahip olma özelliği ile bilinen *P. aeruginosa* mortalite ve morbiditesi yüksek tedavisi güç enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı bir patojendir (Murray vd., 2002; Zorrilla vd., 2017).

2.1. *P. aeruginosa*'nın Tarihçesi

Sédillot 1850'de cerrahi salgılar üzerinde mavi yeşil renkte bir akıntı gözlemlemiş ve bu durumun ciddi enfeksiyonlara neden olduğunu ileri sürmüştür. Luke ise 1862'de mavi yeşil irinlerden örnekler alıp incelemeler yapması sonucu basil şeklinde mikroskobik canlıların olduğunu belirtmiştir. 1882'de, Gessard ise *P. aeruginosa*'yı ilk kez gözlemlemiş ve *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırmıştır. *P. aeruginosa*'nın bugüne kadar *Bacterium aeruginosum*, *Bacterium aerugineum*, *Micrococcus pyocianus*, *Pseudomonas pyocianea*, *Bacterium pyocianum*, *Pseudomonas polycolor* gibi isimlerle anıldığı bilinmektedir (Bilgehan, 2000; Şentürk, 2011). Osler ise 1925 yılında *P. aeruginosa*'nın primer enfeksiyonlardan ziyade sekonder ya da fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmiştir (Lister, Wolter ve Hanson, 2009).

Günümüzde ise *P. aeruginosa*, modern medikal araçların kullanımındaki sterilizasyon hataları, bilinçsiz antibiyotik kullanımının artması ve bağışıklık sistemini

baskılayan tedavilerin gelişmesi ile hayatı tehdit eden, hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bir mikroorganizma olarak literatürlerde yer almaktadır (Li vd., 2017; Friedrich, 2017).

2.2. *P. aeruginosa*'nın Morfolojik ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Sporsuz, 0,5-0,8 µm eninde ve 1,5-3,0 µm boyunda düz veya hafif kıvrık, Gram negatif, kapsülsüz ve aerobik basillerdir. Çoğunlukla tek olmakla birlikte, bazen çift halde bulunan polar flagella nedeniyle hareketli organizmadır (Çakar, 2009; Archer, 2015) (Görsel 2.1).



Görsel 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*, (Archer, 2015)

P. aeruginosa türleri buldukları ortama göre farklı koloni morfolojileri sergileyebilme özelliğine sahiptir. Hücre dışı polisakkarit olan aljinat sentezleyerek mukoid özellikte olan M tipi kolonilerini oluşturur. Özellikle obstrüktif pulmoner hastalığı olan hastalardan, üriner katatere bağlı kronik enfeksiyonlardan ve kistik fibrozisli hastalardan izole edilen suşların M tipi koloni oluşturduğu görülmüştür. Çevreden ve hastaneden izole edilen bazı *P. aeruginosa* türleri ise S tipi ve R tipi koloni morfolojisine sahiptir (Çakar, 2009).

Kültürlerinde, kendine özgü aromatik üzüme benzer trimetil amin kokusuyla diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılır. Organik üreme faktörlerine gereksinimi yoktur. Karbon kaynağı olarak birçok substratı kullanabilmesi, *P. aeruginosa*'ya kompleks besiyerlerinin yanı sıra basit besiyerlerinde hatta distile suda bile hayatta kalma avantajı sağlar. Optimum 37 °C'de üreme yeteneğine sahip olmasına rağmen, 15-50 °C gibi geniş sıcaklık aralığında da üreyebilmesi, bu bakterinin farklı ekolojik şartlarda hayatta kalma oranını artırır. En iyi pH 6,6-7,0 aralığında üreyebilir (Maçın, 2014).

2.3. *P. aeruginosa*'nın Biyokimyasal Özellikleri

Kanlı agarda β hemoliz yapması, çikolata agarda metalik parlaklık veren geniş, mukoid, kaba veya pigmentli koloniler üretmesi, Mueller Hinton agarda (MHA) yeşil pigmentasyon ve metalik parlaklık veren laktoz negatif koloniler üretmesi, bu bakterilerin fenotipik olarak tanımlanmasında kullanılan önemli biyokimyasal özellikleridir. Özellikle karbonhidratları fermente etme özelliği olmadığı için Eozin Metilen Mavisini (EMB) agarda, açık pembe koloni oluşumu ile kolaylıkla ayırt edilir. Glukoz, fruktoz ve ksiloz gibi bazı monosakkaritleri oksidasyon yolu ile parçalarken, laktoz ve sukroz gibi disakkaritleri okside edemez. İndol, metil red, voges proskauer ve H₂S negatif, sitrat ise pozitifdir. L-arjinin dihidrolaz üretirken, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz üretme yeteneğine sahip değildir (Artenstein ve Cross 1993; Winn vd., 2006; Karatuna, 2008; Çakar, 2009).

P. aeruginosa türleri kültürlerinde; piyoverdin (sarı-yeşil), piyorubin (kırmızı), piyomelanin (kahverengi-siyah) ve piyosiyenin (mavi-yeşil) olarak bilinen ekstraselüler fenazin pigmentleri üretir. Ayrıca suda eriyebilen piyosiyenin üretme özelliğiyle diğer nonfermentatif *Pseudomonas* türlerinden ayrılır (Gahlout vd., 2017).

Son elektron alıcısının oksijen olduğu zorunlu aerob bakterilerdir ve bu nedenle katalaz pozitifdir. Ancak oksijen yokluğunda, ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO₃ varsa anaerob koşullarda da yaşamlarını devam ettirebilir. Ayrıca en önemli özellikleri, sitokrom oksidaz enzim üretimi nedeniyle oksidaz pozitif olmalarıdır. *P. aeruginosa*'nın demir içeren bir hemoprotein olan sitokrom oksidaza sahip olması, NADH ile oksijene elektron taşınmasını kataliz eder. Oksidaz pozitif özellikte olmaları nedeniyle Enterobacteriaceae ailesine ait türlerden kolayca ayrılır (York vd., 2010).

2.4. *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojik Özellikleri

Dünya çapında gerçekleşen yıllık 56 milyon ölümün yaklaşık %30'unu enfeksiyon hastalıkları oluşturmaktadır. Bu durum gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı problemi (Madigan ve Martinko, 2009). Mikrobiyolojik olarak etkini belirlenmiş nozokomiyal yani hastane kaynaklı enfeksiyon olgularının %11 ve %13,8'inde etken *P. aeruginosa*'dır. Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara kolay bir şekilde uyum göstermesi, birçok antibiyotiğe ve dezenfektanlara dirençli olması bu bakteriye, etkili bir fırsatçı patojen olma özelliği kazandırır (Oliver vd., 2015). Hastanelerde solunum yolu tedavi ekipmanları, antiseptikler, sabunlar, lavabolar,

paspaslar, ilaçlar, fizyoterapi ve hidroterapi havuzları gibi çeşitli kaynaklardan sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa* önemli enfeksiyonlara neden olur (Lister, Wolter ve Hanson 2009).

Sağlıklı insanların mikrobiyotasından da izole edilebilen *P. aeruginosa* fırsatçı bir patojen olduğu için nadiren hastalık oluşumunda rol oynar. İnsanlarda, %0-2 cilt, %0-3,3 burun mukozasında, %0,66 boğazda ve %2,6-24 oranında dışkı örneklerinden izole edilmekle birlikte hastanede özellikle enfeksiyon hastalıkları ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda kolonizasyon oranının %50'lere kadar ulaştığı görülür (Lister, Wolter ve Hanson 2009; Oliver vd., 2015).

Ulusal Nozokomiyal İnfeksiyonları Sürveyans (NNIS) sisteminin en son raporunda; *P. aeruginosa*'nın yara ve akciğer enfeksiyonlarında 3. sıklıkta, üriner sistem enfeksiyonlarında 4. sıklıkta ve septisemi olması halinde kan kültürlerinden 5. sıklıkta izole edilen mikroorganizma olduğu belirtilmiş ve %40-%50 oranlarında mortalite ve morbiditeye sebep olan bakteri olduğu ileri sürülmüştür (Trautmann, Lepper ve Mathias, 2005).

Sebebi olduğu akut enfeksiyonlara ilaveten kemoterapi, radyoterapi, hepatit, AIDS, cerrahi yanık ve yara gibi immün sistemi baskılayan etkenler, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına zemin hazırlayarak kronik enfeksiyonların ilerlemesine neden olur. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan malign veya metabolik rahatsızlığı bulunan yaşlı kişilerin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına yakalanma riski daha fazladır (Demirci, Yorgancıgil ve Arda, 2001).

Nemli ortamları tercih etmesi sebebiyle hastaların nemli vücut bölgelerinde (aksilla ve kulak), bunun yanı sıra solunum destek sistemlerinde, nemli medikal aletlerde (katater, lens, implant, yapay kalp kapakçıkları, rahim içi araçlar gibi) barınarak biyofilm oluşumuna neden olur. Biyofilm üretimi, antibiyotiklere son derece dirençli suşların oluşmasına neden olduğu için *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi güçtür (Williams, Dehnbostel ve Blackwell, 2010; Jefferies vd., 2012; Balasubramanian vd., 2013).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin Ulusal Sağlık Enstitüsü (NHI) tarafından yapılan geniş çaplı çalışmalarda enfeksiyonların %80'inden fazlasının biyofilm kaynaklı olduğu görülmüştür (Hassan vd. 2011). ABD'nin Hastalık Kontrol Merkezi'nin (CDC) son raporunda, her yıl Amerika'da 51,000 hastanede *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyon görüldüğü bildirilmiştir. CDC raporunda, tedavi sırasında bile

direnç kazanma yeteneğine ve çoklu dirence sahip olan *P. aeruginosa* suşlarının ciddi tehdit oluşturduğu bildirilmiştir (Patel, Kram ve Baumgardner, 2016). Antimikrobiyal Dirence Global Bakış ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) verileri Türkiye halk sağlığı kurumunda, 2012-2015 yılları arasında Türkiye’de *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların %32 oranlarında arttığını belirtmiştir (Şimşek, 2017).

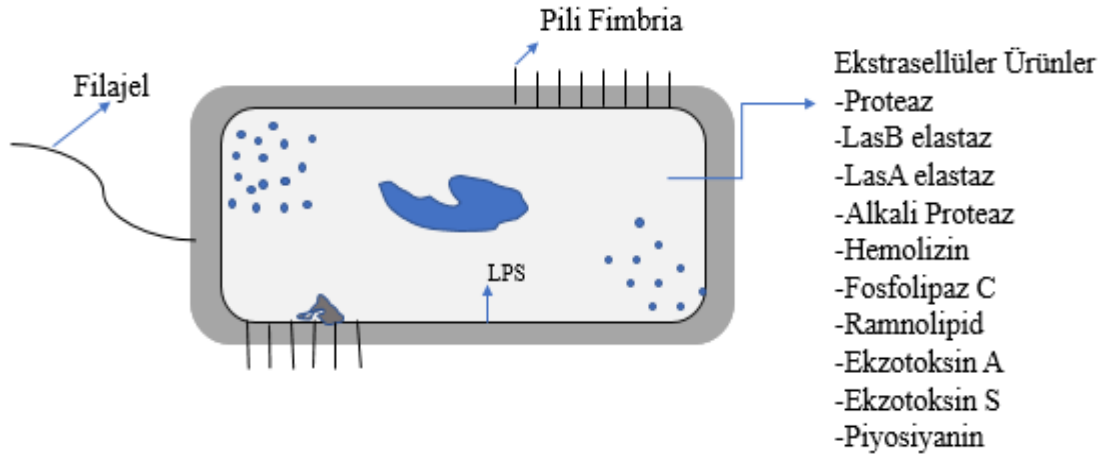
2.5. *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Patojenezi

P. aeruginosa’nın sahip olduğu adezinler, flajel ve pili sayesinde, konakçının epitel hücrelerine tutunması ile başlayıp yayılma ve kolonizasyonu takip eden süreç mikrobiyal patojenez olarak adlandırılır. Patojeniz sürecindeki kontrolsüz bakteri gelişimi konakçı hasarı ile sonuçlanır. Patojeniteye neden olan mikroorganizmalar, bir patojenin bağıl yeteneği olan virülansı oluşturmak için çok farklı stratejileri bir arada kullanır. *P. aeruginosa* kaynaklı patojenezin gelişiminde bakteride bulunan virülans faktörler kadar konak faktörleri de önemli yer tutar (Madigan ve Martinko, 2009).

2.5.1. Patojeniz oluşumunda *P. aeruginosa*’ya ait virülans faktörler

P. aeruginosa’nın, yeni bir çevreye adaptasyonu ve bu çevreyi algılayarak farklı cevaplar verebilme kabiliyeti patojenezi için gereklidir. Bakteriler hayatta kalabilmek için; pH, ozmolarite, besin maddelerinin kullanılabilirliği ve popülasyon yoğunluğu gibi birçok çevresel koşullara uyum sağlayabilen mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalardan en önemlisi QS olarak öne çıkar (Madigan ve Martinko, 2009).

QS mekanizması, bakterilerin birbirleriyle iletişim kurarak kendi popülasyon yoğunluklarını algılamasına ve koordineli bir şekilde virülans faktörlerini üretmesine olanak sağlar (Smith ve Iglewski, 2003). Ayrıca QS etkisiyle bakterilerin biyofilm adı verilen ekstraselüler matriks ile etraflarını çevreleyerek kronik enfeksiyonların ve inflamasyonun oluşmasına neden olduğu bilinir. Kısaca bakteri QS mekanizmasını pek çok genin regülasyonunu kontrol etmek için kullanır *P. aeruginosa*’nın virülans faktörleri, hücre yüzeyine ait ve hücre dışı virülans faktörler olmak üzere iki grupta incelenir (Harmsen vd., 2010) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *P. aeruginosa*'ya ait virülans faktörler

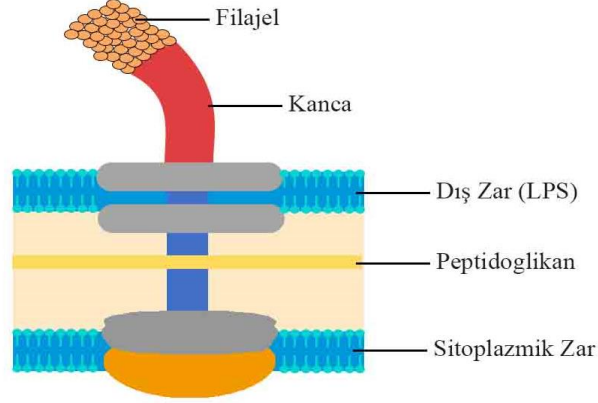
2.5.1.1. *P. aeruginosa*'nın hücre yüzeyine ait virülans faktörleri:

Flajel (kirpik), pili (fimbria), lipopolisakkarit ve aljinat sentezi bakterinin hücre yüzeyine ait virülans faktörleri arasında sayılabilir. Bakteriler hücre yüzeyinde bulunan bu virülans faktörleri aracılığıyla konak hücreye tutunarak patojenezde önemli görev alır (Harmsen vd., 2010).

Filajel, *P. aeruginosa*'nın hücre yüzey yapıları arasında bulunan, polar filajel olarak adlandırılan yapı, bakterinin yüzme ve kayma hareketinden sorumludur. Bakteriyal kamçının filamentleri filagellin adı verilen proteinlerden oluşur. Sitoplazmada sentezlenen filagellin makromolekülleri filament içerisindeki 3 nm'lik kanaldan geçerek olgun kamçıyı oluşturur (Şekil 2.2).

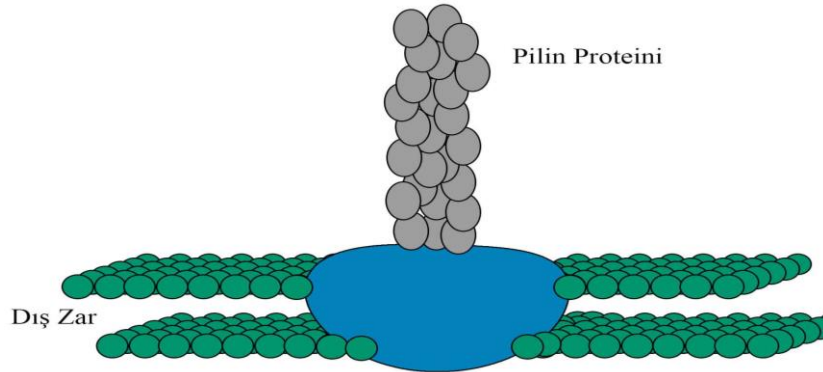
Güçlü immünojen bir yapıda olan filajel, epitel hücrelerin AsiolaGM1 gibi zar komponentlerine bağlanıp aderansı sağlayarak patojenezde kritik rol oynar. *P. aeruginosa*'da, *filC* geni tarafından kodlanan filajellin, proteininin büyüklük ve antijenitesine bağlı olarak A ve B tip filajelin ifadesinde rol oynar. A tip filajel heterojen bir yapıya sahipken, B tip filajel homojen yapıdadır (Ulusoy, 2007). Bakteriler filajelleri aracılığıyla besin maddelerine kolayca ulaşır, immün sistem elemanlarından ve antibakteriyel ajanların zararlı etkilerinden kaçır, konak hücrelerine translokasyon yapar ve biyofilm içerisinde serbestçe hareket edebilir (Harmsen vd., 2010). Filajel, Tollbenzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile etkileşerek NF κ B bağımlı inflamatuvar yanıtı uyarır ve kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile IL-8 sentezinin başlatılmasına yol açar. Çevreden ve hastane enfeksiyonlarından izole edilen suşların çoğunda bulunurken, kistik fibrozis ve kronik enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen

suşlarda konağın immün sistem yanıtından kaçmak için filajel bulunmaz (Smith vd., 2002).



Şekil 2.2. *P. aeruginosa*'nın filajel yapısı

Pili (Fimbria), Filajelden farklı olarak sitoplazmik zardan orijin alan, kısa, düz, çok sayıda ve ince yapılardır. Fimbriaların protein yapısındaki antijenlerine fimbrilin ya da pilin proteini adı verilir (Şekil 2.3). Bakteriler fimbriaları aracılığıyla, hemagglütinasyon yapma, eritrosit ve lökosit bağlanma özellikleri gösterirler. Ayrıca nöraminidaz enzimiyle birlikte bakterilerin özellikle epitel yüzeylere aderansını kolaylaştırır. Hareketli ve hareketsiz bakterilerde bulunabilir. *P. aeruginosa* fimbriaları aracılığıyla titreme hareketini gerçekleştirir. *P. aeruginosa*'da Tip IV pili olarak adlandırılan bu yapılar *P. aeruginosa*'nın biyofilm ve mikrokoloni oluşumunda aderans için gerekli olan nadir fimbriyalardır (Beatson vd., 2002).



Şekil 2.3. *P. aeruginosa*'da bulunan Tip IV pili

Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerde dış zarın ana bileşeni olan lipopolisakkarit, *P. aeruginosa* için önemli bir virülans faktördür. Lipid A, merkez oligosakkarit ve O-polisakkarit içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. LPS, fiziksel bir zar görevi üstlenerek konak savunması ve aminoglikozid gibi antibiyotiklerin etkilerinden bakteriyi korur. Ayrıca, LPS'nin lipid A bileşeni Toll-benzeri reseptör 4'ü tanıma özellikleri ile kistik fibrozis transmembran regülatör proteinine (CFTR) bağlanarak patojenezde rol oynayan en önemli mediatördür (King vd., 2009).

Aljinat, *P. aeruginosa* tarafından üretilen, mukoid özellikteki anyonik ekzopolisakkarit yapısıdır. Tekrar eden D-mannuronik asit ve L-glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Aljinat bakteriyi olumsuz çevre koşullarına, oksidatif stresten konak savunma sistemine ve özellikle aminoglikozid antibiyotiklerin zararlı etkilerine karşı korur (Hentzer vd., 2001; Yang vd., 2017).

2.5.1.2. *P. aeruginosa* tarafından hücre dışına salgılanan virülans faktörler:

Piyosiyinin, elastaz, alkali proteaz, ekzotoksin A, fosfolipaz C ve rhamnolipid, *P. aeruginosa* tarafından hücre dışına salgılanan önemli virülans faktörlerdendir. Piyosiyinin, *P. aeruginosa* tarafından sekonder metabolit olarak üretilerek hücre dışına salgılanan, fenazin türevi mavi yeşil renkli bir pigmenttir (Gahlout vd., 2017). Piyosiyinin, korizmik asit, *phz*ABCDEF operonu ile *phzH*, *phzM* ve *phzS* genleri aracılığıyla sentezlenir (Lau vd., 2004). RANTES (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed ve Secreted) ve IL-8 seviyelerini etkileyerek konak immün sistem yanıtını değiştirir. Katalaz aktivitesinin bozulmasına neden olan piyosiyinin, süperoksit (O_2^-) gibi reaktif oksijen türevleri üreterek sitotoksik aktivitede rol oynar (Denning vd., 2003).

Elastaz, Elastin bağ doku, deri, akciğer ve arterlerin genişleyip daralmasına olanak sağlayan ve hücreleri koruyan önemli role sahip bir proteindir (Almine vd., 2010). Elastaz ise *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden sorumlu olan elastin ve kollojeni parçalayan bir metalloproteinazdır. LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) enzimleri sinerjik etki göstererek elastin degradasyonu yapar. Elastaz hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanarak, enfeksiyonların başlangıç safhasında özellikle akciğerlerde parankimal hasara ve hemorojik lezyonlara neden olur. Bu enzim aynı zamanda kompleman elemanlarını hasara uğratarak, serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak nötrofil kemotaksisini ve fonksiyonunu inhibe eder ve akut

enfeksiyonların yayılmasını tetikler. IgG, fibrin, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalar. Epitel dokulardaki hücreler arası sıkı bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır. Proinflamatuvar etki göstererek IL-8 üretimini uyarır (Alcorn ve Wright, 2004).

Alkali proteaz, *P. aeruginosa* tarafından hücre dışına tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan, yüksek proteolitik aktiviteye sahip bir metalloproteinazdır. AprA geni tarafından kodlanan alkali proteazın, özellikle korneada ve akut akciğer hastalarında alveoller içindeki fibrinin parçalanmasına ve ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir (Karatuna, 2008; Ulusoy, 2007).

Ekzotoksin A (ExoA), *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen en önemli virülans faktörlerinden biridir. Ökaryotik hücrelerde, adenosin difosfat riboliz transferaz (ADP-ribozil transferaz) özelliği ile protein sentezi için gerekli olan elongasyon faktör-2'yi (EF-2) inaktive ederek protein sentezini inhibe eder. Difteri toksini ile etki mekanizması aynı olsa da ekzotoksin A ve difteri toksinlerinin immünolojik ve kimyasal yapıları birbirinden farklı olup, ekzotoksin A difteri toksinine göre daha az toksik etki gösterir. Oküler enfeksiyonlarda kornea hasarına ve kronik solunum yolu enfeksiyonlarında doku hasarına yol açar (Wick, Hamood ve Iglewski, 1990; Çakar, 2009).

Ekzoenzim S (ExoS), Hücre iskeletinin yapısını bozan ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahip olup, tip III sekresyon sisteminde yer alan bir toksindir. C-terminal ADP-ribozil transferaz ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP) olmak üzere iki aktif bölgesi bulunan bir toksindir (Karatuna, 2008). ExoS hücrel apoptozis için gereklidir ve Rho GTPaz'ın protein aktivitesinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. Isıya dayanıklı olmasıyla Ekzotoksin A'dan farklılık gösterir (Maçın, 2014).

Ekzoenzim T (ExoT), ExoT, yara iyileşmesini inhibe edici özelliği olan hücre dışı bir toksindir (Sayner vd., 2004). ExoS'ye göre aktivitesi daha düşüktür ve *P. aeruginosa*'nın önemli virülans faktörlerinin salgılandığı bir salgılama sistemi olan tip III sekresyon sisteminde yer alır (Saleeb vd., 2017).

Fosfolipaz C, Bir hemolizin olarak bilinen fosfolipaz C, hemolitik özelliğine göre ikiye ayrılır. Hemolitik fosfolipaz C (PLC-H); ısıya duyarlı, fosfatidilkolin ve sifingomyelini hidrolize eder. Nonhemolitik fosfolipaz C (PLC-N), fosfatidilkolin ve sifingomyelini hidrolize eder. Her iki hemolizin tipinde de lipid ve lesitin hasara uğratarak bakterinin dokulara invazyonu kolaylaşır (Fiester vd., 2017).

Ramnolipid, Hemolitik özellikteki bir hemolizin olup, yapısında ramnoz şekeri ve β -hidroksidekanoik yağ asidi içeren biyosümfaktandır. *P. aeruginosa*'nın ramnolipid üretimi ilk kez 1949'da Jarvis ve Johnson tarafından bildirilmiştir (Lan vd., 2015). *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu ile yakından ilişkili olan ramnolipid, konakta akciğer yüzeyinde bulunan fosfolipidleri çözerek, fosfolipaz C'nin etki alanını artırır. Ayrıca ramnolipid moleküllerinin yüzey gerilimi düşük, emülsiyon aktivitesi yüksek olduğu için, biyodegradasyonun artırılması ve kirletilmiş topraklarda hidrokarbonların ortadan kaldırılmasında kullanılan bir biyosümfaktandır (Oluwaseuna vd., 2017).

2.5.2. *P. aeruginosa* patojenezinde konak faktörleri

Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, immün sistemi baskılanmış insanlarda ikincil enfeksiyonlara neden olan bir mikroorganizma olduğu için, enfeksiyonların oluşumunu belirleyen temel unsur konağın sağlık durumudur (Gellaty ve Hancock, 2013; Oliver vd., 2015). Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, katater uygulamaları, travma, yara, ülser ya da yanık enfeksiyonları gibi normal cilt mikrobiyotasının etkilenmesi sonucu bariyer bütünlüğünün bozulduğu durumlar, kemoterapiye bağlı gelişen nötropeni, hepatit ve AIDS gibi vakalarda immün sistem baskılanmıştır. Kolonizasyon için fırsat bulan bakteri bu gibi durumlarda hücre dışı virülans faktörlerinden aljinatı üreterek doku hasarı ve kan dolaşımında yayılıma sebep olur (Silby vd., 2011).

2.5.2.1. Kistik fibrozis transmembran proteini

P. aeruginosa, kistik fibrozisli hastalarda ikincil enfeksiyon olarak %60-70 oranlarında inflamasyon oluşumuna sebep olur (Bielen vd., 2017). Bu hastalık, epitel hücrelerin apikal zarında bulunan ve ATP ile aktive olarak klor kanalı görevi gören CFTR geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. CFTR aynı zamanda *P. aeruginosa* için reseptör görevi görmektedir. Bakteri, bu reseptörlere bağlanarak endositoz yoluyla hücre içine alınır. Böylelikle patojenlerin zararlı etkilerinden solunum yolu temizlenir. Ancak gende meydana gelen herhangi bir mutasyon sonucu CFTR proteini sentezlenemez. Bu nedenle hücre içine alınamayan *P. aeruginosa*, bağışıklık sisteminden kaçarak çoğalıp enfeksiyonlara neden olur (Güzel ve Gerçekler, 2006; Mantero vd., 2017).

2.5.2.2. Kompleman Sistem

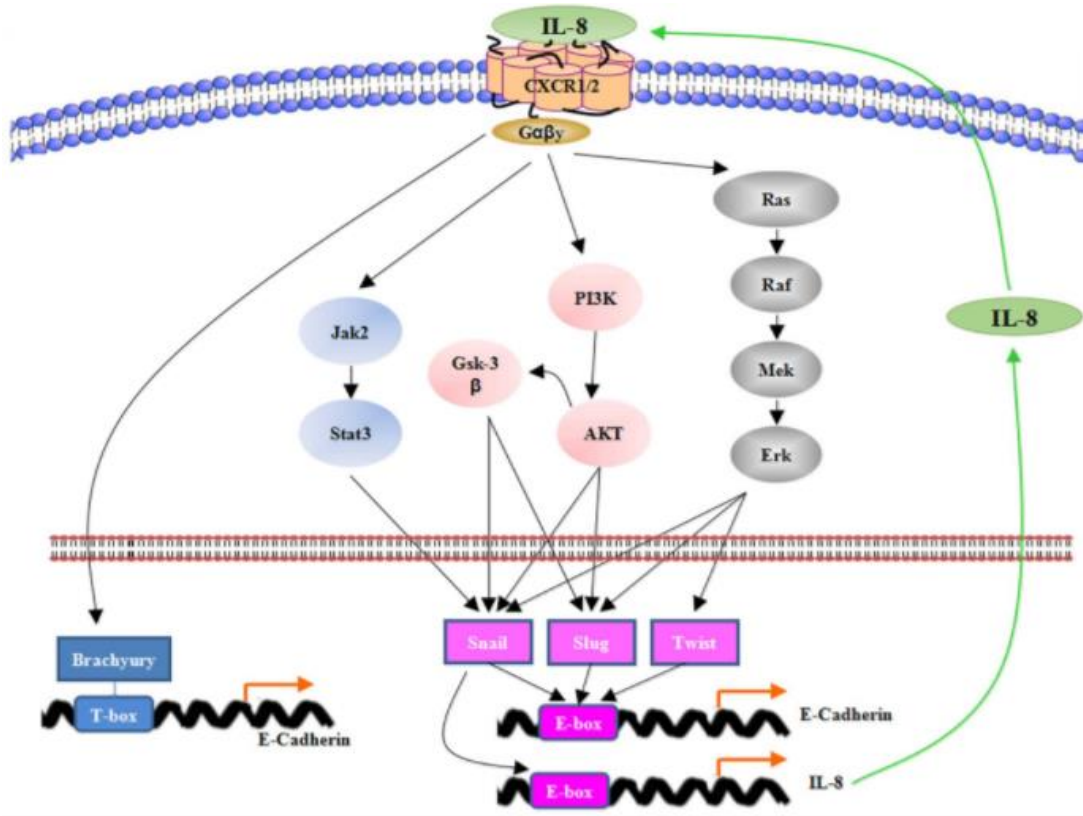
Bir canlıdan patojenlerin temizlenmesinde biyokimyasal kaskad işlevi gören kompleman sisteminin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında iki önemli rolü bulunur. Kompleman reseptörlerinden *P. aeruginosa* ile ilgili olan C3b ve IC3b komplemanları fagositoza neden olurken, C3a ve C5a komplemanlar ise etkili bir fagositoz için nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonunu sağlar. Benzer şekilde, surfaktan protein A ve D (SP-A ve SP-D) ve mannoz bağlayan lektin (MBL) gibi kollektinler *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında doğal dirence neden olur. Kollektinler lektin yolağından komplemanı aktive ederler. Kompleman ve lektin faktörlerinden defekli bireyler *P. aeruginosa* ile enfeksiyona duyarlı hale gelir (Hair vd., 2017).

2.5.2.3. Sitokinler

Hücreler arası ilişkiler, hücrelerin birbirleriyle ve hormon benzeri maddelerle etkileşmeleri sonucu yürütülür. Bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde ilgili hücrelerce salınan hormon benzeri aracı maddelere sitokin adı verilmektedir. Sitokinler, T ve B lenfositleri tarafından oluşturulmuşsa lenfokinler, monositlerce oluşturulmuşsa monokinler adı verilmektedir. Bu etkin maddelere genel olarak interlökin (IL) adı verilmektedir. Bağışıklık yanıtının oluşmasında hücreler arası ilişkilerde rol oynayan IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ ve TGF β olmak üzere çok sayıda sitokin bulunur (Bilgehan, 2000). IL-1; T hücrelerinin aktivasyonuna yol açarak enfeksiyonun yok edilmesine neden olur. Ancak bakteri miktarının fazla olduğu koşullarda yüksek oranda sentezlenen IL-1 inflamasyonun artmasına ve doku hasarına neden olur. TNF- α , IL-4, IL-6 ve IL-8 de benzer şekilde bakteri yoğunluğunun fazla olması halinde inflamasyonla ilgili patolojilere yol açar (Çakar, 2009; Roussel vd., 2016).

1992'lerde lökosit göçü, enfeksiyon hastalıkları, enflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis ve organogeneziste rol alan bir grup sitokine, kemotaktik sitokinlerden esinlenerek "kemokin" adı verilmiştir (Lindley, Westwick ve Kunkel, 1993). Konak savunması epitelyal kemokinler aracılığıyla immün sistemin devamlılığını düzenler. Bu amaçla özgül reseptörlere bağlanan kemokinler hücre göçünü ve aktivasyonunu gerçekleştirir. Bugüne kadar dört CXC (CXCR1-CXCR4), sekiz CC (CCR1- CCR8) ve bir de CX3C (CX3CR) kemokin reseptörü tanımlanmıştır (Turner vd., 2014).

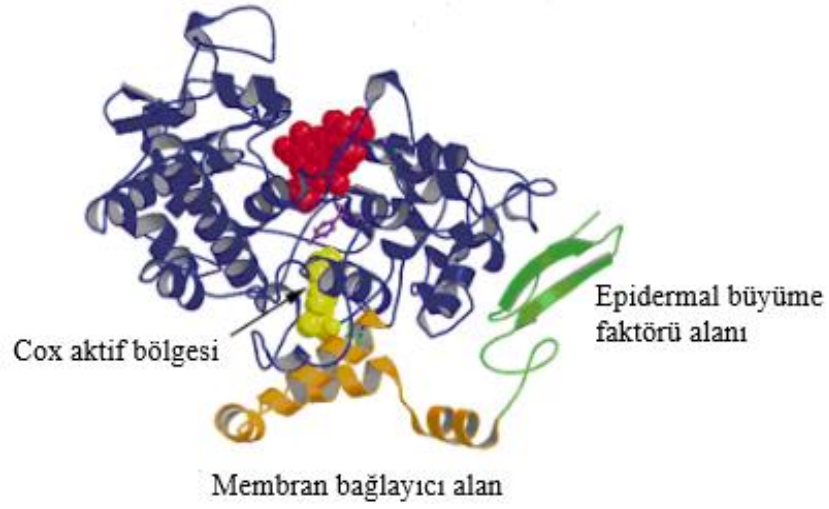
Bakteri virülans faktörlerinin tanınması ile başlayan sinyal iletimini kemokin ekspresyonu izler. Kemokinler, nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göçünü uyarır. Aktif olmuş nötrofiller ise fagositoz yolu ile bakteriyi yok eder. Özellikle *P. aeruginosa* kaynaklı doku hasarında monositler, makrofajlar, endotel hücreleri ve fibroblastlar IL-8 olarak bilinen kemokinleri üretir ve AKT, MAPK/ERK ve JAK2/STAT3 sinyal yolları görev alır (Waugh ve Wilson, 2008; Long vd., 2015) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. IL-8 sinyal yolağı (Long vd.,2015)

2.5.2.4. Siklooksijenaz

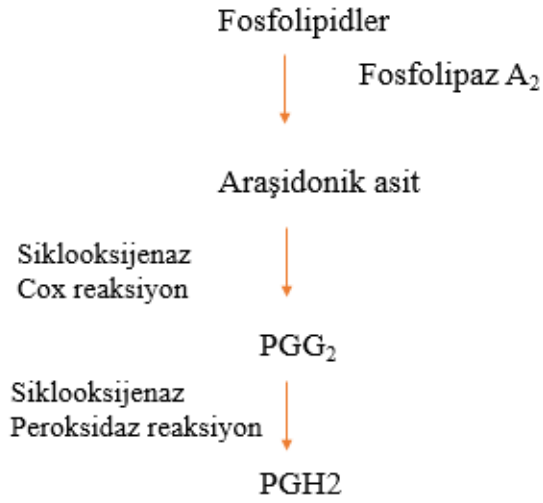
Prostaglandin sentaz ve prostaglandin endoperoksit sentetaz olarak da bilinen Siklooksijenaz (Cox), prostanoidlerin oluşumundan sorumlu enzim olup eikozanoid metabolizmasında prostanoidlerin oluşumunun temel enzimatik basamağı araşidonik asidin prostaglandin H2 (PGH2)'ye dönüşümünü katalizler. Cox yapısında; Cox aktif bölgesi, epidermal büyüme faktörü alanı ve zar bağlayıcı bölgesi bulunan bir proteindir (Güler, 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Siklooksijenazların genel yapısı (Güler, 2010)

Prostaglandin endoperoksit sentetazların izozimlerinden biri olarak bilinen Cox-2'nin ekspresyonundaki değişim, konağa bağlı patojenez oluşumundaki faktörlerden biridir. Prostaglandinler (PG), eikozanoid olarak adlandırılan yirmi karbonlu çoğu doymamış yağ asitlerinden oluşan bileşiklerdir. Eikozanoidler, sadece özel salgı bezlerinden değil tüm dokularda düşük miktarlarda sentezlenmesi ile hormonlardan ayrılırlar. Birçok fizyolojik ve patolojik yanıtı ortaya çıkaran etkili bileşikler olarak bilinirler (Champe, Harvey ve Ferrier, 2005).

Prostaglandinlerin sentezlenmesinde ilk basamağı fosfolipaz A2, ikinci basamağı ise prostoglandinlerin öncül yapısını oluşturan linoleik asitin uzayarak doymamış hale gelmesi sonucu araşidonik asite dönüşümü oluşturur. Serbest olarak bulunan araşidonik asite O_2 molekülü eklenerek PGG2 oluşur. Cox enziminin endoperoksit sentaz aktivitesi ile PGH2'ye dönüşümü gerçekleşir (Ak vd., 2016) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Prostaglandin sentez yolu

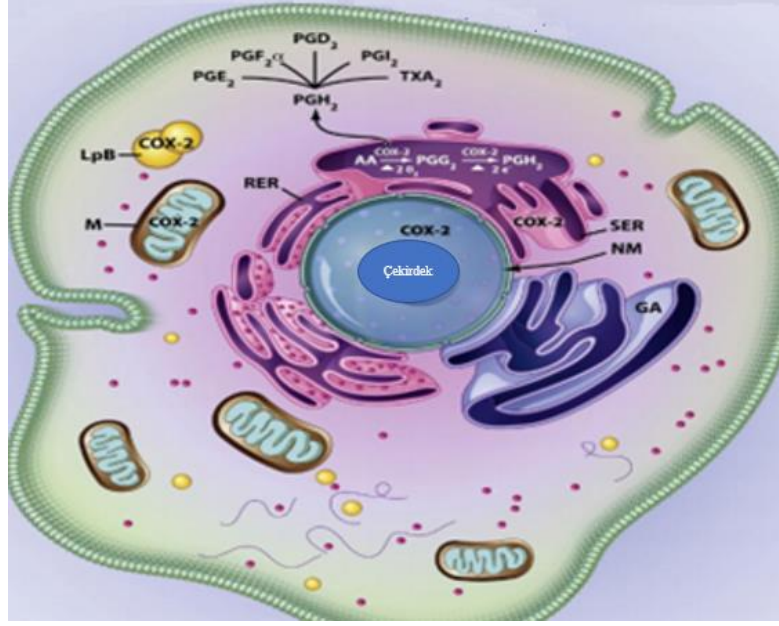
Siklooksijenazlar, prostaglandin biyosentezinde anahtar enzimler olarak bilinir. Cox enziminin; Cox-1, Cox-2 ve Cox-3 olmak üzere üç farklı formu bulunur (Sobolewski vd., 2010; Rizzo, 2010).

Kromozom 9 üzerinde yer alan Cox-1, çoğu dokuda sürekli olarak üretilen 71 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Trombosit agregasyonu, böbrek homeostazı gibi birçok fiziksel fonksiyondan sorumludur ve memeli hücre dokusunda bulunan bir enzimdir (Smith vd., 2002).

Kromozom 1 üzerinde bulunan Cox-2'nin 55 kDa, 72 kDa ve 74 kDa büyüklüğünde farklı izoformlarının olduğu bilinir (Zhang vd., 2016). Patolojik proinflatuar ve mitojenik uyarılar ile hızla indüklenebilen bir enzimdir. Özellikle bakteriyel virülans faktörler tarafından uyarıldıkları inflamasyon durumlarında aşırı şekilde ifade edilir. Cox-2'nin indüklenmesinden sonra artan prostaglandin sentezi, inflamasyonda ağrı, ısı, kızarıklık ve ateşten sorumludur (Celotti ve Laufer, 2001; Zhang vd., 2016).

Sitokinler, büyüme faktörleri, mitojenler, inflamatuvar hücrelerdeki endotoksinler ve tümör promotörleri Cox-2 enzimini indükler. Cox-2 esas olarak endoplazmik retikulum (ER) lümeninde ve çekirdek zarında bulunurken, tümör hücrelerindeki lokalizasyonu mitokondri ve lipid hücreleridir (Güler, 2010) (Şekil 2.7).

Cox-1'in bir varyantı olarak tanımlanan Cox-3'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, beyin ve spinal kord yapısında bulunur. Ayrıca inflamasyonda herhangi bir rol almadığı düşünülmektedir (Sobolewski vd., 2010).



Şekil 2.7. *Cox-2*'nin hücre içi lokalizasyonu (Rizzo, 2010).

2.6. *P. aeruginosa* Kaynaklı Enfeksiyonlar

Nozokomiyal kaynaklı bir patojen olması nedeniyle *P. aeruginosa*, sağlıklı insanlarda nadiren hastalıklara sebep olurken, özellikle hastanelerin yoğun bakım ve enfeksiyon hastalıkları ünitelerinde yatan, bağışıklık sistemleri baskılanmış kişilerde yüzeysel deri enfeksiyonlarından sepsise kadar birçok farklı klinik tablo oluşturur (Er, 2013). Enfeksiyonların oluşumuna sebep olan virülans faktörlerin sentezlenmesinde, hücreler arası sinyal iletiminde rol oynayan QS mekanizması önemli bir rol oynar (Mittal vd., 2009). Yaygın olarak *P. aeruginosa* enfeksiyonunun görüldüğü başlıca 10 farklı doku enfeksiyonu bilinmektedir.

2.6.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Dekübitüs ülserleri, diyabetik ülser, venöz ülseri, yanık, travma ve dermatit gibi deri bütünlüğünün bozulduğu akut ya da kronik enfeksiyonlar *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına zemin oluşturur. Bakterinin virülans faktörlerinin ekspresyonunda Gac/Rsm ve siklik-di-GMP sinyalizasyon yolağı görev alır. Akut enfeksiyonlarda tip III salgı sistemi, kronik enfeksiyonlarda ise ekzopolisakkaritler rol oynar (Turner vd., 2014).

2.6.2. Üriner sistem enfeksiyonları

Vücuttaki en yaygın ikinci enfeksiyon türünü oluşturan üriner sistem enfeksiyonları, ciddi halk sağlığı sorunlarına neden olur. Yaşa bağlı olarak prevalansı artan *P. aeruginosa* kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarını, kateter gibi yabancı cisim ve cerrahi girişimler oluşturur. Enfeksiyonun lokalize ya da sistemik olmasına göre sepsis ya da septik şoka kadar uzanan geniş bir yelpazeye sahiptir (Mittal vd., 2009).

2.6.3. Gastrointestinal sistem enfeksiyonları

Gastrointestinal sistem enfeksiyonları; proteaz, elastaz, adezin ve flajel gibi virülans faktörler tarafından zar bütünlüğü bozulan epitel hücrelerinde bakteri traslakosyonunun artması sonucu oluşur. Daha çok yeni doğanlarda, hematolojik malignensi ve nütropenisi olan yetişkinlerde görülen *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlar, orofarinksten rektuma kadar gastrointestinal sistemin bütün bölgelerinde görülebilir (Markou ve Apidianakis, 2014).

2.6.4. Göz enfeksiyonları

Oküler yüzeylerin bakteriyel ve fungal enfeksiyonları oldukça yaygındır. Özellikle kornea enfeksiyonları, uzun süreli kontak lens kullanımında sık karşılaşılan komplikasyonlar olup, Avrupa'daki mikrobik keratitlerin %66'sını oluşturur. *P. aeruginosa* tarafından kontak lens üzerinde oluşturulan biyofilm ve konjonktivit gibi göz enfeksiyonları ile görme kayıplarına neden olur (Saraswathi ve Beuerman, 2015).

2.6.5. Kulak enfeksiyonları

P. aeruginosa nemli ortamları sevmesi nedeniyle yüzme havuzlarında sıklıkla kolonizasyon oluşturabilir. Bu ortamlardan kaynaklanan bulaşlarda, yüzücü kulağı adı verilen akut diffüz eksterna tablosuna yol açabilir. *P. aeruginosa* dış kulak yolundaki epitel hücrelerini aşip alttaki yumuşak doku, kıkırdak ve kortikal kemik dokusunun yavaş ancak progresif bir şekilde yıpranmasına ve mortalitesi çok yüksek malign otitis eksternaya neden olabilir. *P. aeruginosa*, her yaşta görülebilen kronik süperatif otitis eksternanın (orta kulak iltihabı), sinüzitlerin ve kulak kepçesinde takı kullanımıyla gelişen perikondritlerin en sık karşılaşılan etkenidir (Saraswathi ve Beuerman, 2015).

2.6.6. Endokardit

P. aeruginosa kaynaklı endokardit oluşumunda predispozisyon yaratan en önemli risk faktörü intravenöz ilaç kullanımını olup, sıklıkla kalbin sağ tarafını etkiler. Ayrıca kardiak cerrahi, bakteriyemi, santral kateter kullanımı, protez kalp kapakçığı ve hemodiyalize giriş *P. aeruginosa* kaynaklı endokardite zemin hazırlayan diğer etkenlerdir (Parlakay vd., 2010).

2.6.7. Bakteriyemi

Kanda bulunması nedeniyle *P. aeruginosa*, sağlığı tehdit eden en ciddi bakteriyemi etkenlerinden biridir. Mortalite oranları diğer Gram negatif bakterilere oranla çok daha yüksek olup %50'lere ulaşır. AIDS, *diabetes mellitus*, hematolojik maligniteler, immünglobulin eksiklikleri, nötropeni, organ nakli ve ağır yanıklar hastalığa yakalanma oranını artıran faktörlerdir. Bakteriyemi sırasında, ektima gangrenozum adı verilen hemorajik ve nekrotik döküntülerin görülme sıklığı yüksektir (Maçın, 2014). Lezyonlar bakterinin vasküler invazyonu nedeniyle oluşur. Küçük, ağrılı, makülopapüler (döküntü) lezyonların rengi giderek koyulaşarak nekrotik hale döner. Genellikle alt solunum yolları, üriner sistem ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonları sekonder olarak gelişir (Çakar, 2009).

2.6.8. Solunum yolu enfeksiyonları

Solunum yollarında enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların birçoğu üst solunum yolu yüzey epiteli ile sınırlı kalırken, bir kısmı alt solunum yollarına yayılır bir kısmı da solunum yolu ile bulaşıp sistemik enfeksiyonlara neden olur. *P. aeruginosa*'nın aspirasyonu ve inhalasyonu sonucu alt solunum yollarında meydana getirdiği enfeksiyon, trakea bronşitten ağır nekrozitan bronkopnömoniye kadar uzanabilen bir çeşitlilik gösterir. Solunum cihazlarına bağlı olan endotrakeal ya da trakeostomi tüpü olan kişilerde, solunum yollarının hastane patojenleriyle kontaminasyonunun engellenmesi güçtür. *P. aeruginosa*, mekanik ventilasyon alan, bağışıklık sistemi baskılanmış ve antibiyotik tedavisi gören hastalarda gelişen pnömonilerin önemli bir sebebidir. Nozokomiyal enfeksiyonların ise %70'ini ventilatörle ilişkili pnömoni oluşturduğu bilinir. *P. aeruginosa*'ya bağlı enfeksiyonlardan en çok kistik fibrozisli hastalar etkilenir. Özellikle mukoid bakteriler, akciğerlerde biyofilm oluşturarak antibiyotikler, immünglobulinler ve kompleman

aktivasyonu gibi savunma mekanizmalarından korunurlar. Bu nedenle kistik fibrozisli hastalar, *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavileri ağır seyirli olarak devam eder (Limoli vd., 2017; Çakar, 2009).

2.6.9. Kemik ve eklem enfeksiyonları

P. aeruginosa, vertebral osteomyelit, sternoklavikular septik artrit, osteokondrit ve kronik osteomyelit gibi eklem enfeksiyonlarına neden olur. Bu enfeksiyon doğrudan kemik ve eklemlerde başlayacağı gibi kan yolu ile de yayılım gösterebilir. Travma, cerrahi girişimler, yumuşak doku enfeksiyonları, damar içi ilaç kullanma alışkanlığı, endokardit ve komplike üriner sistem enfeksiyonları kolaylaştırıcı faktörler arasında yer alır (Çakar, 2009).

2.6.10. Pankreatit

Modern yoğun bakım tedavilerine rağmen pankreatit, mortalitesi %20'lere varan bir hastalıktır. Mortalitenin temelinde yatan neden pankreas harabiyeti sonucu sitokinlerin tetiklediği sistemik inflamatuvar yanıttır. Bu durum böbrek ve akciğer gibi önemli organları etkileyerek çoklu organ yetmezliğine neden olur. Ayrıca bağırsak mikrobiyotası bozulduğu için enterik mikroorganizmaların neden olduğu sepsis riski yükselir. Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa* ise virülans faktörleri aracılığıyla intestinal geçirgenliği arttırarak sistemik enfeksiyonlara neden olur (Gomi vd., 2017).

2.7. *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarında Tedavi, Korunma ve Kontrol

P. aeruginosa enfeksiyonlarından korunmada en önemli strateji, bu bakterilerin hastanede kolonizasyonunu en aza indirebilmektir. Bu amaçla kullanılan eşyaların (yatak, çarşaf vb.) temizliğine, medikal aletlerin (sonda, katater, endoskopi aletleri vb.) sterilitesine önem verilmeli ve sağlık çalışanlarının el temizliği (hijyen) konusunda titiz olmalıdır (Çakar, 2009).

Antibiyotikler modern tıbbi desteklemek, ölüm oranlarını azaltmak, hayat süresini uzatmak, invaziv girişimlerde enfeksiyonları önlemek ve kemoterapi gibi tedavi amacı ile kullanılır. Fakat antimikrobiyal ilacın hedefinde ortaya çıkan değişimler ve çeşitli enzimler nedeni ile gerçekleşen antibiyotik inaktivasyonları ilaç direncine neden olur. Direnç çeşitlerinin ve mekanizmalarının bilinmesi enfeksiyonların tedavisinde önemli rol oynar (Blair vd., 2014). En son dünya küresel ekonomik risk raporunda, insan

hayatını tehdit eden en büyük tehlikenin antibiyotikler olduğu belirtilmiştir. Avrupa’da her yıl 25000 insanın çoklu ilaç direncine sahip bakteri enfeksiyonlarına yakalandığı ve tedavi için yıllık 1,5 milyar harcandığı bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde ise 2 milyon insan antibiyotik dirençli bakterilerden etkilenmekte ve ortalama 23000 kişi hayatını kaybetmektedir (Blair vd., 2014).

Geniş spektrumlu penisilinler (karbenisilin, piperasilin ve tikarsilin), geniş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim, sefoperazon ve sefepim), karbapenemler (imipenem ve meropenem), monobaktamlar (aztreonam), florokinolanlar (siprofloksasin, levofloksasin) ve aminoglikozidler (amikasin, tobramisin, gentamisin), *P. aeruginosa*’nın tedavi yöntemlerinde kullanılan antipseudomonal antibiyotiklerdir. β -laktam grubu içerisinde yer alan; penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam ve β -laktamaz inhibitör bileşenleri bakterisidal etki gösterir. Özellikle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde, klinik açıdan önemli 3. kuşak sefalosporin grubu ve β -laktamlara karşı yüksek derecede dirençli olan seftazidim antibiyotiği kullanılır (Morita, Tornida ve Kawamura, 2014). Günümüzde *P. aeruginosa* ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde, tek olarak verilen antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirmelerini önlemek ve geniş spektrumlu etki göstermesi amacı ile kombine antibiyotik tedavileri uygulanmaktadır. Fakat *P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği için, antibiyotik tedavisine tam olarak cevap veremez (Hashem vd., 2016).

2.8. *P. aeruginosa*’da Antibiyotik Direnci

P. aeruginosa, sahip olduğu birçok virülans faktör ve çeşitli direnç mekanizmaları ile önemli bir nozokomiyal patojendir. Antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra horizontal gen transferi ve mutasyonlar ile sonradan da direnç kazanabilir (Japoni vd., 2005; Fujimura vd., 2009).

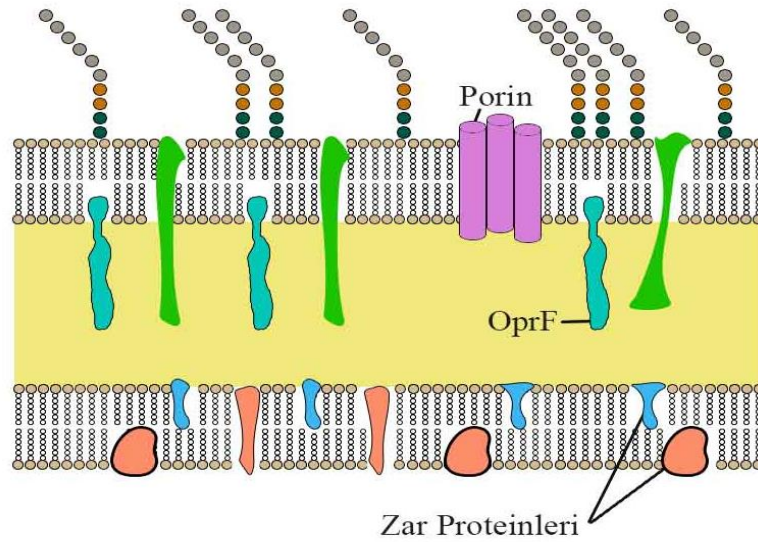
2.8.1. *P. aeruginosa*’da doğal direnç

P. aeruginosa’nın yapısal ve biyokimyasal özellikleri sayesinde bazı antibiyotiklerden etkilenmemesi doğal direnç, intrinsik direnç veya duyarsızlık olarak adlandırılır. Doğal direnç gösteren bakteriler, antibiyotiklerin bağlanma ve hedef bölgelerini içermediği için etkilenmez. Özellikle zar geçirgenliğinin az olması ve aktif

pompa sistemlerinin bulunması doğal direncin gelişmesine neden olur (Livermore, 2001; Schweizer, 2003).

2.8.1.1. Dış zar geçirgenliğinin az olması

Gram negatif bakterilerde bulunan LPS, dış ortamdan alınacak moleküller için yarı geçirgen bir ortam oluşturur. Yapılan çalışmalar, LPS'den dolayı antibiyotiklerin hücreye girişinin sitoplazmik zara kıyasla daha yavaş olduğunu ortaya koymuştur. Bu duruma, LPS'in anyonik özelliğinin, kuvvetli yan bağ oluşturmasının ve doymamış yağ asidi yetersizliğinin neden olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa*'nın dış zarında bulunan porinlerin madde geçirgenliğinin az olması, bakterinin antibiyotik ortamında bile yaşamasına izin verir (Schweizer, 2003) (Şekil 2.8).



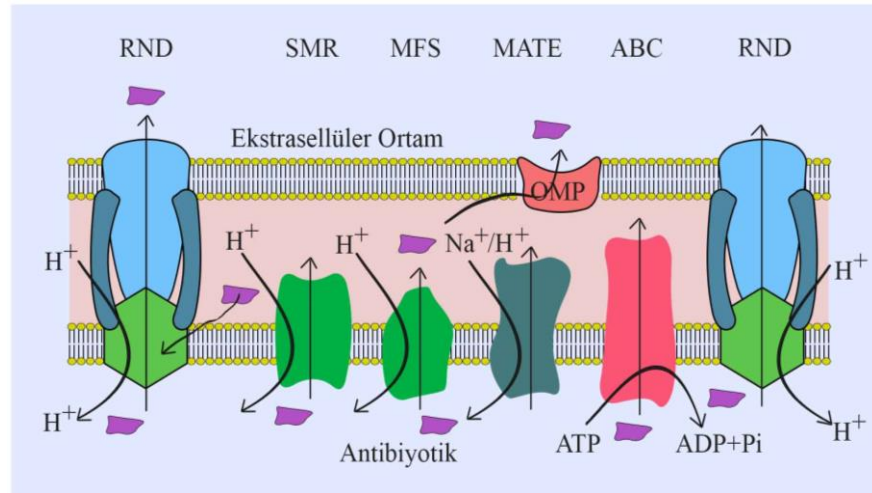
Şekil 2.8. Gram negatif bakterilerde zar yapısı porin proteinleri.

P. aeruginosa'da OprF adı verilen porinlerin kapalı konformasyonda bulunması, bu bakterilerin yüksek düzeydeki doğal direncine önemli katkı sağlar. Porin sentezinin baskılanması, antibiyotiklere karşı bakteriyi koruyan önemli bir avantaj olmasına rağmen besin moleküllerinin de bakteriye girişi engelleneceğinden, bakteri hücre için aynı zamanda bir dezavantaj oluşturur. *P. aeruginosa* antimikrobiyal ilaçların ve toksik moleküllerin geçişini engelleyen fakat besin maddelerinin geçişine izin veren özgül kanal proteinleri bakımından oldukça zengindir. Bunlardan OprB monosakkarit (D-glukoz, D-ksiloz) girişine izin verirken, OprD bazik amino asit ve peptitlerin difüzyonuna olanak tanıyan özgül bir kanaldır (Hasdemir, 2007).

2.8.1.2. Efluks pompa (dışa atım) sistemleri

P. aeruginosa'da besinlerin ve iyonların hücreye alınması, metabolik son ürünlerin hücre dışına atılması ve bakterilerin çevreleriyle olan ilişkileri, büyük bir protein ailesinin üyeleri olan aktif pompa sistemi proteinleri tarafından düzenlenir. Bu proteinler; ATP-bağlı kaset süper ailesi (ATP-binding cassette süper ailesi: ABC), majör kolaylaştırıcı süper ailesi (major facilitator super family: MFS), küçük çoklu ilaç dirençli (small multidrug resistance süper ailesi: SMR), Çoklu ilaç ve bileşikler atılımı süper ailesi (multidrug and toxic compound extrusion süper ailesi: MATE) ve dirençli nodüllendirici hücre bölünme süper ailesi (resistance-nodulation-cell division süper ailesi: RND) olarak bilinir (Siriyong vd., 2017).

P. aeruginosa'da RND süper ailesinden; MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM olmak üzere dört farklı aktif dışa atım sistemi tanımlanmıştır. Bunlardan MexAB-OprM, hem doğal hem de yüksek düzeyde ilaç direncinde rol oynar (Hasdemir, 2007; Siriyong vd., 2017). *P. aeruginosa*'da virülans faktörlerin üretilmesinden sorumlu olan, QS sinyal molekülü olarak bilinen N-3-oxododecanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL), MexAB-OprM dışa atım sistemi tarafından hücre dışına pompalanır (Rampioni vd., 2017). *P. aeruginosa*, MexAB-OprM aktif pompa sistemi ile imipenem hariç bütün β-laktam grubu antibiyotik ve kinolonlara direnç oluşturması açısından önemlidir. 4. Kuşak sefalosporinlere dirençten MexCD-OprJ aktif pompalama sistemi, karbapenem grubu antibiyotiklere dirençten ise MexEF-OprN aktif pompalama sistemi sorumludur (Er, 2013; Blair vd., 2014). (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. *P. aeruginosa*'da efluks pompa sistemi

2.8.2. Kazanılmış direnç

Antibiyotiklere duyarlı bakterilerin, zaman içerisinde çeşitli şekillerde antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesi kazanılmış direnç olarak tanımlanır. Bu özellik; 1) ektrakromozomal direnç, 2) antibiyotiklerin inaktivasyonu sonucu kazanılan direnç, 3) hedef molekülün değişimi sonucu gelişen direnç ve 4) biyofilm sonucu gerçekleşen direnç olmak üzere gruplandırılabilir (Gür, 2017).

2.8.2.1. Ekstrakromozomal Direnç

Bakterilere plazmid, integron, transpozon ve insersiyon dizileri gibi mobil genetik elementler aracılığıyla transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon yolu ile direnç geni taşıyan DNA dizilerinin aktarılması sonucunda bu bakteriler antibiyotiklere direnç kazanır. Antibiyotik direnci en sık plazmid aracılığı ile yayılır. R (direnç) plazmidleri üzerinde bakterilerin antibiyotik direncini kontrol eden genler bulunur ve bu plazmidler başka bakterilere aktararak direncin yayılmasına neden olur. Aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu direnç geni taşıyan bakteriler seleksiyona uğrayarak dirençli mutantlar çoğalmaya başlar (Hershberg, 2017).

Transpozonlar, yer değiştirebilen replikonlara bağımlı genetik materyallerdir. Bunlar bakteri plazmidinden kromozomuna, kromozomdan plazmide ve kromozom içinde bir bölgeden başka bir bölgeye yer değiştirebilir. Hareket edebildikleri için sıçrayan genler olarak da isimlendirilmektedir. İnsersiyon dizileri, birleşik transpozon ve birleşik olmayan transpozon olmak üzere üç farklı transpozisyonel element saptanmıştır. Transpozonlar, bakteriler arasında antibiyotik direnç genlerinin transferinin sağlanmasında önemli rol oynar (Ochman, Lawrence ve Groisman, 2000). Gen ifade elementleri olarak tanımlanan integronlar, dirençlilik genlerinin aktarılmasında rol oynayan özel genetik elementlerdir. Genomun bir bölgesinden diğer bölgesine geçebilmek için gerekli mekanizmalara sahip olmadığı için insersiyon dizileri, transpozon ve plazmid üzerinde bileşik şekilde bulunur (Güneş, 2012).

2.8.2.2. Antibiyotiklerin inaktivasyonu sonucu kazanılan direnç

Antibiyotiklerin inaktivasyonu; hidrolitik enzimler, grup transferi ve redoks mekanizması ile gerçekleşmektedir. Enzimatik inaktivasyon ise sık görülen direnç mekanizmaları arasındadır. *P. aeruginosa*, antibiyotiğin yapısını bozan bir enzim sentezlemektedir. Bakteri tarafından üretilen bu enzimler, antibiyotiğin bakterideki

hedef bölgesine bağlanmadan önce inaktive edilir. Özellikle β -laktam grubu antibiyotikler, β -laktamaz enzimi ile inaktivasyonu gerçekleşen önemli bir antibiyotik grubunu oluşturur. β -laktamaz enzimi, bakterinin peptidoglikan tabakası ile sitoplazma zarı arasındaki periplazmik boşluğunda bulunmaktadır. Hücre duvarındaki porlardan geçen enzim, antibiyotiğin β -laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayarak antibiyotiğin penisilin bağlayan proteinlerle (PBP) birleşmesini engellemektedir (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Seftazidim klinik açıdan önemli, β -laktamazlara karşı yüksek derecede dirençli olan antipseudomonal üçüncü kuşak sefalosporindir. Fakat *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılması, bu antibiyotiğe karşı direnç profilinin yükselmesine neden olmuştur (Nakamura vd., 2013).

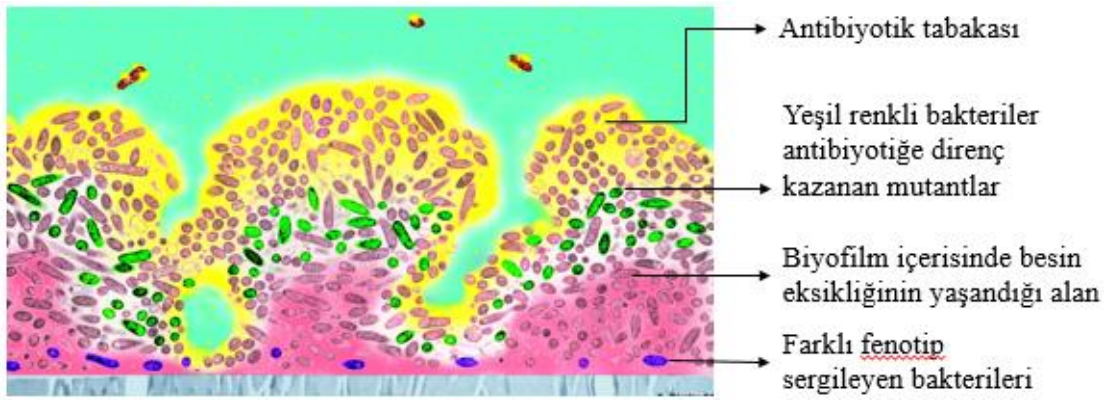
2.8.2.3. Hedef molekülün değişimi sonucu gelişen direnç

Antibiyotik, bakterilerde bulunan hedef moleküllerle birleşip onların fonksiyonlarını bozarak etkinlik gösterir. Hedef bölgede meydana gelen herhangi bir değişim ise antibiyotiğe affiniteyi azalır. Bu durumda ortamda antibiyotik olsa bile bakteri çoğalmaya devam eder. Hücre duvarının yapısında bulunan PBP, bakteride bulunan hedef moleküllerin en önemlilerindedir. Serin proteazlar arasında yer alan PBP'ler, β -laktamazlara çok benzeyen D,D-transpeptidazlar ve D,D-karboksiptidazlardır. PBP'ler β -laktam antibiyotiklere farklı bağlanma afinitelerine sahip oldukları için β -laktam antibiyotiklerinin antibakteriyel etkinliklerinin birbirinden farklı olmasına yol açar (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

2.8.2.4. Biyofilm sonucu gerçekleşen direnç

P. aeruginosa, biyofilm oluşturması suretiyle konak immün sistem elemanlarından etkilenmeyerek antibiyotik tedavisine direnç göstermektedir. Yapılan çalışmalar, biyofilm oluşturan suşların antibiyotiklere karşı bin kat daha dirençli olduğunu göstermiştir. Böylece biyofilm üreten mikroorganizmalar, yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olur (Hassan vd., 2011). Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların karakteristik özelliği, ekstraselüler polimerik matriks üretmeleridir. Biyofilm matriks komponentleri, antibiyotiğin biyofilm içerisindeki transportunu sınırlandırmaktadır. Biyofilmin antibiyotik dirençliliğine neden olduğu bir diğer mekanizmada, biyofilm içerisinde bakterilerin besin maddelerine ulaşamaması nedeniyle üreme fazına yavaş girmeleridir.

Biyofilmdeki değişen kimyasal ortam ve persiste hücreler, dirençlilikte rol oynayan üçüncü mekanizmadır. Üremeyi sınırlandıran kimyasal ortam antibiyotik potensini değiştirebilmektedir. Örneğin; biyofilm içerisindeki pH'nın değişimine bağlı olarak antibiyotiğin kimyasal yapısında bozulmalar oluşmaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015). Şekil 2.10'de görüldüğü gibi sarı renkli antibiyotikler biyofilm tabakasından içeriye giremez. Yeşil renkli bakteriler biyofilm içerisinde antibiyotiğe direnç kazanan mutantlardır. Pembe renkli alanda biyofilm içerisinde besin eksikliğinin yaşandığı alandır. Mor renkli bakteriler biyofilm içerisinde farklı fenotip sergileyen bakterilerdir.



Şekil 2.10. Biyofilm antibiyotik dirençliliğinin olası dört farklı mekanizması (Sezgin, 2001).

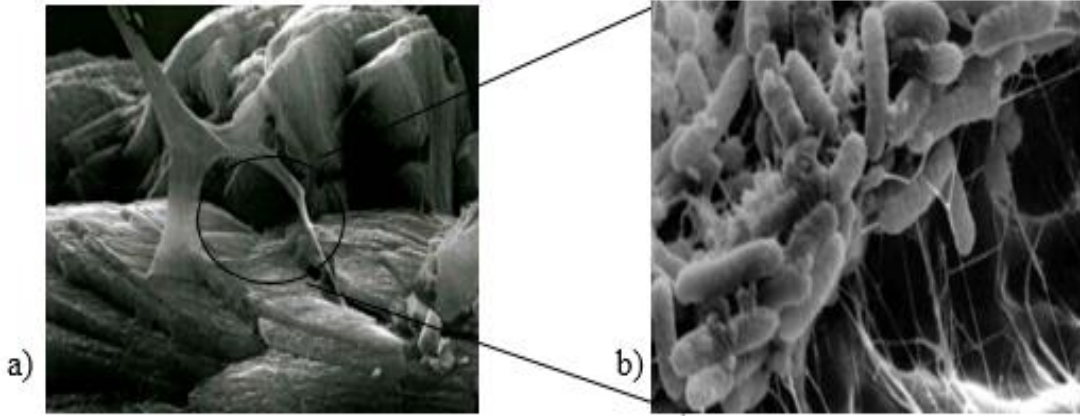
2.9. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Biyofilm ilk olarak 17. yüzyılda Antonie Van Leeuwenhoek'un dişlerindeki plakları incelemesi ve mikroskopta canlıları gözlemlemesi sonucu ortaya atılmış olmasına rağmen biyofilm ile ilgili çalışmalar 1970'li yıllardan sonra yapılmaya başlanmıştır. Marshall tarafından 1976 yılında, bakterilerin polisakkarit fiberlerinin birbirlerine geçmesiyle oluşan veya şeker moleküllerinin dallanarak adezyon iletimini sağlayan bir yapı olarak tanımlanmıştır. 1995 yılında Elder ve ark ise mikroorganizmaların yapısal birlik oluşturmak amacıyla ürettikleri ekzopolimer matriks olduğunu ifade etmiştir. 1999 yılında Costerton, Steward ve Greenberg (1999) tarafından bakterinin canlı ve cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan glikokaliks olarak adlandırılmıştır.

Biyofilmin en yeni tanımı ise; tek hücreli mikroorganizmaların canlı ya da cansız katı bir yüzeye tutunarak üretilen polisakkarit yapıdaki ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) ile etrafını çevreledikten sonra bir araya gelerek oluşturdukları, büyüme oranı ve gen ekspresyonuna bağlı olarak farklı fenotip özellik gösterdiği mikro ekosistem olarak adlandırılır (Satpathy vd., 2016). Biyofilm sayesinde EPS içerisine gömülü olarak yaşamlarını sürdüren mikroorganizmalar; immün sistem elemanlarından, antibiyotiklerden, patojenlerin üretmiş olduğu antimikrobiyal ürünlerden fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunur (Nouraldin vd., 2016).

2.9.1. Biyofilmin yapısı:

Biyofilmin oluşumu sırasında mikroorganizmalar, planktonik form olarak adlandırılan serbestçe hareket ettikleri durumdan, bir yüzeye yapışarak sesil (hareketsiz) forma geçerken biyofilmin iskeletini oluşturan ve matriks olarak da adlandırılan EPS ile etraflarını kapatırlar. Mikroskopik olarak incelendiğinde içinden kanalların geçtiği üst üste dizilmiş mantar şeklindeki yapılardır (Gupta vd., 2016) (Görsel 2.2).



Görsel 2.2. Biyofilmin taramalı elektron mikroskopisi, a) EPS'nin yapısı
b) EPS içerisindeki bakteriler (Sezgin, 2001).

EPS; bakterinin yüzeye yapışması, hücre-hücre (hücreler arası) etkileşimleri, hayatta kalabilmeleri ve genetik materyal değişimleri gibi önemli süreçlerde rol oynar (Harmsen vd., 2010). Genel olarak glikokaliks yapısında olup Ca^{+2} iyonları, polimerik maddeler, kompleks polisakkaritler, glikopeptiler, lipitler, proteinler, lipopolisakkaritler, nükleik asit, quorum sensing molekülleri ve hücre kalıntılarından oluşan heterojen bir yapıdır (Cortés, Bonilla ve Sinisterra, 2011). Özellikle hücre-hücre yaklaşmasını sağlayan biyofilmler, plazmid transfer mekanizması olan konjugasyonu kolaylaştırır.

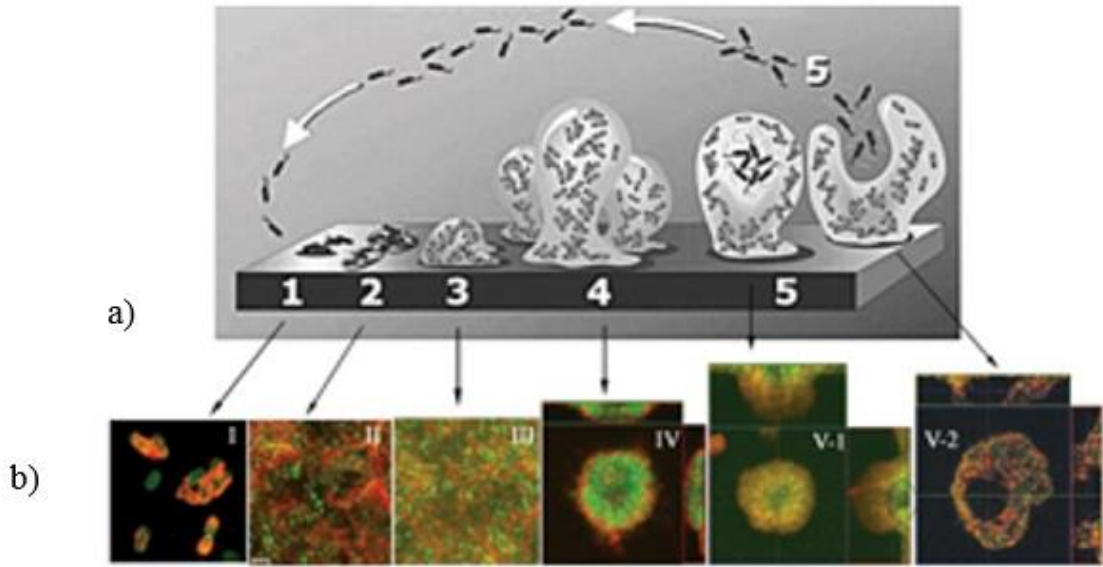
Biyofilm içerisinde transformasyonun 10-600 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Harmsen vd., 2010). Bakteriler; savunma, adezyon-kolonizasyon, yaşanabilir çevre geliştirme ve komünite kurma amacı ile biyofilm oluştururlar (Veerachamy vd., 2014). Strese cevap olarak gelişen biyofilmin oluşumunda bakteri savunma amacıyla biyofilm geliştirir. pH, dezenfektanlar, oksijen radikalleri, antimikrobiyal ajanlar, sıcaklık ve ortamdaki besin miktarının azlığı gibi bakterinin yaşamını güçleştirecek çeşitli çevresel koşullar etkili olur (Lazar, 2011).

Bakteriler bir yüzeye tutunarak (adezyon) çoğalma (kolonizasyon) eğilimindedirler. Bu amaçla Tip IV pili ve flajel ile konakçının fibronektin, fibrinojen ve elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışır. Konakçı ile bakteri adezyonunda anahtar rol oynayan bu yapılar sayesinde bakteri, konakçıya tutunarak çoğalmaya ve biyofilm oluşturmaya başlar (Harmsen vd., 2010). Ekzopolisakkarit ekspresyonunun artması bakteriyi dış ortam koşullarına karşı korur. Özellikle glukoz bulunan ortamlarda, bakteri hayatta kalabilmek amacıyla biyofilm oluşturur. Biyofilm içerisinde, bakterilerin çevresel koşullara uyum sağlamasında rol oynayan genlerin aktifleşmesinden dolayı biyofilm oluşumunda rol oynayan sesil bakteriler, serbest olan planktonik bakterilerden fenotipik olarak farklı özellik gösterir. Buna bağlı olarak bakteri, yaşanabilir bir çevre oluşturmak amacıyla hücre yüzey elemanları, adezyon ve agregasyon molekülleri gibi proteinleri sentezler. Ayrıca biyofilm içerisindeki bakterilerin komünite kurarak toplu olarak yaşamalarının en önemli göstergesi çevre faktörlerine karşı aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleridir (Veerachamy vd., 2014).

Biyofilm tabakasına; katater, kontakt lens, implantlar, solunum cihazları, rahim içi araçlar, eklem ve kalp protezleri gibi yüzeylerde, ayrıca böbrek taşı, akciğer dokusu ve kistik fibrozisli hastaların solunum yollarında rastlanılmaktadır. Bunun yanı sıra su ile temas eden tüm yüzeylerde örneğin endüstriyel ve evsel su sistemlerinde, su ileten borularda, su arıtma depolama tesislerinde ve soğutma ünitelerinde de biyofilm oluşumu görülmektedir. Özellikle su ile ilgili sistemlerdeki biyofilmin, demiri indirgeyip korozyon yaparak borularda yeni tutunma yüzeyleri oluşturduğu bilinmektedir (Costerton, Stewart ve Greenberg, 1999; Sezgin, 2012). Hücreler arası sinyal iletiminde önemli rol oynayan QS moleküllerinin, biyofilm oluşumunda ve virülans faktörlerin sentezinde gerçekleşen önemli bir mekanizma olduğu da bilinmektedir (Mukherjee vd., 2017).

2.9.2. Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm tabakası karmaşık bir dinamiğe sahip olup, ortamda besin varlığında oluşmaya devam eder. Besin miktarı tükendiğinde yüzey bağlantıları zayıflayan bakteriler, sesil formdan planktonik formlarına geri dönerler. Biyofilm tabakası; dönuşümlü tutunma, dönuşümsüz tutunma, koloni gelişimi, olgunlaşma, kopma ve ayrılma olmak üzere birbirini takip eden beş evreden oluşmaktadır (Ma vd., 2009) (Görsel 2.3).



Görsel 2.3. *Biyofilm matriks oluşumu, a) Biyofilm oluşumunun beş aşamasının şematik gösterimi. 1. Dönuşümlü tutunma, 2. Dönuşümsüz tutunma, 3. Koloni gelişimi, 4. Olgunlaşma ve 5. Kopma-ayrılma b) Yeşil florasan boya ile işaretlenen P. aeruginosa izolatlarının Biyofilm oluşum aşamalarının mikroskopik görüntüsü (Ma vd., 2009).*

Biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan dönuşümlü tutunma, bakteri ile yüzey arasında elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Vander Walls kuvvetleri gibi zayıf etkileşimlerle sağlanır. Bu aşamada yüzeye tutunan bakteriler bağımsız hareket etme yeteneğine sahiptir. Bakteriler, hidrofobik yüzeylere hidrofilik yüzeylerden daha çok tutunma eğilimindedir. Hücreler bu aşamada suyun hareketiyle kolayca dağılabilir (Akan ve Kınık, 2014; Ha ve O'Toole, 2015).

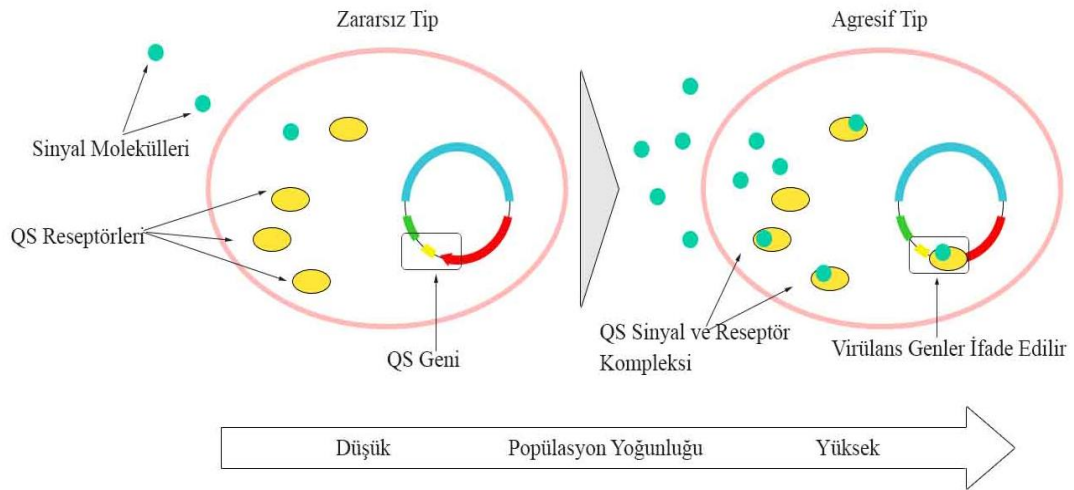
Biyofilm oluşumunun ikinci basamağı olan dönuşümsüz tutunmada, monolayer tabaka belirginleşir. Bakteriler ortama dönuşümsüz olarak tutunurken, yüzeyde yaşamlarını devam ettirebilecek şekilde besin maddesi olup olmadığını kontrol eder. şartlar uygunsa, titreme hareketinden sorumlu Tip IV pilus ve kayma hareketinden sorumlu flajel aracılığıyla yüzeye sıkıca tutunur. Bu sırada hücreler arası sinyal

molekülleri olan QS gönderilmeye ve sinyal iletimi belli seviyeye ulaştığında ise matriks üretimi başlar. Matriksin yapısını %50-90 oranlarında EPS, kalan kısmını proteinler ve ekstraselüler DNA (eDNA) molekülleri oluşturur. EPS içerisinde iyonik ve kovalent bağlar ile hidrojen etkileşimleri oluşur. Bu aşamadan sonra biyofilm tabakası enzim, yüksek ısı işlem, dezenfektan, güçlü mekanik kuvvet ve deterjanlar aracılığı ile ortadan kaldırılabılır. Ancak medikal cihazlar üzerinde meydana gelen dönüşümsüz tutunma nozokomiyal enfeksiyonlara zemin hazırlar (Tran ve Heuertz, 2016).

EPS planktonik bakterileri gıda artıklarını, mineral, kristal ve korozyon maddelerini yakalar. Hacmi genişleyen biyofilm tabakası yaklaşık olarak 10 µm ulaştığında mikrokoloni oluşumu başlar (Harsmen vd., 2010). Mikrokoloniler büyür ve mantar şeklinde kulelere dönüşür. Mikrokolonilerin arasında bulunan su kanalları aracılığı ile besin maddeleri taşınır ve atık ürünler uzaklaştırılır (Ha ve O'Toole, 2015). Biyofilm oluşumunun son aşamasında hücreler kopup ayrılarak planktonik formlarına geri döner. Artan akış kuvveti, ortamda besin maddesinin tamamen tükenmesi ve enzimatik yapının bozulması gibi faktörler biyofilm tabakasından bakteri hücrelerinin ayrılmasına neden olur. Bu bakteriler yeni genotipik özellikler kazanmış olup birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelir. Serbest hale geçen hücreler ise tekrar uygun yüzey bulduklarında biyofilm oluşturmaya devam eder (Kragh vd., 2017).

2.10. Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)

QS kelime olarak, iş bölümü için gerekli olan en az sayıdaki mikroorganizmanın bir araya gelip iletişim kurarak ortak hareket etmesi anlamına gelir. Popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak, grup davranışlarını koordine etmek için çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından kullanılan hücre-hücre iletişim sistemidir. Bakteriler bu iletişim sistemini kullanabilmek için difüze olabilen ve oto uyarıcı olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerini sentezler (Wang vd., 2015) (Görsel 2.11).



Şekil 2.11. *Quorum sensing mekanizması*

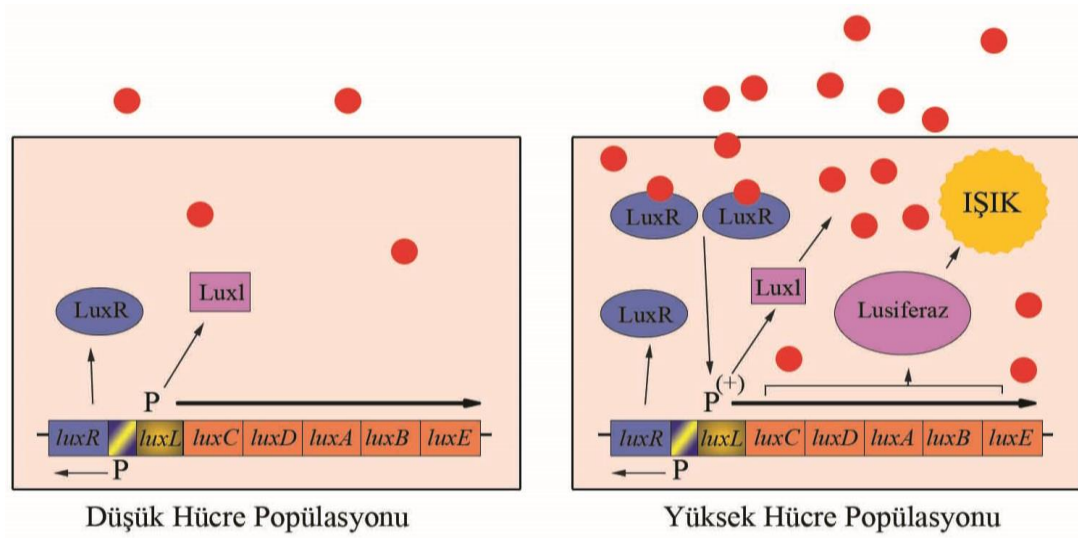
QS sinyal molekülleri bakterilerin tür içi, türler arası ve habitatlarıyla etkileşim kurlmaları açısından oldukça önemlidir. Bu sayede bakteriler; virülans faktörlerin üretimi, bakteri ve memeli hücreleri arasında etkileşim, kirleticilerin biyodegradasyonu, plazmid konjugasyonu ve biyoluminesans gibi farklı aktiviteleri koordine edebilir (Schaber vd., 2004). Bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla;

- ✓ Açıl- Homoserin Laktonlar (AHLs) (Gram negatif bakteriler)
- ✓ Oto uyarıcı peptitleri (AIPs) (Gram pozitif bakteriler) ve
- ✓ Oto uyarıcı 2 (AI-2) (Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler) olmak üzere üç tip sinyal molekülü kullanmaktadır (Antunes vd., 2010).

Bu sinyal molekülleri, yağ açıl zincirlerine amid bağıyla bağlı homoserin lakton molekülünden oluşmaktadır. Bu açillenmiş homoserin lakton moleküllerinin zincir uzunlukları 4-16 C arasında değişmekle birlikte, her bakteri türü için çeşitlilik gösterir (Soheil vd., 2015). Düşük popülasyon yoğunluğunda oto uyarıcılar, bazal seviyelerde sentzlenerek ortama difüze olur. Artan popülasyona bağlı olarak oto uyarıcı yoğunluğu eşik seviyeye ulaştığında, reseptöre bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonu ile uygun yanıt geliştirilir (Bassler ve Losick, 2010).

Bakterilerin sosyal bir yaşama dahil oldukları ilk kez 1970'lerin başlarında, deniz bakterisi olan *Vibrio fisheri* ve *Vibrio harveyi*'de biyoluminesans olayının gerçekleştiği *lux* sistemi ile ortaya konulmuştur. Bu bakterilerin yalnızken ışık üretmeyip, popülasyon yoğunluğu eşik seviyeye ulaştığında ışık üretmeye başladığı görülmüştür. Bu duruma LuxI ailesinden AHL sentaz ve LuxR ailesinden AHL reseptörü neden olmaktadır.

Vibrio fischeri veya *Vibrio harveyi*'nin popülasyonun artmasına bağlı olarak AHL sentaz üretilerek hücreden dışarıya difüze olur. Hücre dışında yeterli yoğunluğa ulaştığında, zar tarafından algılanarak tekrar hücre içerisine girer ve AHL reseptörüne bağlanması sonucu biyoluminesans olayı gerçekleşir (Silva vd., 2017) (Şekil 2.12).

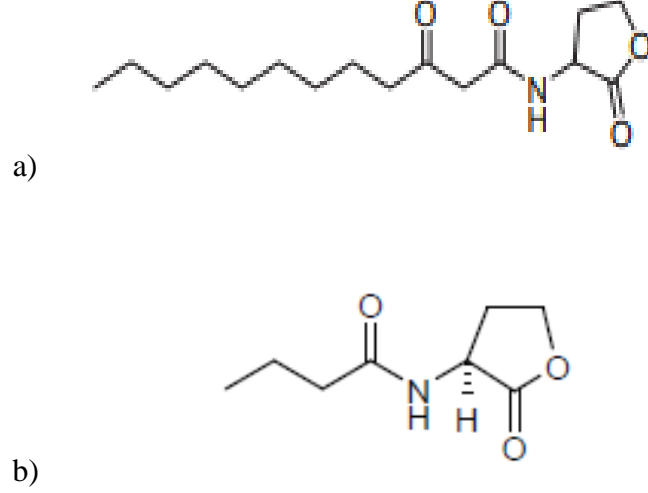


Şekil 2.12. *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*'de biyoluminesans oluşumu.

Son yıllarda ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi mikroorganizmaların QS mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür (Gera ve Srivastava, 2006). *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*'de bulunan *LuxI/LuxR* QS mekanizması, diğer Gram negatif bakterilerde bulunan QS mekanizmasına çok benzediği için *LuxI/LuxR* homoloğu olarak adlandırılır (Silva vd., 2017). Fırsatçı bir patojen olarak bilinen *P. aeruginosa*'nın tedavisi güç enfeksiyonlar oluşturmasının nedeni QS mekanizmasıyla açıklanabilir. *P. aeruginosa*'nın QS mekanizması, *LuxI/LuxR* genlerinin homoloğu olan *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* genleri tarafından gerçekleştirilir (Wang vd., 2015).

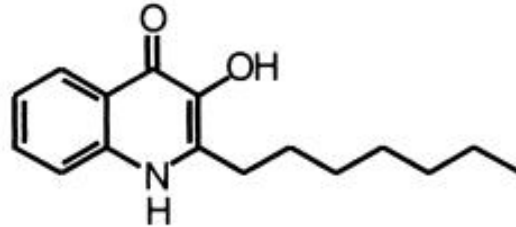
Oto uyarıcı sentez geni olan *lasI*, bir AHL sinyal molekülü olan *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton'un (3-oxo-C₁₂-HSL) (Şekil 2.13a) üretilmesinde, *lasR* ise transkripsiyonel düzenleyici proteinin sentezlenmesinde görevlidir. Yapılan son çalışmalarda ise 3-oxo-C₁₂-HSL'un varlığında *lasR*'nin hedef genlerin transkripsiyonunu başlattığı belirlenmiştir. Bir diğer oto uyarıcı sentez geni olan *rhlI*, *N*-butanoyl-L-homoserin lakton'un (C₄-HSL) (Şekil 2.13b) üretilmesinde görevlidir. *rhlR*

ise transkripsiyonel düzenleyici proteinin sentezlenmesinde görev almaktadır (Harmsen vd., 2010) (Şekil 2.15).



Şekil 2.13. Oto uyarıcı sentez gen ürünlerinin molekül yapısı a) *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserin lakton (3-oxo- C_{12} -HSL) molekülü (Soheil vd., 2015), b) *N*-butanoyl *L*-homoserin lakton (C_4 -HSL) molekülü (Pesci vd., 1999)

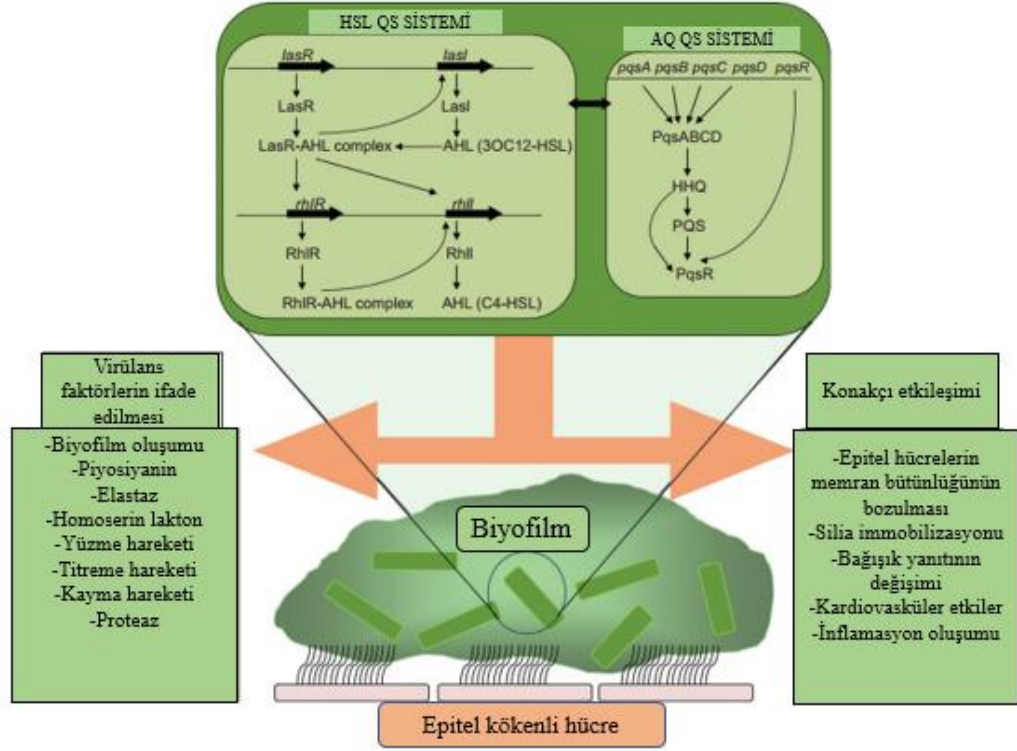
Bu sistemler birbirinden bağımsız olmayıp, las sistemi genlerinin ifade edilmesi rhl sistemi genlerinin ifade edilmesini pozitif olarak düzenlemektedir. Ayrıca bu sistemlerin dışında kalan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (PQS) sinyal molekülü sisteminin de *P. aeruginosa*'ya ait olduğu bilinmektedir. PQS sinyal molekülü, *P. aeruginosa*'da bulunan HSL sinyal moleküllerinden farklı olup antimikrobiyal kinolonlara benzerlik göstermektedir. PQS sinyal molekülünün ifade edilebilmesi için *lasR* geninin bulunması gerekmektedir (Pesci vd., 1999) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. PQS'un (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) molekül yapısı (Pesci vd., 1999).

P. aeruginosa'da 2.5.1'de anlatıldığı gibi virülans faktörlerinin üretiminin yanı sıra biyofilm oluşumu da QS sinyal iletimi sistemi tarafından düzenlenir. Bu sistem

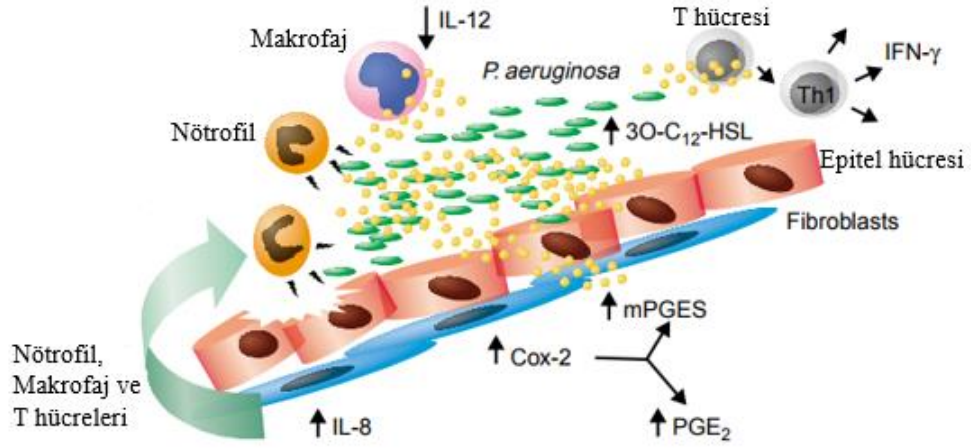
içerisinde RpoS, RsaL, GacA ve Vfr gibi regülatörler de rol almaktadır (Mukherjee vd., 2017) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. *P. aeruginosa*'da QS sinyal iletim yolağının şematik gösterimi, (Hurley, Camara ve Smyth, 2012).

Hücrelerarası iletişim *P. aeruginosa*'nın konak savunma sistemine karşı koymasındaki en önemli mekanizmalarından biridir. Bu sistemin işlemediği yani bakteri sayısının az olduğu durumda virülans faktörler konağın savunma sistemi tarafından algılanarak bakteriler yok edilecektir. QS sayesinde, *P. aeruginosa* popülasyonunun yoğunluğu eşik seviyeye gelmeden bakteri virülans faktörlerini ortama salgılamayacaktır. *P. aeruginosa* konağın savunma sistemine karşı koyacak düzeye ulaştığı zaman, QS genlerinin ifade edilmesine bağlı olarak virülans faktörler sentezlenmeye başlayacaktır. Böylece, sistemik inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi ile vücut direnci düşecektir. Ayrıca virülans faktörlerin etkisiyle lenfosit proliferasyonunun baskılanması sonucunda tümör nekroz faktör inhibe edilerek interferon benzeri sitokinler salınmaktadır. Bunun sonucu olarak T yardımcı hücresi-2'nin (Th-2) öncü olduğu inflamasyon meydana gelmektedir (Donabedian, 2003). Özellikle 3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL moleküllerinin epitel hücrelerin göçüne ve proinflamatuvar sitokinleri uyarak inflamasyon bölgesinde makrofaj, nötrofil, IL-8 ve diğer kemokinlerin

birikmesine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Simith ve Iglewski, 2003; Waugh ve Wilson, 2008; Gellatly ve Hancock, 2013; Roussel vd., 2016) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında konağa 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün etkisi (Simith ve Iglewski, 2003).

Bakteriye ait virülans faktörler özellikle 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülleri bariyer görevi gören epitel hücrelerin bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, bu virülans faktörlerin tam olarak anlaşılacak engellenmesi ile inflamasyonların önüne geçilmesine yönelik Quorum-Quenching (QQ) ile ilgili yapılan çalışmalar güncel stratejiler arasında yer almaktadır (Huang vd., 2016; Sedlmayer vd., 2017). QS mekanizmasının tam olarak anlaşılması ile enfeksiyonların tedavisinde önemli olacağını düşünüyoruz. Bu amaçla bu çalışma kapsamında; *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda antibiyotik duyarlılık profillerinin ve virülans faktörlerinin belirlenerek epitel hücreler üzerindeki olası etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan antibiyotikler

Disk diffüzyon yöntemi için kullanılan antibiyotik diskleri olan kolitsin (CT; 10 µg, CASD00250), levofloksasin (LEV; 5 µg, ASD04800), tobramisin (TOB; 10 µg, ASD09201), gentamisin (CN; 10 µg, ASD04405), meropenem (MEM;10 µg, ASD05400), imipenem (IPM; 10 µg, ASD04500), seftazidim (CAZ; 30 µg, ASD02100) ve piperasillin-tazobaktam (PTZ; 100/10 µg, ASD07620) Bioanalyse firmasından temin edilmiştir.

Mikrodilüsyon testi için kullanılan kolitsin (CT; 100 mg, 1264-72-8), levofloksasin (LEV; 1 gr, 100986-85-4), tobramisin (TOB; 1 gr, MFCD00133864), gentamisin (CN; 250 mg, 1405-41-0) toz antibiyotikleri Sigma-Aldrich firmasından, meropenem (MEM; 110 mg, 119478-56-7), imipenem (IPM; 100 mg, I0090000), seftazidim (CAZ; 200 mg, 78439-06-2), piperasillin (PRL; 100 mg, 66258-76-2) ve tazobaktam (USP; 200 mg, 89785-84-2) toz antibiyotikleri ise European Pharmacopeie firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Mikrobiyolojik ve moleküler analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler

Gram boyama seti (311002103) Kimsan'dan; oksidaz Remel™ (R21540); kanlı agar (A5978) RTA'dan; gliserol (G5516), glukoz (G8270), safranin (S2255), aseton (67-64-1), KCl (P9333), NaCl (S9888), KH₂PO₄ (1551139), Na₂HPO₄ (S7907), HCl (H1758), X-Gal (7240-90-6), dimetil sülfoksit (DMSO, 472301), agar (A1296), sakkaroz (84097), kongo kırmızısı (C6277), NaOH (S0899), MgCl₂.6H₂O (5982), CaCl₂.2H₂O (21065), elastin kongo kırmızısı (E0502), tris HCl (T5941), trizma base (T1503), borik asit (B6768), K₂SO₄ (31270), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, 60-00-4) ve etidyum bromür (E1510), Sigma'dan; kristal viyole (115940), metanol (106009) ve etanol (100983), kloroform (102445) Merck'den; tripton (MC005), yeast ekstrakt (LAB018), pepton (MC024) ve nütrient broth (LAB068) LabM'dan; GeneJET DNA izolasyon kit (K0721), dNTP karışımı (R0191), Taq DNA polimeraz (EP0402), 100 bç DNA ladder (SM0241) ve DNA jel yükleme boyası (R0611) Thermo Fisher firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Hücre kültürü ve protein analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler

Dulbecco's modified eagle's medium L-glutamin ve yüksek glukoz içeren (DMEM, D5648), penisilin-sterptomisin (P4458), tripsin-EDTA (T4049), fötal sığır serumu (FBS, F7524), NaHCO₃ (S5761) , 3-oxo-C₁₂-HSL (O9139), MTT (M2128), tripan mavisi (T8154), bromfenol mavisi (B0126), formaldehit (F8775), MOPS (M1254) Sigma'dan; RNA izolasyon kiti Macherey-Nagel'den; β-merkapt etanol (M131) Amresco'dan; formamit (104008) ve glisyal asetik asit (100056) Merck'den; RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (K1621), Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (K0221), Mem-PERTM Plus protein izolasyon kiti (89842), PierceTM BCA protein assay kiti (23225), Cox-2 birincil antikor (MA1-12233), IL-8 birincil antikor (RA227318), β-aktin house keeping antikor (MA5-15739) Thermo Scientific'den; Novex[®] iBlot % 4-12 bis tris plus mini gels (XP04125BOX), NovexTM iBlot 2 transfer stacks, PVDF mini (IB24002), 20X Novex boltTM MES SDS koşturma tamponu (1658571) İnvitrogen; albumin, bovine (BSA, 0135C416) Ambresco'dan goat-anti mouse IgG-HRP (sc-2005) Santa Cruz'dan temin edilmiştir.

3.1.4. Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Triptik Soy Agar (TSA, Merck, Darmstadt, Germany, 105458):

Ticari besiyeri 40 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içerisinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,1±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş ve perilere dökülerek donması için bekletilmiştir.

Triptik Soy Broth (TSB, Merck, Darmstadt, Germany, 105459):

Ticari besiyeri 30 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içerisinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,1±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Eozin Metilen Blue Agar (EMB, Merck, Darmstadt, Germany, 101347):

Ticari besiyeri 36 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,0±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş petrilere dökülerek donması için bekletilmiştir.

Brain Heart Infusion Broth (BHI, Merck, Darmstadt, Germany, 110493):

Ticari besiyeri 37 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck, Darmstadt, Germany, 105437):

Ticari besiyeri 35 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş petrilere dökülerek donması için bekletilmiştir.

Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstadt, Germany, 110293):

Ticari besiyeri 21 g/L olacak şekilde 95°C'lik su banyosu içinde 30 dk tamamen çözünmesi için bekletilmiştir. pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Katyon ayarı için; hazırlanan MHB'nin tamamen soğuması beklendikten sonra her litrede 1 mg'lık artış sağlamak için 0,4 M MgCl₂.6H₂O ve 0,2 M CaCl₂.2H₂O stok çözeltisinden litre başına 0,1 mL ilave edilmiştir.

Luria Bertani Agar (LBA):

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tripton	10
Yeast ekstrakt	5
NaCl	5
Agar	15

Besiyeri distile suda çözüldükten sonra, pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiş 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Luria Bertani Broth (LBB):

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tripton	10
Yeast ekstrakt	5
NaCl	10

Besiyeri distile suda çözüldükten sonra, pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiş 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Kongo kırmızısı agar:

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Sakkaroz	50
Agar	10
Brain Heart Infüzyon Broth	37
Kongo kırmızısı	0,8

İçerik dH₂O' da çözülerek pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Titreme hareketi için agar:

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tripton	10
Yeast ekstrakt	5
NaCl	5
Agar	10

olacak şekilde dH₂O' da çözülerek pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır. 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Elastin kongo kırmızısı tamponu:

Tris 100 mM, CaCl₂ 1mM olacak şekilde hazırlanmış, pH 7.2±0,2'ye ayarlanmış her mikrosantrifüj tüpünün 1 mL'sinde 10 mg/mL elastin kongo kırmızısı ilave edilmiştir.

Kayma hareketi için agar:

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Nütrient broth	8
Agar	5
Glukoz	5

olacak şekilde dH₂O' da çözülerek pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C 'de 15 dk otoklavlanmıştır. 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Yüzme hareketi için agar:

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tripton	10
Agar	3
NaCl	5

olacak şekilde dH₂O'da çözülerek pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır. 50-55°C'lik su banyosunda soğutulup steril petrilere dağıtılmıştır.

Piyosyanin Broth (PB):

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Pepton	20
MgCl ₂	1,4
K ₂ SO ₄	10

dH₂O' da çözülerek pH 7,2±0,2'ye ayarlanmış 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

Serum fizyolojik:

NaCl 0,1 g/L olacak şekilde dH₂O'da çözülerek 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

Safranin çözeltisi:

Safranin 0,25 g, alkol (%95) yardımı ile tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra toplam hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O ilave edilmiştir. Bir gece bekletilerek whatman filtre kağıdı ile süzülüp hazırlanmıştır.

Kristal viyole çözeltisi:

Kristal viyole 0,25 g, alkol (%95) yardımı ile tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra toplam hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O ilave edilmiştir. Bir gece bekletilerek whatman filtre kağıdından süzülüp hazırlanmıştır.

DNA primerler

Integrated DNA Technologies firması tarafından sentezlenen primerler 100 µM olacak şekilde dH₂O'da stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 10:100 seyreltme yapılarak 10 µM'lık primer stoğu elde edilmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Tris-Borik asit- EDTA tamponu (TBE, 10X):

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Trizma base	108
Borik asit	55
EDTA	7,5 (pH 7,5-7,8)

kimyasalların tümü dH₂O ile çözülerek hazırlanmıştır. Çalışmalar sırasında 1X'e seyreltilerek kullanılmıştır

DMEM (10X):

13,6 g toz DMEM, 100 mL dH₂O kullanılarak çözülmüştür. pH 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0,20 µm filtre yardımı ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır. DMEM 1X'e dilüsyon edilerek kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan %10 FBS içeren 1XDMEM miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
1X DMEM	85
%10 FBS	10
NaHCO ₃	4
Penisilin/streptomisin	1

5X formaldehit jel yürütme tamponu:

<u>İçerik</u>	<u>Konsantrasyon</u>
MOPS	0,1 M
NaCH ₃ COO	40 mM
EDTA	5 mM

dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. Son konsantrasyonu 1X olacak şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

%1'lik formaldehit agaroz jelin hazırlanması

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Agaroz	0,3 g
%37'lik Formaldehit	5,5 mL
5X Formaldehit jel yürütme tamponu	6 mL

Agaroz, 19 mL nükleazsız dH₂O içerisinde mikrodalga fırında çözülmüştür. Karışıma formaldehit ve 5X formaldehit jel yürütme tamponu ilave edilmiş, elektroforez kasetine dökülerek jelin donması için bekletilmiştir.

RNA örneklerinin hazırlanması

<u>İçerik</u>	<u>Miktar (µL)</u>
RNA örnekleri	4
5X Formaldehit jel yürütme tamponu	2
%37'lik Formaldehit	3,5
Formamid	10

olacak şekilde hazırlanan karışım 15 dk 60 °C' sıcak su banyosunda bekletildikten sonra 1-2 dk buz üzerinde bırakılarak 5 sn santrifüj edilmiştir. Örnekler 1,5 µL 2X yükleme tamponu ilave edilerek hazırlanmıştır.

RNA yükleme tamponu (2X):

<u>İçerik</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Gliserol	%50
EDTA	1 mM
Bromfenol mavisi	%0,25
Ksilen siyanol	%0,25

olan RNA yükleme tamponu kullanılmıştır.

10X Tween-20 içeren tris tamponu (10X TBST):

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris base	24,2 g
NaCl	80 g
Tween-20	10 mL

olacak şekilde dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7,6'ya ayarlanmıştır.

Strip tamponu:

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Tris base	6,1 g
SDS	20 g
β -merkaptoetanol	7,8 mL

olacak şekilde hazırlanıp dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanarak pH 6,8'e ayarlanmıştır.

Bloklama tamponu:

Bovine serum albümin (BSA) 5 g alınarak 100 mL 1X TBST içerisinde çözünerek kullanılmıştır.

RNA primerler:

Oligomer firması tarafından sentezlenen primerler 100 μ M olacak şekilde dH₂O ile stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 10:100 seyreltme yapılarak 10 μ M'lık primer stoğu elde edilmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

Hastane kökenli *P. aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin QS yönünden değerlendirilmesi ve epitel hücrelerindeki etkilerinin araştırılması; mikrobiyolojik, moleküler ve memeli hücre kültüründe gen anlatımı analizleri (gerçek zamanlı PZR ve protein analizleri) olmak üzere üç ana başlık altında verilmiştir.

3.2.1. Mikrobiyolojik Analizler

Klinik izolatların tanımlanması, antibiyotik duyarlılık testleri, virülans faktörler ve biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kullanılan fenotipik testler aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir

3.2.1.1. Klinik izolatlar, referans suşlar ve bakteriyal izolatların saklanma koşulları

Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına polikliniklerden gönderilen ve hastanede yatan hastalara ait örneklerden, toplam 100 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatları temin edilmiştir. Çalışmada insan kaynaklı izolatların kullanılması sebebiyle 27.03.2014 tarihinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan OMÜ KAİK 2014/577 karar no'lu etik kurul belgesi alınarak çalışmaya başlanmıştır. Aynı hastaya ait farklı örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. İzolatların tanımlanması; gram boyama, pigment oluşumu, oksidaz testi, koloni morfolojisi, aromatik koku varlığı ve kanlı agarda β hemoliz varlığı gibi konvansiyonel yöntemlerle birlikte Phoenix 100 BD otomatize sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks) ile yapılmıştır.

Fenotipik ve genotipik testler için kontrol olarak aşağıda verilen dört farklı referans suş kullanılmıştır.

1. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853: Antibiyotik duyarlılık testlerinde pozitif kontrol

2. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 15692: Biyofilm oluşumunda ve virülans faktörlerin belirlenmesi sırasında yapılan testlerde pozitif kontrol

3. *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922: Biyofilm oluşumunda ve virülans faktörlerin belirlenmesi sırasında yapılan testlerde negatif kontrol

4. *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*, *Rhizobium*) ATCC 51350: Homoserin lakton varlığının araştırılması için indikatör suş

Klinik izolatlar ve referans suşlardan üçü (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *E. coli* ATCC 25922) %20'lik gliserol bulunan BHI içerisinde, daha sonra yapılacak olan çalışmalar için -20 °C'de ve sonrada -80 °C'de (Sanyo) dondurularak saklanmıştır. Çalışma sırasında, bakterilerin aktive edilmesi amacıyla her bir klinik suş, kanlı agar plaklarına yuvarlak uçlu öze ile pasajlanmış ve plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek taze kültürler hazırlanmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde bu plaklarda üreyen taze koloniler kullanılmıştır. Bir diğer referans suş olan *A. tumefaciens* ATCC 51350 ise 20 µg/mL gentamisin ve %20'lik gliserol, BHI içerisinde daha sonra yapılacak olan çalışmalar için -20 °C'de ve sonrada -80 °C'de dondurularak saklanmıştır. Çalışma sırasında *A. tumefaciens* 20 µg/mL gentamisin içeren Luria Bertani Agar'da (LBA) üretilerek yapılan pasajlar kullanılmıştır.

3.2.1.2. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Klinik izolatların antibiyotik duyarlılıkları, disk difüzyon ve mikrodilüsyon olmak üzere iki farklı yöntemle analiz edilmiştir. Dirençli ve duyarlı izolatlar disk difüzyon yöntemi ile antibiyotiğin bakteriyi inhibe ettiği minimum konsantrasyonu ise mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.1.2.1. Disk difüzyon yöntemi

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı in vitro duyarlılıkları, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2013, s. 62) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. Klinik izolatların kanlı agarda 24 saatte üreyen kolonileri, %0,1 steril tuz solüsyonunda inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde hazırlanarak, steril bir eküvyonla MHA besiyerinin tüm yüzeyine homojen bir şekilde yayılmıştır. Kolitsin (10 µg), levofloksasin (5 µg), tobramisin (10 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), seftazidim (30 µg) ve piperasillin-tazobaktam (100/10 µg) antibiyotik diskleri steril bir pens yardımıyla plak üzerine yerleştirilmiştir. Kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Disklerin inhibisyon zon çapları, 35 °C'de 18 saatlik inkübasyondan sonra kumpas ile milimetre cinsinden ölçülerek

CLSI kriterlerinin önerdiği sınır değerlerine göre yorumlanmıştır (Tablo 3.1). Orta derecede duyarlılık gösteren suşlar dirençli kabul edilmiştir.

Tablo 3.1. Disk difüzyon için test edilecek olan antibiyotikler ve sınır değerleri

Test Grupları	Antimikrobiyal Ajan	Disk İçeriği (µg)	Zon Çapları		
			S	I	R
A	Gentamisin (Amoninoglikozit)	10	≥15	13-14	≤12
A	Tobramisin (Amoninoglikozit)	10	≥15	13-14	≤12
B	Levofloksasin (Florokinolon)	5	≥17	14-16	≤13
A	Seftazidim (Sefalosporin)	30	≥18	15-17	≤14
B	Piperasilin-Tazobaktam (β-Laktam/β-Laktamaz inhibitör konsantrasyonu)	100/10	≥21	15-20	≤14
B	İmipenem (Karbapenemler)	10	≥19	16-18	≤15
B	Meropenem (Karbapenemler)	10	≥19	16-18	≤15
O	Kolitsin (Lipopeptit)	10	≥11	-	≤10

S: Duyarlı, I: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli grup. A: Spesifik organizma grupları için rutin kullanılan, Grup B: Öncelikli olarak dirençli organizmalar için kullanılan, Grup O: Organizma grupları için klinik belirteçlere sahip antimikrobiyal ajanlardır.

3.2.1.2.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Antimikrobiyal ajanların, bakterilerin gelişimine engel olduğu en düşük doz olarak bilinen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), *P. aeruginosa* için CLSI kriterlerinin önerdiği antibiyotikler seçilip, katyon ayarı yapılan MHB kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır.

Bu yöntem için öncelikle steril U tabanlı MİK plağının tüm kuyucuklarına, katyon ayarı yapılmış olan MHB besiyerinden 100 µL dağıtılmıştır. Uygulanmak istenilen antibiyotik konsantrasyonu, iki üst katı şeklinde hazırlanarak, sadece 2 numaralı sütündeki kuyucuklara 100 µl antibiyotik ilave edilerek, 2. kuyudan itibaren bir sonraki kuyuya aktarılarak seri dilüsyon yapılmıştır. Bir numaralı sütündeki kuyucuklara ise, antibiyotik konulmayıp bakteri üreme kontrolü (pozitif kontrol) olarak kullanılmıştır. Seri dilüsyonda 11. kuyucuğa kadar gelinerek 12 numaralı sütündeki kuyucuklar besiyeri sterilite kontrolü (negatif kontrol) olarak belirlendiği için dilüsyon yapılmamıştır. 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden %0,1 steril tuz solüsyonunda 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp, 1/10 (~10⁷ CFU/mL) oranında dilüe edilerek tüm satıra ayrı bir bakteri süspansiyonundan 5'er µL olacak şekilde 11. kuyucuğa kadar eklenmiştir. Bakterinin son konsantrasyonu ~ 5 x 10⁵ CFU/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Antibiyotiklerin konsantrasyon aralıkları; seftazidim 128-0,25 µg/mL, gentamisin 64-0,125 µg/mL, levofloksasin 64-0,125 µg/mL, imipenem 64-0,125 µg/mL, meropenem 32-0,062 µg/mL, tobramisin 64-0,125 µg/mL, kolitsin 32-0,062 µg/mL ve piperasilin-tazobaktam 256/4-0,5/4 µg/mL olarak ayarlanmıştır.

Kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılarak hazırlanan plaklar 35 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra, gözle üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK değeri olarak belirlenmiştir (CLSI, 2013, s. 62).

3.2.1.3. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu, tüpte ve mikrotitrasyon plağı olmak üzere iki ayrı yöntemle araştırılmıştır.

3.2.1.3.1. Tüpte biyofilm üretimi yöntemi

Tüpte biyofilm oluşumu, Christensen vd., (1985) uyguladığı yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) kanlı agarda 24 saat üreyen kolonilerinden, %0,1 steril tuz solüsyonunda inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlanmıştır. %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri polistren tüplere (12X75 mm) 5 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüplere, 0,5 McFarland’da hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 µL inoküle edilmiştir. Biyofilm oluşumunu sağlamak için 37 °C’de 48 saat boyunca 150 rpm’deki inkübasyon sonrasında tüp içeriği boşaltılıp distile suyla üç kez yıkanmıştır. Tüpler kuruduktan sonra 5 mL %0,25’lik safranin eklenmiş ve 30 dk bekletilerek oluşan biyofilm tabakasına boyanın nüfuz etmesi sağlanmıştır. Süre sonunda tüplerin içindeki boya solüsyonu boşaltılıp, distile suyla üç kez yıkanarak tüpler kurumaya bırakılmıştır. Değerlendirmede, tüp yüzeyinde pembe-kırmızı renkli film tabakasının görülmesi, pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Tüpte boya tabakasının bulunmaması ise biyofilm üretimi negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşu kullanılmıştır (Christensen vd., 1985; Davey, Caiazza ve O’Toole, 2003; Kirisits vd, 2005).

3.2.1.3.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) kantitatif olarak biyofilm oluşum kapasiteleri, Stepavonic vd., (2000) uyguladığı mikrotitrasyon plağı yöntemi modifiye edilerek araştırılmıştır. Bu amaçla klinik suşların kanlı agarda 24 saat üreyen kolonilerinden %0,1 steril tuz solüsyonunda inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, polistren tüplere (12x75 mm) 5 mL %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri ilave edilmiştir. Bu tüplere önceden bulanıklık derecesi ayarlanmış her bir bakteri süspansiyonu 1/50 oranında olacak şekilde ilave edilmiş ve tüpler vortekslenmiştir. Hazırlanmış bu bakteri süspansiyonlarından 150'şer μ L alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağı kuyucuklarına ilave edilerek, 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek tekrarlı üç kuyu olarak çalışılmıştır. İnkübasyonun ardından sıvı besiyeri dökülüp, plaklar üç kez nazikçe steril fosfat tamponu (PBS, pH 7,2) ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutulmuştur. Böylece yüzeye yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kuyucuklarda oluşan biyofilm tabakasının fiksasyonunu sağlamak amacı ile %99'luk metanol ilave edilerek 15 dk bekletilmiştir. Kuyucuklardan metanol boşaltılarak kuruması sağlandıktan sonra, 150 μ L %0,1 kristal viyole ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve biyofilm oluşturmuş hücrelerin boyanması sağlanmıştır. İnkübasyon sonucu kuyucuklardaki boya, oluşan biyofilm tabakasına zarar vermeden boşaltılarak üç kez dH₂O ile yıkayıp kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutulmuştur. Daha sonra kuyucuklara 150 μ L etanol/aseton (80:20) ilave edilip 15 dakika bekletilerek, boyanan biyofilm tabakasının çözülmesi sağlanmıştır. Plaklar dalga boyu 570 nm olan mikroparka ölçüm cihazında (Multiscan GO, Thermo Scientific) okutulmuştur. Optik dansite (OD) değerlerine göre biyofilm oluşumu negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak yorumlanmıştır. Her bir bakteri örneği için üç kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır. Sonuçlar biyofilm oluşturmayan *E. coli* ATCC 25922 ve biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşlarından elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlanmıştır (Stepavonic vd., 2000; Silva vd., 2014).

3.2.1.4. Kongo kırmızısı agar yöntemi ile biyofilm üretiminin belirlenmesi

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) biyofilm üretimi kongo kırmızısı indikatörü ile test edilmiştir. Bu amaçla her bir klinik izolatın 24 saatlik taze

kolonilerinden alınıp, kongo kırmızısı agara yuvarlak uçlu öze ile ekimleri yapılmış ve plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ortam pH' sının değişimine bağlı olarak parlak siyah koloni oluşturan izolatlar biyofilm pozitif, pembe renkli ya da renksiz koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif sonuç veren izolatlar, oda sıcaklığında 24 saat daha inkübe edilerek sonuçlar biyofilm yönünden tekrar değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak biyofilm oluşturmeyen *E. coli* ATCC 25922 suşu ve pozitif kontrol olarak ise biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşu kullanılmıştır (Freeman, Falkiner ve Keane 1989).

3.2.1.5. Homoserin lakton (HSL) oluşumu için cross-feeding test

HSL moleküllerinin varlığını belirlemek için cross-feeding testi yapılmıştır. Bunun için öncelikle 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), 20 mg/mL olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüştür. Daha sonra, hazırlanan X-Gal'den LB agar üzerine 40 μ L ilave edilmiş, cam drigalski çubuğu ile besiyerinin tüm yüzeye yayıldıktan sonra plaklar 37°C'de 1-2 saat kurutulmuştur. Bu besiyerine steril eküvyon ile HSL için belirteç olan *A. tumefaciens* ATCC-51350 suşu ve klinik izolatların (n:100) 1 cm ara ile ekimleri yapılmıştır. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilerek renk değişiklikleri gözlemlenmiştir (Shaw, Ping ve Daly, 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001).

3.2.1.6. Hareketlilik Testleri

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında (n: 100) titreme, kayma ve yüzme olmak üzere üç farklı hareketlilik özelliği araştırılmıştır.

3.2.1.6.1. Titreme hareketi testi

Klinik izolatların her biri %1'lik LB agara iğne uçlu öze ile inoküle edildikten sonra, 30 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Agar ile polistiren yüzey birleşimindeki bulanık alanı belirlemek için, petri ler ters çevrilerek agar öze yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Distile su ile petri yüzeyi yıkanıp yapışmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, zemin %1'lik kristal viyole ile kaplanarak 15-20 dk bekletilmiş, süre sonunda suşların hareket ettiği alanın boyanmıştır. Boyanmış alanın çapının ölçülmesiyle titreme hareketi belirlenmiştir. Titreme hareketine sahip olan *P.*

aeruginosa ATCC 15692 ve titreme hareketine sahip olmayan *E. coli* ATCC 25922 referans suş olarak kullanılmıştır (Deziel, Comeau ve Villemur, 2001).

3.2.1.6.2. Kayma hareketi testi

Kayma testi için yarı katı besiyeri içeren petriler kullanılmadan önce birkaç saat oda sıcaklığında kurutulmuştur. Klinik izolatların (n: 100) her biri, iğne öze ile inoküle edildikten sonra 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu yarı katı besiyerinde, *P. aeruginosa* için tipik olan düzensiz dallanmalar gösteren kolonilerin üç farklı bölgesinin çapları ölçülerek ortalaması alınmış ve bu şekilde kayma hareketinin miktarı belirlenmiştir. Kayma hareketine sahip olan *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve kayma hareketine sahip olmayan *E. coli* ATCC 25922 referans suş olarak kullanılmıştır (Boles, Thoendel ve Singh, 2005).

3.2.1.6.3. Yüzme hareketi testi

Klinik izolatların (n: 100) kanlı agarda üreyen 24 saatlik taze kültürleri, hazırlanan besiyerine iğne öze ile inoküle edildikten sonra, 30 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnoküle edilen bölgede bakteri üremesi gözlemlendikten sonra, inokülasyon bölgesinden dışarıya doğru oluşan bulanık zon ölçülerek yüzme miktarı değerlendirilmiştir. Yüzme hareketine sahip olan *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve yüzme hareketine sahip olmayan *E. coli* ATCC 25922 referans suş olarak kullanılmıştır (Deziel, Comeau ve Villemur, 2001).

3.2.1.7. Piyosiyanın miktarının ölçümü

Klinik izolatların piyosiyanın üretim miktarlarını belirlemek için her bir klinik izolatın kanlı agardaki 24 saatlik taze kültürleri, %0,1 steril tuz solüsyonu ile 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra piyosiyanın broth besiyerine 100 µL inoküle edilmiş ve plaklar 37°C'de 48 saat çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, soğutmalı santrifüjde 3000 x g'de 20 dk (Sigma 3-30K) oluşan süpernatantın 5 mL'si 3 mL kloroform ile 3 saat ekstrakte edilmiştir. Üzerine 1 mL 0,2 N HCl ilave edilerek piyosiyanın zengin organik faz ayrılmıştır. Her bir klinik izolat için tüpün üst kısmında kalan HCl tabakasından mikropalakaların ikişer kuyucuğuna 200 µL koyularak, mikropalaka okuyucuda 520 nm'de absorbans belirlenmiştir. Test sırasında *E. coli* ATCC 25922

negatif kontrol, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Schaber vd., 2004; Carlsson vd., 2011).

3.2.1.8. Elastaz miktarının ölçülmesi

Elastaz üretim miktarlarının belirlenmesi için klinik izolatların kanlı agardaki 24 saatlik taze kültürleri, %0,1 steril tuz solüsyonu ile 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlanmış ve 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere 100 μ L inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası klinik izolatlar 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatantlarından 500 μ L alınarak, 1000 μ L Elastin Kongo kırmızısı tamponu (ERC) ilave edilip, 37 °C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR'ler 3000 x g'de 10 dk santrifüj edilip uzaklaştırılmış, süpernatantın ise 200 μ L'si mikropalakaların ikişer kuyucuğuna koyularak dalga boyu 495 nm'de mikropalaka okuyucuda ölçülmüştür. Test sırasında *E. coli* ATCC 25922 negatif kontrol, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Ohman, Cryz ve Iglewski, 1980; Rust, Messing ve Iglewski, 1994).

3.2.1.9. Proteaz üretiminin belirlenmesi

Klinik izolatların proteaz üretimini belirlemek için %2 yağsız süt tozu içeren LB agar kullanılmıştır. Test edilecek olan klinik izolatlar bir gece öncesi TSA besiyerinde 37 °C'de üretilmiştir. %0,1 steril tuz solüsyonu ile 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlanan izolatlar, %2 yağsız süt tozu içeren LB agar petrilerinin ortasına 2 μ L inoküle edilerek ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların proteolitik aktiviteleri, bakteri kültürlerinin inoküle edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek mm cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar *P. aeruginosa* ATCC-15692 kontrol suşuyla karşılaştırılmıştır (Dong vd., 2005).

3.2.2. Moleküller analizler

Yapılan çalışmada biyofilm oluşumundan sorumlu gen bölgelerinin belirlenmesinde PZR yöntemi uygulanmıştır.

3.2.2.1. Quorum sensing genlerinin PZR ile saptanması

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) QS mekanizmasını kontrol eden dört intakt gen (*lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR*) ile dört internal genin (*lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR*) varlığı PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla kromozomal DNA izole edildikten sonra, intakt ve internal genler için uygun oligonükleotit primerler ile değişik sıcaklık dereceleri ve sikluslarda PZR kullanılmıştır. Schaber vd.'nin (2004) yapmış oldukları çalışmada, seçtikleri primer dizilerinin *P. aeruginosa*'ya özgü olduğunu kontrol etmek amacıyla National Center for Biotechnology Information (NCBI) ¹(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından BLAST analizi yapılmıştır. *P. aeruginosa*'ya özgü olduğu görülen ve Tablo 3.2'de belirtilen primer dizileri çalışmada kullanılmıştır.

Tablo 3.2. *İntakt ve internal primer dizileri*

Primerin adı	5'→3'	Amplikon uzunluğu (bp)
QS intakt genleri		
<i>lasI</i> _F	ATGATCGTACAAATTGGTCGGC	605
<i>lasI</i> _R	GTCATGAAACCGCCAGTCG	
<i>lasR</i> _F	ATGGCCTTGGTTGACGGTT	725
<i>lasR</i> _R	GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA	
<i>rhlI</i> _F	CTTGGTCATGATCGAATTGCTC	625
<i>rhlI</i> _R	ACGGCTGACGACCTCACAC	
<i>rhlR</i> _F	CAATGAGGAATGACGGAGGC	730
<i>rhlR</i> _R	GCTTCAGATGAGGCCAGC	
QS internal genleri		
<i>lasI</i> _F	TCGACGAGATGGAAATCGATG	363
<i>lasI</i> _R	GCTCGATGCCGATCTTCAG	
<i>lasR</i> _F	TGCCGATTTTCTGGGAACC	362
<i>lasR</i> _R	CCGCCGAATATTTCCCATATG	
<i>rhlI</i> _F	CGAATTGCTCTCTGAATCGCT	143
<i>rhlI</i> _R	GGCTCATGGCGACGATGTA	
<i>rhlR</i> _F	TCGATTACTACGCTATGGCG	207
<i>rhlR</i> _R	TTCCAGAGCATCCGGCTCT	

Kaynak: Schaber vd., 2004.

3.2.2.2. DNA izolasyonu

Klinik izolatların kanlı agarda 24 saatlik taze kültürlerinden, GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak üretici firma protokolünün Gram negatif bakteriler için önerdiği direktiflere göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için; 2×10^9 bakteri hücreleri 2

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

mL'lik tüpde 10 dk 5000 g'de santrifüj sonrası pellet kısmı 180 µL digestion solüsyonla süspanse edilmiştir. 20 µL Proteinaz K solüsyonu ilave edilerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, 56 °C'de çalkalamalı su banyosunda, hücrelerin tamamen parçalanması için yaklaşık 30 dk inkübasyon sonrası, tüplere 20 µL RNase A solüsyonu eklenmiş ve karışım tekrar oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Ardından, 200 µL lizis solüsyonu ilave edilip, 15 saniye vorteks ile karıştırılmıştır. Lizata 400 µL %50 etanol eklenerek tamamının saflaştırma kolonuna transferi sağlanmış ve 1 dk 6000 g'de santrifüj edilmiştir. 500 µL yıkama tamponu I ilavesiyle 1 dk 8000 g'de santrifüj edildikten sonra, 500 µL yıkama tamponu II saflaştırma kolonuna ilave edildikten sonra, 3 dk 12000 g'de santrifüjlenmiştir. Genomik DNA elde etmek için kolon membranına 200 µL elüsyon tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra, 1 dk 8000 g'de santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiş ve kullanıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA'nın miktarını ölçmek ve saflığını kontrol etmek amacıyla Nanodrop spektrofotometre µDrop plate kullanılmıştır. DNA konsantrasyonu (µg/mL) = OD (optik yoğunluk) 260 x sulandırılma oranı x 50 (µg/mL) formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. A260/A280 ölçüm aralığındaki oran 1,8-1,9 olan DNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.2.2.1. QS intakt gen profillerinin belirlenmesi

İntakt genlerinin amplifikasyon işlemi sonucunda DNA bantlarının daha iyi görüntülenebilmesi için MgCl₂, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılmış ve Schaber vd. 'nin (2004) yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. İntakt genler için PZR reaksiyon bileşenleri Tablo 3.3'de belirtildiği gibi, toplam 25 µL hacimde (son konsantrasyonları 1X/µL Taq tamponu, 1,5 mM/µL MgCl₂, 0,08 mM/µL dNTP mix, 0,2 pmol/µL primer, 0,05 U/µL Taq DNA polimeraz ve 1,2 ng/µL kalıp DNA) olacak şekilde hazırlanıp reaksiyon ise Tablo 3.4'te verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. *İntakt lasI, lasR, rhlI ve rhlR genleri için PZR karışım oranları*

Bileşenin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM/ µL
dNTP mix (2 mM)	1	0,08 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	1	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	17,75	-
TOPLAM	25	-

Tablo 3.4. *İntakt lasI, lasR, rhlI ve rhlR genlerinin amplifikasyon programı*

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	} 34
Bağlanma	60	30 sn	
Uzaman	72	2 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Örnekler, 10 µL PZR ürünü ve 2 µL 6X yükleme tamponu ile birlikte %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenerek, 100 volt elektrik akımında 90 dk elektroforez tankında yürütülmüştür. Jel 5 µg/mL etidyum bromür içerisinde orbital karıştırıcıda 50 rpm'de 20 dakika boyanmıştır. DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bp DNA belirteci ile karşılaştırılarak görüntüleme cihazında (Fusion FX, Vilber Lourmat) fotoğraflanmıştır.

3.2.2.2.2. *QS internal gen profillerinin belirlenmesi*

İnternal genlerinin amplifikasyonu DNA bantlarının daha iyi görüntülenebilmesi için MgCl₂ ve bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılmış ve Schaber vd.,'nin (2004) uyguladıkları reaksiyon koşulları modifiye edilerek PZR karışımı hazırlanmıştır. PZR reaksiyon bileşenleri Tablo 3.5'de belirtildiği gibi, toplam 25 µL hacimde (final konsantrasyonları 1X/µL Taq tamponu, 2,5 mM/µL MgCl₂, 0,08 mM/µL dNTP mix, 0,2 pmol/µL primer, 0,05 U/µL Taq DNA polimeraz ve 1,2 ng/µL kalıp DNA) olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.5. *İnternal lasI, lasR, rhlI ve rhlR genleri için PZR değerleri*

Bileşenin adı	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM/ µL
dNTP mix (2 mM)	1	0,08 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA (30 ng/µL)	1	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	16,75	-
TOPLAM	25	-

Tablo 3.6. *İnternal lasI, lasR, rhlI ve rhlR genlerinin amplifikasyon koşulları*

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	} 32
Bağlanma	59	30 sn	
Uzaman	72	2 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Örnekler, 10 µL PZR ürünü ve 2 µL 6X yükleme tamponu ile birlikte %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenerek, 100 volt elektrik akımında 90 dakika yürütüldükten sonra, bu jele 5 µg/mL etidyum bromür çözeltisi ilave edilerek, orbital karıştırıcıda 50 rpm'de 20 dakika boyama işlemi yapılmıştır. 100 bç DNA belirteci ile karşılaştırılarak DNA bantlarının molekül büyüklüğü görüntüleme cihazında belirlenmiştir.

3.2.3. Hücre kültürü analizleri

Yapılan çalışmada, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi kapsamında ATCC'den satın alınan insan pankreas hücresi hTERT-HPNE (ATCC® CRL-4023™) Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi'nin (AÜBİBAM) hücre hattı koleksiyonundan temin edilmiştir. Hücreler %10 (v/v) fetal sıgır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin/streptomisin, %9,2 NaHCO₃ içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde, %95 nem ve %5 CO₂ atmosfer ortamında, 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hücreler 25 cm² ve

75 cm² hacimli flasklarda büyütülmüştür. Hücrelerin pasajlanması sırasında %1'lik Tripsin/EDTA kullanılmıştır.

Hücre kültürü analizlerinde, canlılık testi yapıldıktan sonra Cox-2 ve IL-8'in ifadeleri (gerçek zamanlı PZR ve Western Blot yöntemleri) belirlenmiştir.

3.2.3.1. Test maddesinin hazırlanması

Test maddesi olarak kullanılan 3-oxo-C₁₂-HSL, DMSO içinde çözülerek, 300 mM stok çözelti hazırlanmış ve küçük hacimlere bölünerek ışık görmeyecek şekilde karanlıkta +4 °C'de saklanmıştır. Taze besiyeri içinde stok madde 10 mM olacak şekilde seyreltilmiştir. Çalışmada farklı dozlarda 1,56 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM 3-oxo-C₁₂-HSL hazırlanarak kullanılmıştır. Hücrelere uygulanan tüm dozların DMSO oranı %0,1'in altında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.3.2. MTT testi ile hücre canlılıklarının (sitotoksik aktivitenin) belirlenmesi

MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) testi için Mosmann'ın (1983) önerdiği mitokondriyal aktiviteye dayalı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla, 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda büyütülen hTERT-HPNE hücreler %80 oranında yoğunluğa ulaştıkları zaman, tripsin/EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak tripan mavisi ile boyanmıştır. MTT testinde kullanılacak hücre sayısını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 96 kuyulu hücre kültür plakasının her kuyucuğunda 100 µL'de 1x10⁴, 1x10⁵, 5x10⁴ ve 5x10³ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu hücre sayısının 1x10⁴ olmasına karar verilmiştir.

96 kuyulu plakların her bir kuyucuğuna 1x10⁴ hücre/100µL olacak şekilde ekim yapılmış, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3-oxo-C₁₂-HSL'un 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonları 100 µL olarak eklendikten sonra 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra final konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde DMEM medyum içerisinde MTT solüsyonu hazırlanarak, her bir kuyucuğa 125 µL ilave edilmiş, 2 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklar içerisindeki MTT solüsyonu uzaklaştırılmış, 100 µL DMSO ilave edilerek formazan kristallerinin çözülmesi için 10 dk çalkalayıcıya bırakılmıştır. Plaklardaki hücrelerin optik dansiteleri, multiplaka okuyucuda 570 nm'de ölçülerek IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Elde edilen veriler, %0,1

DMSO ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranları %100 olarak kabul edilerek analiz edilmiştir. Her bir konsantrasyon sekiz kuyu için tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler ise ters mikroskop (Leica) ile fotoğraflanmıştır.

3.2.3.3. *hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 genlerinin ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile analizi*

3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen hTERT-HPNE hücrelerinde *Cox-2* ve *IL8* genlerinin ifadesi gerçek zamanlı PZR yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.3.3.1. *Total RNA izolasyonu ve analizi*

RNA izolasyonu kit protokolüne göre yapılmıştır. MTT sonucuna göre belirli dozlarda 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücreler, tripsin/EDTA ile muamele edilmiş, Thoma lamında 3x10⁶ hücre sayılarak, 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 350 µL RA 1 tamponu ve 3,5 µL β-merkaptoetanol ilave edildikten sonra pipetlenerek homojen hale getirilmiştir. Homojenizasyon, viskozitenin azalması ve ortamın berraklaşması için, genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak, 11.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Böylece genomik DNA kolonlarda kalarak uzaklaştırılmış olur. Ardından lizatin üzerine 350 µL etanol (%70) ilave edilerek homojen hale getirilen nükleospin RNA kolonlarına aktarılmıştır. Daha sonra, 11000 g'de 30 sn santrifüj edilerek altta kalan sıvı atılmış, kolona MBD tamponu ilave edilerek 11000 g'de 1 dk santrifüj edilip tekrar alttaki toplama tüpü içerisinde yer alan sıvı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolona 95 µL DNaz ilave ederek, 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından nükleospin RNA kolonunu yıkamak amacıyla 200 µL RAW2, 600 µL RA3 solüsyonları ilave edilerek, 11000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Daha sonra 250 µL RA3 solüsyonu ilave edilerek 11000 g'de 2 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında tam olarak kurumaması beklenen nükleospin RNA kolonu, steril 1,5 mL'lik toplama tüpüne takılarak kolona 60 µL RNazsız su ilave edilerek 11000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü içerisinde biriken RNA miktarının belirlenmesi için nanodrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

RNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (µg/mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır. A₂₆₀/A₂₈₀ ≅ 2.0 RNA örnekleri

çalışmaya dahil edilmiş, ayrıca RNA kalitesini belirlemek amacıyla formaldehit RNA jel elektroforezi yapılmıştır. Elde edilen RNA örnekleri -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

RNA kalitesi ayrıca formaldehit jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Formaldehit içeren %1’lik agaroz jel hazırlanarak tank kasetine dökülmüştür. Jel katıldıktan sonra 5 dk elektroforez sistemi çalıştırılarak porların açılması sağlanmıştır. Hazırlanan RNA örnekleri kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenerek 1X formaldehit jel tamponu elektroforez tankına dökülmüş ve 70 Volt’da 1-2 saat boyunca elektroforez gerçekleştirilmiştir. hTERT-HPNE hücrelerine ait 28S rRNA ve 18S rRNA görüntüleme cihazı ile fotoğraflanmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

3.2.3.3.2. *cDNA sentezi*

cDNA sentezi, kit protokolünün direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.7’de verilen reaksiyon bileşenleri toplam 12 µL hacimde hazırlandıktan sonra 65 °C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 3.7. *cDNA sentezi için birinci aşamada kullanılan bileşenler*

Bileşenler	Miktarı (µL)	Son konsantrasyon
Kalıp RNA	10	20 ng/µL
Oligo (dT) ₁₈ primer	1	4 µM
Nükleazsız su	1	
Toplam	12	

Tablo 3.8’de görüldüğü gibi, her bir reaksiyon 8 µL hacimde olacak şekilde hazırlanıp önce 42 °C’de 60 dk, sonra 70 °C’de 5 dk amplifiye edilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır. Gerçek zamanlı PZR uygulamasına geçilmeden primerlerin özgün olmayan bantlar oluşturup oluşturmadığını anlamak için öncelikli olarak sentezlenen cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak PZR yöntemiyle kontrol edilmiştir.

Tablo 3.8. *cDNA sentezi için ikinci aşamada kullanılan bileşenler*

Bileşenler	Miktarı (µL)	Son konsantrasyon
5X reaksiyon tamponu	4	2,5X/µL
Ribolock RNaz inhibitör (20 U/µL)	1	2,5 U/µL
10 mM dNTP karışımı	2	2,5 mM
RevertAid M- MuLV RT (200 U/ µL)	1	20 U/µL
Toplam	8	

3.2.3.3.3. Gerçek zamanlı PZR analizi

Cox-2 ve *IL-8* genlerinin ifadesi gerçek zamanlı PZR yöntemiyle ile analiz edilmiştir. NCBI veri tabanı aracılığı ile genlerin dizileri belirlenmiştir. Tablo 3.9'da belirtilen aksesyon numaraları doğrultusunda Integrated DNA Technologies (²<https://eu.idtdna.com/site>) programı yardımıyla gerçek zamanlı PZR için gerekli olan primerler tasarlanmıştır. Normalizasyon için hücre içerisinde sürekli anlatımı olan housekeeping gen olarak *β-aktin* kullanılmıştır. Tüm örnekler dört tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.9. *Primer dizileri*

Primerin adı	5'→3'	Aksesyon numarası	Amplikon uzunluğu (bç)
<i>β-aktin F</i>	CACTCTCCAGCCTTCCTTC	NM_001101.3	104
<i>β-aktin R</i>	GTACAGGTCTTTGCGGATGT		
<i>Cox-2 F</i>	TGTACCCGGACAGGATTCTA	AY462100.1	119
<i>Cox-2 R</i>	CCCTTGAAGTGGGTAAGTATGT		
<i>IL-8 F</i>	CTTGGCAGCCTTCCTGATTT	NM_000584.3	111
<i>IL-8 R</i>	GGGTGGAAAGTTTGGAGTATG		

Standart bir eğri oluşturmak amacıyla kontrol cDNA'sı yarı yarıya dilüe edilerek beş farklı standart oluşturulmuştur (1, 0,5, 0,25, 0,125 ve 0,0625 µg/µL). Tüm genlerin anlatımının belirlenmesi için gerçek zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri Tablo 3.10'da belirtildiği gibi 10 µL hacimde olacak şekilde hazırlanarak Tablo 3.11'de verilen koşullarda SYBR kanalında okuma yapan Piko Real 96 (Thermo Scientific) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

² <https://eu.idtdna.com/site>

Tablo 3.10. Gerçek zamanlı PZR bileşenlerinin oranları

Bileşenler	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	5	1X/µL
Primer Forward (10 µmol/µL)	1	1 µmol/µL
Primer Reverse (10 µmol/µL)	1	1 µmol/µL
Kalıp DNA (10 ng/µL)	1	1 ng/µL
dH ₂ O	2	-
TOPLAM	10	-

Tablo 3.11. Gerçek zamanlı PZR için amplifikasyon koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	10 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	40
Bağlanma	60	30 sn	
Uzaman	72	30 sn	

* Erime eğrisi analizi 65-95°C (0,5°C/döngü artışı, 5 sn/döngü).

Gerçek zamanlı PZR sonrasında erime eğrisi (melt curve) analizi yapılarak primerlerin özgünlüğü test edilmiştir. Livak metodu kullanılarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.2.3.4. hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 proteinlerinin ifadesinin Western Blot ile analizi

3-oxo-C₁₂-HSL (12,5 µM, 25 µM, 50 µM) uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücrelerdeki toplam protein konsantrasyonları ise Cu⁺²'den Cu⁺¹ 'e indirgenen proteinlerin bisinkoninik asit (BCA) ile verdiği renk reaksiyonlarının spektrofotometrik olarak 562 nm'de ölçülmesiyle hesaplanmıştır. Proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi uygulanmıştır. Western Blotting yöntemi kullanılarak Cox-2 proteininin saflığı, Dot Blot ile IL-8 proteininin varlığı kontrol edilmiştir.

3.2.3.4.1. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu Mem-PER™ Plus Protein izolasyon kitinin direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, MTT sonucuna göre (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) farklı 3-oxo-C₁₂-HSL dozları uygulanan hücreler, tripsin/EDTA ile muamele edildikten sonra, 4x10⁶ hücre sayısı kullanılarak, 300 x g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 3 mL hücre yıkama solüsyonundan ilave edilip, pipet yardımıyla homojen bir hale getirildikten sonra 300 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp 1,5 mL hücre yıkama solüsyonu ilave edilerek homojen hale getirildikten sonra 2 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Tekrar 300 x g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 750 µL permeabilizasyon tamponundan ilave edilerek hücre süspansiyonu vorteks yardımıyla homojen bir hale getirilmiştir. 4 °C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Permeabilize edilen hücreler 16.000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 50 µl çözünme tamponu ile pipetlenerek homojen bir hale getirilmiş ve 4°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 4°C'de 16.000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Proteinleri içeren süpernetant temiz bir tüpe alınmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Hücrelerden izole edilen proteinlerin miktar tayini Pierce™ BCA Protein Assay kitinin direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir: Bovin Serum Albümin (BSA) standardı Tablo 3.12'de belirtildiği gibi 0,025 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL ve 2 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanarak 96 kuyucuklu plakalara 25 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. İzole etmiş olduğumuz her protein örneği için 96 kuyucuklu plakalara 25 µL olacak şekilde ilave edilmiştir.

Tablo 3.12. *Bovin serum albümin standartları*

Tüp	Dilüsyon hacmi (mL)	BSA'nın kaynağı ve hacmi (mL)	Final BSA konsantrasyonu (mg/mL)
A	0	Stoktan 300	2
B	125	Stoktan 375	1,5
C	325	Stoktan 325	1
D	175	B dilüsyon tüpünden 175	0,75
E	325	C dilüsyon tüpünden 325	0,50
F	325	E dilüsyon tüpünden 325	0,25
G	325	F dilüsyon tüpünden 325	0,125
H	400	G dilüsyon tüpünden 100	0,025
I	400	0	0 (Blank)

BCA çalışma solüsyonunun hazırlanması için, 50 mL BCA solüsyon A ve 1 mL BCA solüsyon B'den (50:1, Solüsyon A:B) olacak şekilde vorteks ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım 96 kuyulu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Çalkalayıcı yardımıyla protein örnekleri ve BSA'nın, BCA solüsyonu ile 30 sn süreyle karışması sağlanmıştır. Hazırlanmış olan plaka 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra multiplaka okuyucu ile 562 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Her örnek için üç kez ölçüm alınmıştır. Protein miktarları belirlenen örnekler Western Blot analizinde kullanılmıştır.

3.2.3.4.2. Western Blot analizi

Cox-2 proteininin saflığı Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Bunun için ilk olarak yoğunluğu %4-12 olan Bis Tris Protein jel (İnvitrogen, Novex) ile kullanılmıştır. Jel, dikey elektroforez tankına (Novex® Blot Mini Gel Tank Thermo Scientific) yerleştirilmiş ve elektrotların temas edeceği yüzeye kadar yürütme tamponu olarak 1X MES SDS tamponu ilave edilmiştir. 3-oxo-C₁₂-HSL'nin (12,5 µM, 25 µM, 50 µM) farklı dozlarının uygulandığı hTERT-HPNE hücresinden izole edilen protein örnekleri Tablo 3.13' te belirtildiği gibi örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına yüklenmiştir.

Tablo 3.13. Protein örneklerinin hazırlanması

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
Potein örnekleri	65 µL
Bolt LDS sample buffer	25 µL
Bolt sample reducing agent	10 µL

Hazırlanan protein örnekleri 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra denatüre olmaları için 95 °C'de 5 dk su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler hemen buz üzerine alınmıştır. Protein belirtecinden 5 µL, örneklerden 20 µL (3 µg/µL) olacak şekilde kuyulara yüklendikten sonra 165 V ve 125 mA'lik elektrik akımı 45 dk süreyle uygulanarak protein bantlarının jelde yürütülmesi sağlanmıştır. Protein örneklerinin bulunduğu jel spatül aracılığıyla kesilerek 1X TBST çözeltisi içerisine alınmıştır.

İkinci basamak olarak, SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığına göre ayrılmış kompleks bir protein karışımı içerisinden, hedeflenen bir proteini özgün bir şekilde

saptamak için Western Blotting yöntemi kullanılmıştır. Membran üzerindeki 1-5 ng proteini belirleyebilme özelliğinde olan bu yöntem; önce jel üzerindeki proteinlerin boyama yapılmaksızın bir membrana aktarılması, daha sonra hedeflenen proteinin özgün bir immünolojik belirteçle saptanması olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Bu yöntemle proteinin kendisine özgü antikorla bağlanması sağlanır. Antijen-antikor bağlantısının gerçekleştiği bölgeler konjugat (işaretlenmiş antikor) yardımıyla belirlenir.

Protein örneklerinin membrana aktarılması için iBlot 2 jel transfer cihazı (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için; öncelikle jel kasetler arasında bir spatül aracılığıyla alınarak membran üzerine yerleştirilmiştir. Filtre kağıdı 1X TBST çözeltisiyle ıslatılarak jelin üzerine konulmuştur. Oluşabilecek hava kabarcıkları özel bir alet (roler) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. iBlot® 2 PVDF Mini Transfer Stacks içerisinde bulunan katot ıslak filtre kâğıdının üzerine yerleştirilmiştir. Tekrar roler kullanılarak hava kabarcığı ortadan kaldırılmıştır. iBlot® 2 PVDF Mini Transfer Stacks içerisinde bulunan (anot) kısmı ve PVDF membran cihaza yerleştirilmiştir. Son aşamada ise sünger kağıt (sponge) konulduktan sonra cihazın kapağı kapatılmış ve 20 V-7 dk elektrik akımı uygulanmıştır. Membran transfer işleminden sonra alınmış ve 1X TBST’de yıkanmıştır. Membrana aktarımdan sonra hedeflenen protein immünolojik etkileşimlerle saptanmadan önce, proteinlerin bulunduğu yerler dışındaki boşlukların doldurulması gerekmektedir. Bu amaçla; 1X TBST içerisinde %5’lik BSA hazırlanarak, 75 dk bir çalkalayıcı yardımıyla tüm yüzeyin kaplanması sağlanmıştır. Süre sonunda membran üç kez 5’er dk 1X TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra antikorlarla işaretlenme aşamasına geçilmiştir.

Birincil antikor bağlanması: Cox-2 birincil antikorunu kullanılmıştır. Antikor dilüsyonları üretici firma önerileri doğrultusunda %5 BSA içeren 1X TBST çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında sulandırılmıştır. Membran bu antikor çözeltisi ile +4 °C’de 14-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda membran üç kez 5 dk 1X TBST’de yıkanmıştır.

İkincil antikor bağlanması: HRP (horse radish peroksidaz) işaretli anti-mouse IgG ikincil antikorunu, içerisinde %5 BSA bulunan TBST ile 1:1000 oranında sulandırılmıştır. Membran hazırlanan bu ikincil antikor ile 60 dk çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Membran üç kez 5 dk 1X TBST ile yıkanmıştır.

Hedef protein bantlarını görüntülemek için Western Sure ECL Substrat kitinde bulunan Luminol Enhancer Solution, ECL Stable Peroxide Solution ve dH₂O eşit

hacimlerde (1:1 mL) karıştırılmış ve membran üzerine ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bantların rölatif yoğunlukları C-Digit (Li-Cor Biosciences) görüntüleme cihazı ve Image Studio Digits Programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Görüntüleme işleminin ardından, aynı membran normalizasyon için housekeeping olarak β -Aktin monoklonal mouse IgG ile muamele edilmiştir. Bu amaçla membran kurumadan önce primer ve sekonder antikorun kaldırılması için stripping işlemi gerçekleştirilmiştir. Stripping işlemine başlamadan önce membrandaki kemilüminesans substratlarından arındırmak için 1X TBST ile 3 kez 5 dk olacak şekilde yıkanmıştır. Daha sonra stripping tamponu kullanılarak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 15 dk, 10 dk, ve 5 dk olacak şekilde 1X TBST ile yıkama işlemine bırakılmıştır. Bu işlemlerin ardından membran %5'lik BSA bulunan 1X TBST içerisinde bir saat bloklanarak proteinlerin bulunduğu yerler dışındaki boşluklar doldurulmuştur. Bloklama işleminin ardından β -Aktin monoklonal mouse IgG üretici firma önerileri doğrultusunda %5 BSA içeren 1X TBST çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında sulandırılmıştır. Membran bu antikor çözeltisi ile +4 °C'de 14-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda membran üç kez 5 dk 1X TBST yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından HRP işaretli anti-mouse IgG ikincil antikor, içerisinde %5 BSA bulunan 1X TBST ile 1:1000 oranında sulandırılmıştır. Membran hazırlanan bu ikincil antikor ile 60 dk çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Membran üç kez 5 dk 1X TBST ile yıkanmıştır. Western Sure ECL Substrat kitinde bulunan Luminol Enhancer Solution, ECL Stable Peroxide Solution ile 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bantların rölatif yoğunlukları C-Digit (Li-Cor Biosciences) görüntüleme cihazı ve Image Studio Digits Programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.3.4.3. Dot Blot yöntemi

Derişim düşük protein örnekleri nitroselülöz membran üzerine damlatılarak özel proteinlerin varlığı Dot Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. İlk olarak nitroselüloz bir membran üzerine proteinler 20 μ g/ μ L olacak şekilde damlatılmıştır. Protein damlatma işleminin ardından kuruyan membran 1X TBST tamponunda çözülmüş %5'lik BSA ile yaklaşık 45 dk çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından %5 BSA bulunan 1X TBST içerisinde hazırlanmış 1:1000 oranında dilüe edilen IL-8 birincil antikor ile işaretlenmek için 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3 kez 1X TBST ile

yıkanmıştır. Membran %5 BSA bulunan 1X TBST içerisinde hazırlanmış 1:1000 oranında dilüe edilen HRP işaretli anti-mouse IgG'de 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar 3 kez 1X TBST ile yıkanmıştır. Görüntüleme için Western Sure ECL Substrat kitinde bulunan Luminol Enhancer Solution, ECL Stable Peroxide Solution ve dH₂O eşit hacimlerde (1:1 mL) karıştırılmış ve membran üzerine ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bantların rölatif yoğunlukları C-Digit (Li-Cor Biosciences) görüntüleme cihazı ve Image Studio Digits Programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.4. İstatistiksel Analizler:

Mikrobiyolojik ve hücre kültürü çalışmaları için IBM SPSS 20 paket programı kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar yorumlanırken anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanılmış olup; $p < 0,05$ olması durumunda anlamlı bir ilişkinin olduğu, $p > 0,05$ olması durumunda ise anlamlı bir ilişkinin olmadığı belirtilmiştir.

Mikrobiyolojik analizlerde; nominal değişkenlerin grupları arasındaki ilişkiler incelenirken Ki-Kare analizi uygulanmıştır. 2x2 tablolarda gözelerdeki beklenen değerlerin yeterli hacme sahip olmaması durumlarında Fisher's Exact Test kullanılmış olup RxC tablolarda ise Monte Carlo Simülasyonu yardımıyla Pearson Ki-Kare analizi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken değişkenlerin normal dağılımdan gelmemesi nedeniyle Kruskal Wallis-H Testinden yararlanılmıştır. Kruskal Wallis-H Testinde anlamlı farklılıkların görülmesi durumunda Post-Hoc Çoklu Karşılaştırma Testi ile aralarında farklılık olan gruplar belirlenmiştir. (Monte Carlo: *Gözelerdeki beklenen değerın %20 si 5'den küçük olduğu için Monte Carlo Simülasyonu yardımı ile ki kare analizi yapılmıştır.)

Hücre kültürü analizlerinde; elde edilen veriler one way ANOVA testi kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

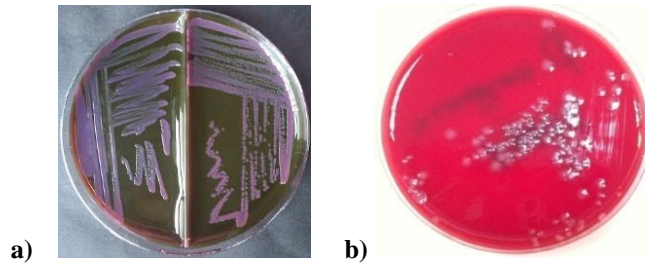
4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatları (n: 100) Mart 2014-Mart 2016 tarihleri arasında Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına polikliniklerden ve hastanede yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiştir. Bu izolatların antibiyotik direnç profilleri, biyofilm oluşturma özellikleri ve virülans faktörleri çeşitli fenotipik testlerle ve ilgili gen bölgeleri ise PZR yöntemiyle belirlenmiştir. Biyofilm oluşumunda sorumlu olan HSL moleküllerinin olası etkileri ise epitel hücre hattında araştırılmıştır.

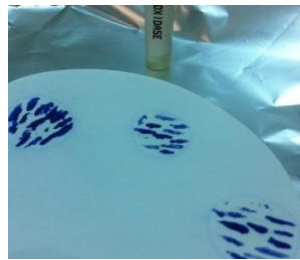
4.1. Mikrobiyolojik Analizler

4.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının tanımlanması

Klinik izolatlar ilk olarak konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmıştır. Bu amaçla, EMB agar ve %5 koyun kanı içeren agara inoküle edilmiş örnekler, 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda *P. aeruginosa* izolatlarının EMB agarda pürüklü koloni morfolojisine sahip olduğu görülmüştür (Görsel 4.1a). Aynı zamanda kanlı agara da ekim yapılarak β hemoliz özelliği test edilmiş ve Görsel 4.1b’de gösterilmiştir. Stokrom oksidaz enziminin belirlenmesi amacıyla oksidaz testi yapılarak koyu mor indofenol mavisi oluşturan izolatlar şüpheli *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır (Görsel 4.2) (Blondel, Henry ve Speert, 2007, s.734).



Görsel 4.1. *P. aeruginosa* izolatlarının farklı agarlarda tanımlanması: a) Eozin Metilen Blue agarda koloni morfolojisi b) Kanlı agarda β -hemoliz oluşumu



Görsel 4.2. Oksidaz pozitif *P. aeruginosa* izolatlarında mor renk oluşumu

Şüpheli *P. aeruginosa* olduğu düşünülen izolatlarla, otomatize sistem olan BD Phoenix tanı sistemi (Beckton Dickinson, ABD) ile tür tanımlaması yapılmış ve seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) olarak tanımlanan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastaya ait birden fazla örnek değerlendirmeye alınmamıştır. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının elde edildiği servisler Tablo 4.1 verilmiştir.

Tablo 4.1. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hastane servislerine göre sayı ve yüzde dağılımı (n:100)

Hastane servisleri	N	%
Yoğun bakım	38	38
Göğüs hastalıkları	21	21
Üroloji	12	12
İç hastalıkları	8	8
Enfeksiyon hastalıkları	6	6
*Diğer servisler	15	15

*Diğer servisler: Plastik cerrahi, onkoloji, yanık ünitesi, ortopedi-travmatoloji, kulak burun boğaz, romatoloji

İzolatların servislere göre dağılımı incelendiğinde; birinci sırada yoğun bakım ünitelerinin olduğu ve 38 (%38) *P. aeruginosa* izole edildiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra göğüs hastalıklarından 21 (%21), ürolojiden 12 (%12), iç hastalıklarından (%8), enfeksiyon hastalıklarından 6 (%6), plastik cerrahiden 6 (%6), onkolojiden 3 (%3), yanık ünitesinden 3 (%3), ortopedi ve travmatoloji, kulak burun boğaz ve romatoloji servislerinden ise 1 (%1) olarak *P. aeruginosa* izole edilmiştir.

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının elde edildiği klinik örnekler göre dağılımı ise Tablo 4.2 gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının elde edildiği klinik örneklerin sayı ve yüzde dağılımı (n:100)

Klinik örnekler	N	%
Balgam	29	29
İdrar	28	28
Trakeal aspirat	20	20
Yara sürüntüsü	18	18
Diğer	5	5

*Diğer örnekler: kan örneği ve deri sürüntüsü

Tablo 4.2’de belirtildiği gibi seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatları birinci sırada solunum yolu örneklerinden toplam 49 (%49; 29 balgam ve 20 trakeal aspirat), ikinci sırada ise idrar örneklerinden 28 (%28) elde edilmiştir.

4.1.2. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları

İzole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının öncelikle disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenmiştir. Antibiyotiklerin bakteriyi inhibe ettiği minimum konsantrasyonu belirlemek için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

4.1.2.1. İzolatların disk difüzyon sonuçları: Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri; seftazidim (30 µg), kolitsin (10 µg), gentamisin (10 µg), imipenem (10 µg), levofloksasin (5 µg), meropenem (10 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg) ve tobramisin (10 µg) antibiyotiklerine karşı test edilmiştir. Çalışmada *P. aeruginosa* (ATCC 27853) standart suşu kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar kumpas yardımıyla milimetre (mm) cinsinden ölçülerek CLSI 2013 kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 4.3’de gösterilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının direnç durumları incelendiğinde, en yüksek direnç 3. kuşak sefalosporin grubu antibiyotik olan seftazidime (%100) karşı görülmüştür. Kolistine dirençli sadece 1 izolata rastlanmıştır.

Tablo 4.3. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon sonuçları (n:100)

Antibiyotikler	R %	I %	S %
CN	32	1	67
CT	1	-	99
IPM	33	4	63
LEV	38	5	57
MEM	21	7	72
TPZ	16	18	66
CAZ	100	-	-
TOB	25	3	72

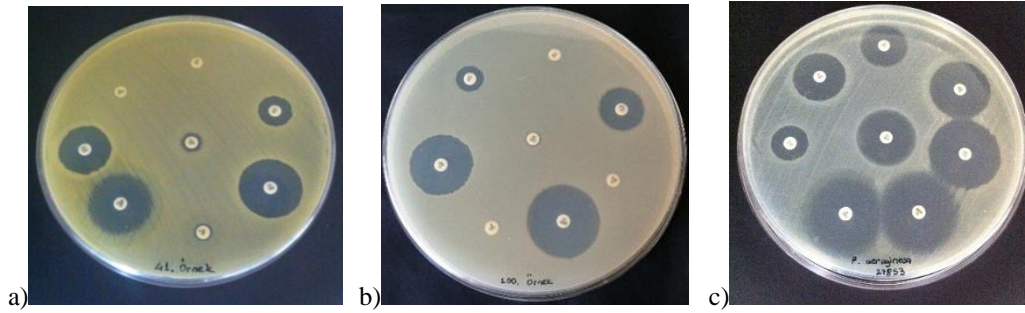
R: Dirençli, I: Orta seviyede duyarlı, S: Duyarlı, CN: Gentamisin, CT: Kolitsin, IPM: İmipenem, LEV: Levofloksasin, MEM: Meropenem, TOB: Tobramisin CAZ: Seftazidim, TPZ: Piperasilin-tazobaktam.

Hastane servisleri ile yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerin dirençlilik profilleri arasındaki ilişki incelendiğinde; hastane servisleri ile aminoglikozit grubu dirençliliği

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Yoğun bakım servisinin %21,05'i, göğüs hastalıklarının %47,62'si, üroloji servisinin %66,67'si, iç hastalıklarının %25'i, enfeksiyon hastalıklarının %33,33'ü ve diğer servislerin %20'sinin gentamisine dirençli olduğu bulunmuştur. Yoğun bakım servisinin %21,05'i, göğüs hastalıklarının %42,86'sı, üroloji servisinin %58,33'ü, enfeksiyon hastalıklarının %16,67'si ve diğer servislerin %20'sinin tobramisine dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Hastane servisleri ile karbapenem grubu antibiyotik dirençliliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Yoğun bakım servisinin %52,63'ü, göğüs hastalıklarının %23,81'i, üroloji servisinin %25'i, iç hastalıklarının %12,5'i, enfeksiyon hastalıklarının %66,67'si ve diğer servislerin %26,67'si imipeneme dirençlidir. Yoğun bakım servisinin %50'si, göğüs hastalıklarının %19,05'i, üroloji servisinin %8,33'ü, enfeksiyon hastalıklarının %33,33'ü ve diğer servislerin %13,33'ünün meropeneme dirençli olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Yoğun bakım servisinin %55,26'sı, göğüs hastalıklarının %19,05'i, üroloji servisinin %16,67'si, enfeksiyon hastalıklarının %50'si ve diğer servislerin %26,67'si piperasilin-tazobaktama anlamlı olarak dirençlidir ($p<0,05$) (Görsel 4.3, Tablo 4.4).



Görsel 4.3. *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon görüntüsü; a) 41 numaralı b)100 numaralı klinik suşların ve c) *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşunun disk difüzyon görüntüsü.

Tablo 4.4. Hastane servisleri ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişkinin dair ki kare testiyle elde edilen analizi

		Hastane servisleri														Ki Kare Testi	
		Yoğun bakım		Göğüs hastalıkları		Üroloji		İç Hastalıklar		Enfeksiyon hastalıkları		Diğer		Toplam		Ki Kare	p
		N	%	n	%	N	%	n	%	N	%	n	%	n	%		
Gentamisin	Dirençli	8	21,05	10	47,62	8	66,67	2	25	2	33,33	3	20	33	33	*	0,031
	Duyarlı	30	78,95	11	52,38	4	33,33	6	75	4	66,67	12	80	67	67		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Kolistin	Dirençli	1	2,63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	-
	Duyarlı	37	97,37	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	99	99		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
İmipenem	Dirençli	20	52,63	5	23,81	3	25	1	12,5	4	66,67	4	26,67	37	37		0,042
	Duyarlı	18	47,37	16	76,19	9	75	7	87,5	2	33,33	11	73,33	63	63		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Levofloksasin	Dirençli	14	36,84	9	42,86	8	66,67	5	62,5	4	66,67	3	20	43	43	*	0,102
	Duyarlı	24	63,16	12	57,14	4	33,33	3	37,5	2	33,33	12	80	57	57		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Meropenem	Dirençli	19	50	4	19,05	1	8,33	0	0	2	33,33	2	13,33	28	28	*	0,003
	Duyarlı	19	50	17	80,95	11	91,67	8	100	4	66,67	13	86,67	72	72		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Piperasilin-tazobaktam	Dirençli	21	55,26	4	19,05	2	16,67	0	0	3	50	4	26,67	34	34	*	0,004
	Duyarlı	17	44,74	17	80,95	10	83,33	8	100	3	50	11	73,33	66	66		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Seftazidim	Dirençli	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100	-	-
	Duyarlı	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		
Tobramisin	Dirençli	8	21,05	9	42,86	7	58,33	0	0	1	16,67	3	20	28	28	*	0,027
	Duyarlı	30	78,95	12	57,14	5	41,67	8	100	5	83,33	12	80	72	72		
	Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		

*Hastane servisleri ile antibiyotik duyarlılığı arasında anlamlı ilişki ($p < 0,05$) saptanan durumlar için p değeri belirtilmiştir.

4.1.2.2. İzolatların MİK değerleri: Seftazidim, kolitsin, gentamisin, imipenem, levofloksasin, meropenem, piperasilin-tazobaktam ve tobramisin antibiyotiklerinin *P. aeruginosa* izolatları üzerinde etkili olduğu minimum düzeydeki doz, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenerek MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarına karşı 8 antibiyotiğin minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

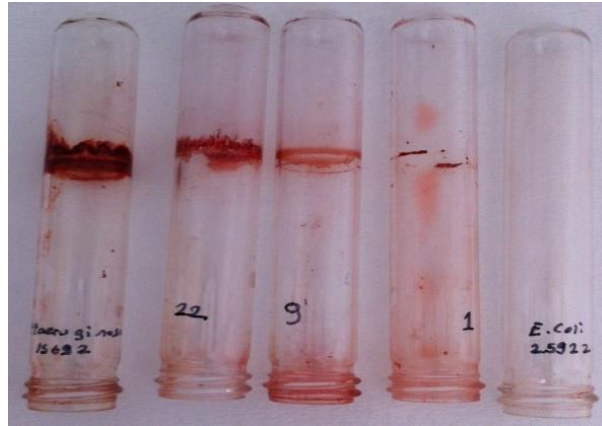
Antibiyotik	MİK (µg/mL)		
	Sınır Alanı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
CN	≤0,125 - >64	8	>64
CT	≤0,0625 - >32	4	16
IPM	≤0,125 - >64	4	>64
LEV	≤0,125 - >64	8	64
MEM	≤0,0625 - >32	2	32
TOB	≤0,125 - >64	2	>64
CAZ	≤0,25 - >128	32	128
TPZ	≤0,5/4 - >256/4	64/4	256/4

CN: Gentamisin, CT: Kolitsin, IPM: İmipenem, LEV: Levofloksasin, MEM: Meropenem, TOB: Tobramisin
CAZ: Seftazidim, TPZ: Piperasilin-tazobaktam.

Karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenemin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 2 ve 32 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değerler karbapenem grubundan başka bir antibiyotik olan imipenemin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri (4 ve >64 µg/mL) ile karşılaştırıldığında 2 kat daha düşüktür. Aminoglikozit grubu olan gentamisinin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 8 ve >64 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler aminoglikozit grubundan başka bir antibiyotik olan tobramisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ (2 ve >64 µg/mL) ile karşılaştırıldığında 4 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kolistinin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 4 ve 16 µg/mL, florakinolon grubundan olan levofloksasinin ise MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 8 ve 64 µg/mL olarak belirlenmiştir. β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları olan piperasilin-tazobaktamın MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 64/4 ve 256/4 µg/mL olarak belirlenmiştir. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarına karşı en etkili antibiyotik grubunun CLSI kriterlerinde duyarlılık sınır değerleri içerisinde olan kolitsin ve piperasilin-tazobaktam olduğu görülmüştür.

4.1.3. Biyofilm oluşumu

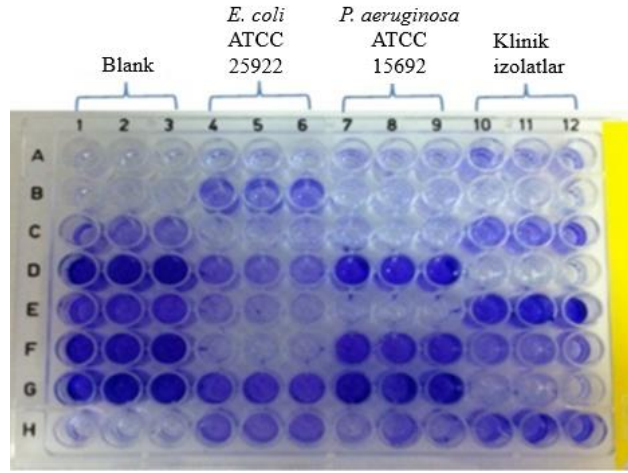
Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarının %0,25'lik TSB besiyerine inokule edilerek 37 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra tüp yüzeyinde bir film tabakasını oluşturması biyofilm pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Görsel 4.4). Kontrol suş olarak biyofilm oluşturmeyen *Escherichia coli* ATCC 25922 ve güçlü şekilde biyofilm oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 ile klinik izolatlar karşılaştırılarak biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerle; seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) suşlarının tüpte biyofilm oluşturma sonucunda, bu klinik izolatların 67'sinde (%67) biyofilm oluşumu pozitif olarak bulunurken, 33'ünde (%33) biyofilm oluşumu negatif olarak belirlenmiştir.



Görsel 4.4. Tüpte biyofilm oluşumu (22 numaralı izolatta yüksek, 9 numaralı izolatta orta, 1 numaralı izolatta ise zayıf derecede biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir).

Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarının 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonundan sonra kristal viyole ile biyofilm oluşturan tabakası boyanarak 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmış ve biyofilm üretimi kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Mikrotitrasyon plağında her klinik suş için üç kuyu tekrarlı olarak çalışılmış ve kuyuların ortalaması alınarak biyofilm değeri hesaplanmıştır. *E. coli* ATCC 25922 suşu negatif kontrol, *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşu ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar bu suşların absorbans değerlerine göre yorumlanmıştır (Görsel 4.5). Yapılan ölçüm sonrasında; $OD_{570} < 0,120$ ise biyofilm negatif (-), $OD_{570} < 0,240$ ise zayıf biyofilm (+), $OD_{570} < 0,500$ ise orta derecede biyofilm (++) ve $OD_{570} > 0,500$ ise yüksek derecede

biyofilm (+++) üretimi olarak değerlendirilmiştir. Mikrotitrasyon plağı yönteminde yapılan spektroskopik ölçüm sonucunda; seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) suşlarının 76'sında (%76) biyofilm oluşumu pozitif olarak bulunurken, 24'ünde (%24) biyofilm oluşumu negatif olarak belirlenmiştir.



Görsel 4.5. Biyofilm oluşumunun belirlendiği mikrotitrasyon plağı

Hastane servisleri ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki kruskal wallis H testi ile analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0,517$). Fakat bu servisler arasında yoğun bakım ünitelerinden izole edilen bakterilerin biyofilm üretimi miktarının ($0,41 \pm 0,36$), göğüs hastalıkları ünitelerinden izole edilen bakterilerin biyofilm üretim miktarına göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu belirlenmiştir ($0,33 \pm 0,38$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Mikrotitrasyon oluşum değerleri bakımından hastane servisleri arasındaki farklılığa ilişkin kruskal wallis H testi sonuçları

Hastane servisleri	Mikrotitrasyon						Kruskal Wallis H Testi		
	N	Mean	Median	Min	Max	Ss	Sıra Ort.	H	P
Yoğun bakım	38	0,41	0,31	0,0191	1,5116	0,36	53,87	4,229	0,517
Göğüs hastalıkları	21	0,33	0,19	0,0014	1,6274	0,38	43,64		
Üroloji	12	0,62	0,4	0,0104	2,5035	0,72	56,75		
İç hastalıkları	8	0,69	0,39	0,0448	2,3138	0,79	58,88		
Enfeksiyon hastalıkları	6	0,55	0,37	0,0048	1,7154	0,66	51		
Diğer	15	0,22	0,24	0,007	0,4155	0,13	41,9		
Toplam	100	0,42	0,26	0,0014	2,5035	0,47			

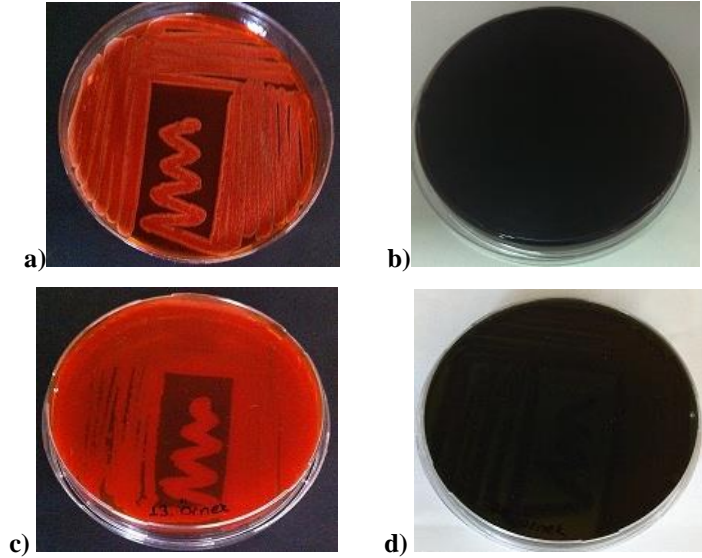
Sonuçlar göğüs hastalıkları servisinde izole edilen bakterilerin mikrotitrasyon yöntemi ile antibiyotik dirençliliği açısından incelendiğinde ise, biyofilm oluşturan izolatların, gentamisin antibiyotiğine karşı dirençliliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Biyofilm oluşumu pozitif izolatların %29,41'inin aynı zamanda gentamisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Göğüs hastalıkları servisinde elde edilen izolatların gentamisin ile istatistiksel olarak ilişkisi

		Göğüs hastalıkları						Ki Kare Testi	
		Mikrotitrasyon Biyofilm						Ki Kare	P
		Negatif		Pozitif		Toplam			
		n	%	n	%	n	%		
Gentamisin	Negatif	4	100	5	29,41	9	42,86	Fisher's exact	0,021
	Pozitif	0	0	12	70,59	12	57,14		
	Toplam	4	100	17	100	21	100		

4.1.4. *P. aeruginosa* izolatlarında slime faktör (biyofilm) üretimi

Klinik örneklerin 18 saatlik taze kültürleri alınarak, kongo kırmızı agarda 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra biyofilm oluşumları incelenmiştir. Parlak siyah koloni oluşturan izolatların biyofilm üretimi pozitif, pembe renkli ya da renksiz koloni oluşturanlar ise biyofilm üretimi negatif olarak değerlendirilmiştir (Görsel 4.6).



Görsel 4.6. Kongo kırmızısı agarda inkübe edilen izolatların slime faktör üretimi: a) *E. coli* ATCC 25922 kırmızı koloni oluşumu negatif kontrol, b) *P. aeruginosa* ATCC 15692 siyah koloni oluşumu pozitif kontrol, c) 13. örnek slime faktör negatif ve d) 64. örnek slime faktör pozitif

Hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) 57'sinde (%57) biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. Bu 57 izolatın 20'si (%20) zayıf biyofilm, 14 tanesi (%14) orta düzeyde biyofilm, ve 23 tanesi (%23) kuvvetli düzeyde biyofilm oluşumu göstermiştir. 43 (%43) izolatın ise biyofilm, oluşumu negatif olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda hastane servisleri ile biyofilm üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Yoğun bakım ünitesinin %73,68'i, göğüs hastalıklarının %42,86'sı, üroloji servisinin %25'i, iç hastalıklarının %62,5'i, enfeksiyon hastalıklarının %50'si ve diğer servislerin %60'ında biyofilm üretimi pozitif olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8).

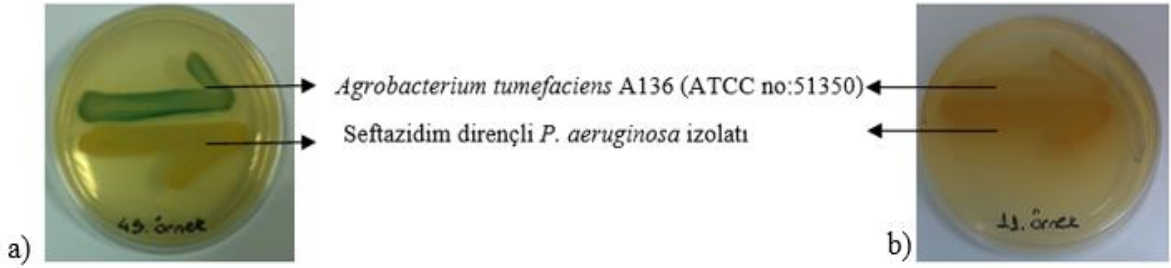
Tablo 4.8. Hastane servisleri ile biyofilm üretimi arasındaki ilişkinin ki kare test sonuçları

Biyofilm üretimi	Hastane servisleri														Ki Kare Testi	
	Yoğun bakım		Göğüs hastalıkları		Üroloji		İç hastalıkları		Enfeksiyon Hastalıkları		Diğer		Toplam		Ki kare	P
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%		
Negatif	10	26,32	12	57,14	9	75	3	37,5	3	50	6	40	43	43	*	0,045
Pozitif	28	73,68	9	42,86	3	25	5	62,5	3	50	9	60	57	57		
Toplam	38	100	21	100	12	100	8	100	6	100	15	100	100	100		

*Hastane servisleri biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki ($p<0,05$)

4.1.5. *P. aeruginosa* izolatlarında homoserin lakton üretimi

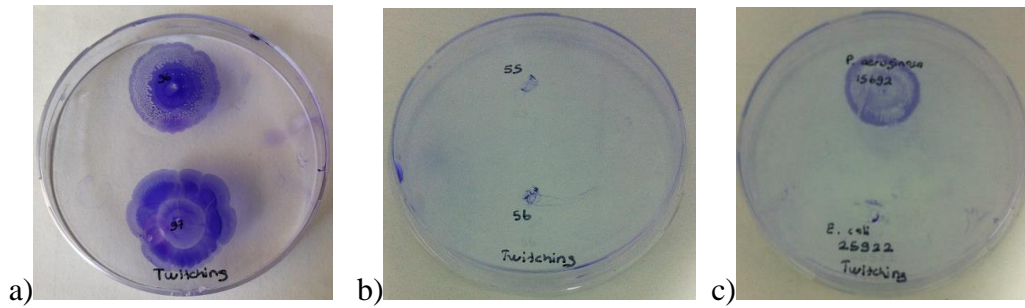
Çalışmada kullanılan seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının HSL üretimi X-Gal varlığında indikatör bir suş olan *A. tumefaciens* A136 ATCC no:51350 kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Görsel 4.7). *P. aeruginosa* HSL üretiyorsa agara difüze olur ve *A. tumefaciens*'teki *tra-I*, *lac-Z* genlerini aktive eder. Şeffaf, saydam koloniler yapan *A. tumefaciens*'in aktivasyon sonucu renk değişikliği ile mavi pigmentasyon oluşturması HSL üretildiğini göstermektedir (Shaw, Ping ve Daly, 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001). Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) suşlarının 51'inde (%51) HSL oluşumu pozitif olarak bulunurken, 49'unda (%49) HSL oluşumu negatif olarak belirlenmiştir.



Görsel 4.7. *P. aeruginosa* izolatlarında HSL üretimi: a) 49. örnek X-Gal varlığında HSL üretimi pozitif, b) 11. örnek X-Gal varlığında HSL üretimi negatif.

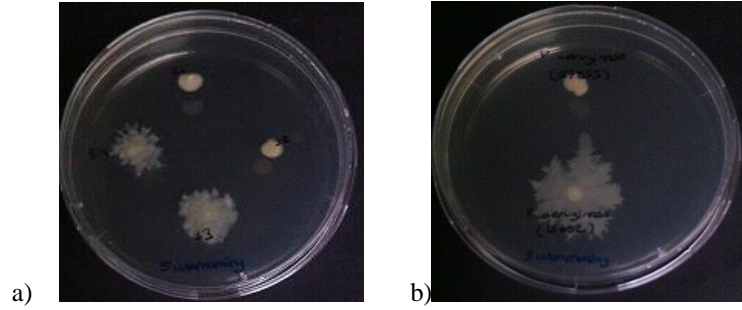
4.1.6. *P. aeruginosa* izolatlarının hareketlilik testleri

P. aeruginosa polar flagella ve Tip IV pili yapıları sayesinde hareket edebilen bir mikroorganizmadır. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hareket edebilme yetenekleri titreme, kayma ve yüzme olmak üzere üç farklı yöntemle test edilmiştir. İzolatların inkübasyonunun ardından inokulasyon noktasını çevreleyen boyanmış alanın kenarının merkezden uzaklığı kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülerek titreme hareketinin miktarı belirlenmiştir. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) izolatlarının 67'sinde (%67) titreme hareketi gözlemlenirken, 33'ünde (%33) titreme hareketi tespit edilememiştir (Görsel 4.8).



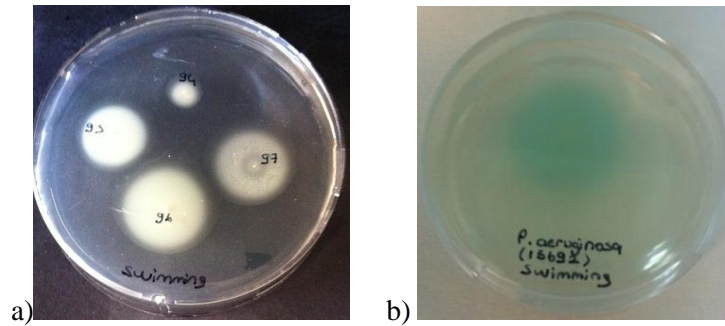
Görsel 4.8. *P. aeruginosa* izolatlarında titreme hareketi: a) 96 ve 97 numaralı titreme hareketi pozitif izolatlar, b) 55 ve 56 numaralı titreme hareketi negatif izolatlar, c) titreme hareketi pozitif kontrol suş *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve negatif kontrol suş *E. coli* ATCC 25922.

İzolatların inokulasyon noktasından çevreye doğru oluşan dallanmaların merkeze uzaklığı, en az üç farklı yerden ölçülüp ortalamaları alınarak kayma hareketi değerleri ölçülmüştür. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) suşlarının 54'ünde (%54) kayma hareketi pozitif, 46'sında (%46) kayma hareketi negatif olarak gözlemlenmiştir (Görsel 4.9).



Görsel 4.9. *P. aeruginosa* izolatlarında kayma hareketi: a) Kayma hareketi pozitif izolatlar 31 ve 32 numaralı ve negatif izolatlar 33 ve 34 numaralı, b) Kayma hareketi pozitif kontrol suş *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve negatif kontrol suş *E. coli* ATCC 25922.

İzolatların inokulasyon noktasını çevreleyen bulanık alanın kenarının merkezden uzaklığı kumpas yardımıyla mm, cinsinden ölçülerek yüzme hareketinin miktarı belirlenmiştir. Seftazidim dirençli *P. aeruginosa* (n: 100) suşlarının 76'sında (%76) yüzme hareketi gözlemlenirken, 24'ünün (%24) yüzme hareketine sahip olmadığı tespit edilmiştir (Görsel 4.10). Hareketlilik testlerinde gözlenen ve beklenen frekanslar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı araştırmak için ki kare testi yapılmıştır (Tablo 4.9).



Görsel 4.10. *P. aeruginosa* izolatlarında yüzme hareketi: a) Yüzme hareketi negatif izolat 94 numaralı yüzme hareketi pozitif izolatlar 95, 96 ve 97 numaralı, b) Yüzme hareketi pozitif kontrol suş *P. aeruginosa* ATCC 15692

Tablo 4.9. Klinik örnekler ile hareketlilik testleri arasındaki ilişki

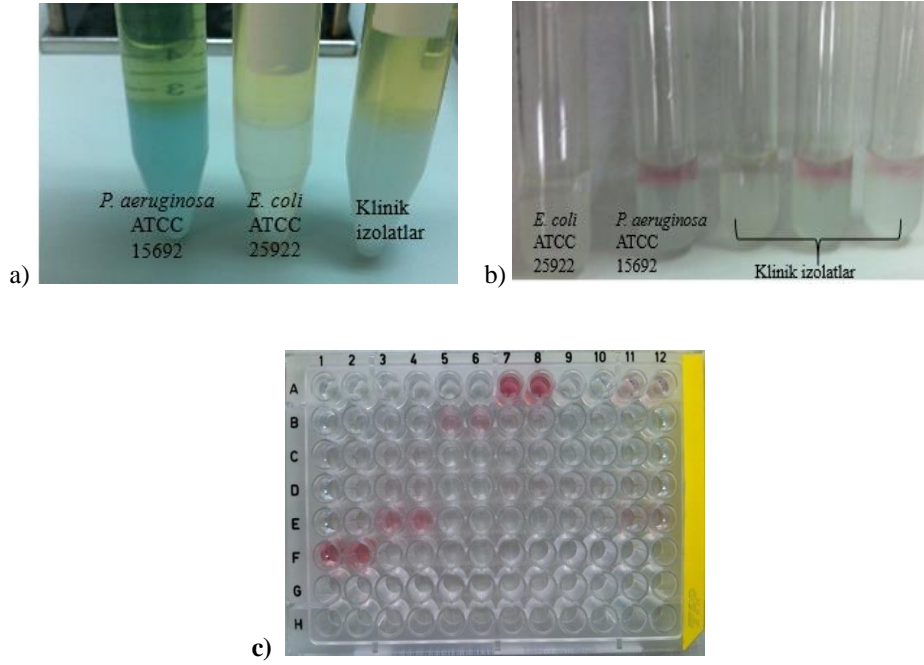
Hareketlilik testi	Klinik örnekler												Ki Kare Testi		
	Balgam		İdrar		Trakea		Yara		Kan/Deri		Toplam		Ki Kare	p	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%			
Yüzme	Negatif	11	37,93	5	17,86	7	35	0	0	1	20	24	24	*	0,026
	Pozitif	18	62,07	23	82,14	13	65	18	100	4	80	76	76		
	Toplam	29	100	28	100	20	100	18	100	5	100	100	100		
Kayma	Negatif	16	55,17	17	60,71	10	50	2	11,11	1	20	46	46	13,733	0,007
	Pozitif	13	44,83	11	39,29	10	50	16	88,89	4	80	54	54		
	Toplam	29	100	28	100	20	100	18	100	5	100	100	100		
Titreme	Negatif	14	48,28	8	28,57	8	40	2	11,11	1	20	33	33	8,035	0,04
	Pozitif	15	51,72	20	71,43	12	60	16	88,89	4	80	67	67		
	Toplam	29	100	28	100	20	100	18	100	5	100	100	100		

*Hastane servisleri biyofilm üretimi arasında anlamlı ilişki ($p<0,05$)

Klinik örnekler ile yüzme, kayma ve titreme hareketleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunduğu görülmüştür ($p<0,05$). Balgam örneğinin %62,07'si, idrar örneğinin %82,14'ü, trakea örneğinin %65'i, yara örneğinin %100'ü ve kan/deri kültürü örneğinin %80'inde yüzme hareketi pozitif olarak belirlenmiştir. Balgam örneğinin %44,83'ü, idrar örneğinin %39,29'u, trakea örneğinin %50'si, yara örneğinin %88,89'u ve kan/deri kültürü örneğinin %80'inde kayma hareketi pozitif olarak saptanmıştır. Balgam örneğinin %51,72'si, idrar örneğinin %71,43'ü, trakea örneğinin %60'si, yara örneğinin %88,89'u ve kan/deri kültürü örneğinin %80'inde titreme hareketi pozitif olarak tespit edilmiştir.

4.1.7. *P. aeruginosa* izolatlarında piyosiyanın miktarının ölçümü

PB besiyerinde üretilen *P. aeruginosa* izolatlarının 5 mL'si 3 mL kloroform ile 3 saatte ekstrakte edilmiş ve organik madde içeren kısım ayrılmıştır (Görsel 4.11a). Üzerine 1 mL 0,2 M HCl ilave edilerek piyosiyanın zengin faz ayrılmıştır (Görsel 4.11b). Ekstrakte edilen kısımdaki piyosiyanın miktarı OD 520 nm'de okunmuştur (Görsel 4.11c). Yapılan işlemde *E. coli* ATCC 25922 negatif kontrol, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ise pozitif kontrol olarak kullanılmış ve izolatlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



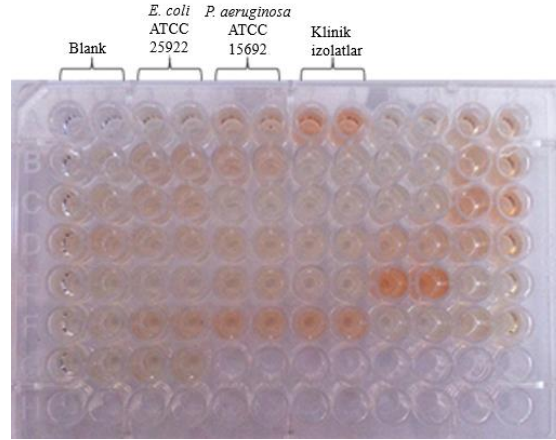
Görsel 4.11. *P. aeruginosa* izolatlarında piyosiyanın miktarının belirlenmesi; a) Kloroform ekstraksiyonu ile ayrılan organik fazın görüntüsü, b) Piyosiyanın zengin organik faz görüntüsü ve c) Piyosiyanın miktarını belirlemek için plakalar OD 520 nm’de ölçülmüştür

Hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) 65’inde (%65) piyosiyanın üretimi pozitif, 35 (%35) izolatın ise piyosiyanın üretimi negatif olarak belirlenmiştir. Üroloji servisinden izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarından biyofilm oluşumu pozitif olanların %54,55’inin, piyosiyanın sonucunun da pozitif olduğu belirlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen ve biyofilm oluşturan *P. aeruginosa*’ların %69,7’sinde piyosiyanın üretiminin pozitif olduğu görülmüştür. Göğüs hastalıkları servisinden izole edilen *P. aeruginosa*’ların %58,82’sinin de piyosiyanın sonucu pozitif olarak belirlenmiştir.

4.1.8. *P. aeruginosa* izolatlarında elastaz miktarı

P. aeruginosa’nın elastaz enzimini sentezleyebilme özelliği, substrat görevi gören elastin kongo kırmızısı aracılığıyla analiz edilmiştir. Elastin parçalanarak koyu kırmızı renk almıştır ve OD 495 nm’de okunarak ölçüm yapılmıştır. Test sırasında *E. coli* ATCC 25922 negatif kontrol, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) 66’sında (%66) elastaz üretimi pozitif olarak bulunmuştur. 34 (%34) izolatın ise elastaz üretimi negatif

olarak belirlenmiştir (Görsel 4.12). Elastaz değerleri bakımından hastane servisleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0,05$). Yoğun bakım ünitelerinden elde edilen örneklerin elastaz değerinin, enfeksiyon servisindekilere göre fazla olduğu gözlenmiştir $0,13 \pm 0,21$ (Tablo 4.10).



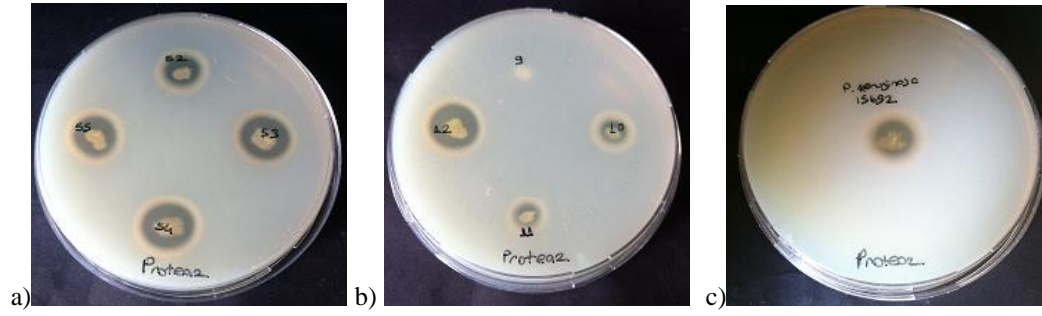
Görsel 4.12. Elastaz miktarı plakaların OD 495 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Hastane servisleri ve elastaz arasındaki ilişki (kruskal wallis H testi)

		Hastane servisleri						Kruskal Wallis H Testi		
		n	Mean	Median	Min	Max	ss	Sıra Ort.	H	p
Elastaz	Yoğun bakım	38	0,13	0,05	0,0134	0,9857	0,21	48,42	11,202	0,048
	Göğüs hastalıkları	21	0,09	0,04	0,0236	0,4458	0,1	45,95		
	Üroloji	12	0,18	0,12	0,0072	0,605	0,17	65,17		
	İç hastalıkları	8	0,2	0,11	0,0212	0,6546	0,23	55,19		
	Enfeksiyon hastalıkları	6	0,03	0,03	0,0133	0,045	0,01	21,92		
	Diğer	15	0,16	0,09	0,0258	0,6706	0,2	59,33		
Toplam		100	0,13	0,05	0,0072	0,9857	0,18	5-3		

4.1.9. *P. aeruginosa* izolatlarında proteaz üretimi

P. aeruginosa'nın proteolitik enzim aktivitesine sahip olup olmadığını değerlendirmek için yapılmaktadır. Bu yöntemle %2 yağsız süt tozu içeren LB agara inokülasyon sonucunda bakteri kolonilerinin etrafında oluşan saydam zon ölçülerek değerlendirilmiştir (Görsel 4.13). Test sırasında *P. aeruginosa* ATCC 15692 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Proteaz testi sonucunda izolatların (n: 100) 88'inde (%88) proteaz aktivitesi gözlemlenirken, 22'sinde proteaz aktivitesi negatif olarak belirlenmiştir.



Görsel 4.13. *P. aeruginosa* izolatlarında proteaz üretimi: a) 52, 53, 54 ve 55 numaralı klinik izolatlar proteaz pozitif, b) 9 numaralı klinik izolat proteaz negatif c) *P. aeruginosa* ATCC 15692 pozitif kontrol suş.

4.2. Moleküler Analizler

GeneJET genomik DNA saflaştırma kiti kullanılarak elde edilen DNA örneklerine (n: 100) Nanodrop spektrofotometre ile miktar ve konsantrasyon tayini yapılmıştır. A260/A280 nm’de absorbansı 1,8-1,9 arasında olan saf DNA örnekleriyle deneylere devam edilmiştir (Tablo 4.11).

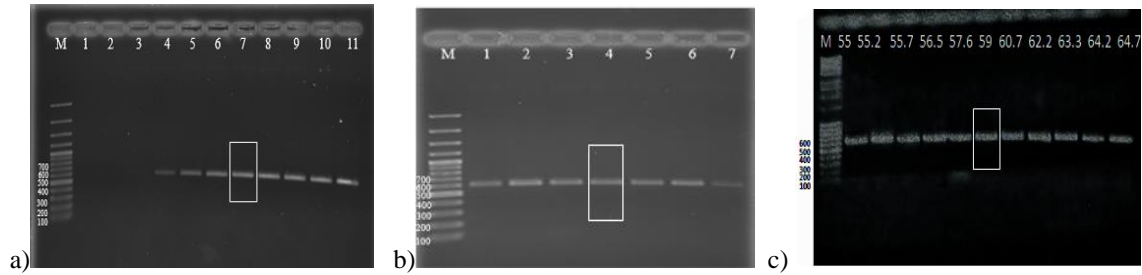
Tablo 4.11. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu

Örnekler	260/280	ng/μL	Örnekler	260/280	ng/μL
1. Örnek	1,7	30,59	52. Örnek	1,846	25,09
2. Örnek	1,71	32,35	53. Örnek	1,800	34,41
3. Örnek	1,74	35,95	54. Örnek	1,738	32,64
4. Örnek	1,77	30,29	55. Örnek	1,633	35,49
5. Örnek	1,8	35,39	56. Örnek	1,958	36,47
6. Örnek	1,76	37,25	57. Örnek	1,725	43,52
7. Örnek	1,74	28,04	58. Örnek	1,046	18,23
8. Örnek	1,74	42,35	59. Örnek	2,511	37,35
9. Örnek	1,75	35,29	60. Örnek	1,751	42,15
10. Örnek	1,765	10,78	61. Örnek	1,609	32,84
11. Örnek	1,72	57,35	62. Örnek	1,770	32,45
12. Örnek	1,793	57,16	63. Örnek	1,537	51,27
13. Örnek	1,846	150	64. Örnek	1,709	36,17
14. Örnek	1,849	11,3	65. Örnek	1,746	33,92
15. Örnek	1,799	57,94	66. Örnek	1,711	23,23
16. Örnek	1,847	62,25	67. Örnek	1,739	27,35
17. Örnek	1,885	84,22	68. Örnek	1,727	20,49
18. Örnek	1,833	82,55	69. Örnek	2,047	32,10
19. Örnek	1,834	106,9	70. Örnek	1,828	31,56
20. Örnek	1,744	25,1	71. Örnek	1,727	41,17
21. Örnek	1,712	78,73	72. Örnek	1,771	54,60
22. Örnek	1,763	73,73	73. Örnek	1,674	39,41
23. Örnek	1,68	36,47	74. Örnek	1,505	35,78
24. Örnek	1,741	49,31	75. Örnek	1,921	45,47
25. Örnek	1,822	273,1	76. Örnek	1,802	51,66
26. Örnek	1,833	30,39	77. Örnek	1,899	51,56
27. Örnek	1,724	40,98	78. Örnek	1,880	44,50
28. Örnek	1,607	29,71	79. Örnek	1,876	40,00
29. Örnek	1,705	34,71	80. Örnek	1,738	44,01
30. Örnek	1,742	6,471	81. Örnek	1,870	42,64
31. Örnek	1,676	31,37	82. Örnek	1,720	30,98
32. Örnek	1,789	52,65	83. Örnek	2,157	41,96
33. Örnek	1,826	56,96	84. Örnek	1,805	40,98
34. Örnek	1,781	64,61	85. Örnek	1,769	34,01
35. Örnek	1,818	54,9	86. Örnek	1,806	31,07
36. Örnek	1,816	76,57	87. Örnek	1,645	30,39
37. Örnek	1,823	61,86	88. Örnek	1,666	43,92
38. Örnek	1,869	112,5	89. Örnek	1,699	27,45
39. Örnek	1,858	70,69	90. Örnek	1,739	47,84
40. Örnek	1,83	50,29	91. Örnek	1,704	35,00
41. Örnek	1,804	73,73	92. Örnek	1,753	40,58
42. Örnek	1,8	30,88	93. Örnek	1,817	22,74
43. Örnek	1,813	40,88	94. Örnek	1,761	20,09
44. Örnek	1,818	66,86	95. Örnek	1,738	44,31
45. Örnek	1,808	36,67	96. Örnek	1,758	25,98
46. Örnek	1,892	73,63	97. Örnek	1,818	37,84
47. Örnek	1,781	35,39	98. Örnek	1,594	28,23
48. Örnek	1,8	35,88	99. Örnek	1,750	42,74
49. Örnek	1,802	35,39	100. Örnek	1,807	37,64
50. Örnek	1,905	56,27	<i>P. aeruginosa</i> 15692	1,712	52,45
51. Örnek	1,736	37,84			

4.2.1. Quorum sensing genlerinin PZR ile belirlenmesi

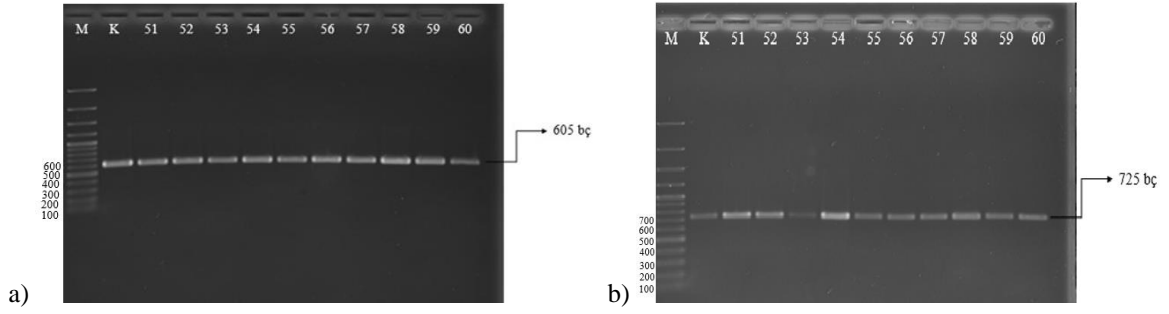
4.2.1.1. QS intakt gen profillerinin belirlenmesi

QS intakt gen profillerini optimum şartlarda görüntülemek için yapılan işlemlerin sonuçları Görsel 4.14'de verilmiştir. PZR amplifikasyonu için uygun koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan magnezyum klorür optimizasyonunda, 0,5-3 mM konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. İntak genlerin belirlenmesinde en iyi bant profili veren 1,5 mM (1,5 µL) MgCl₂ konsantrasyonu çalışmalarda kullanılmıştır (Görsel 4.14a). PZR amplifikasyonunda dNTP optimizasyonu 0,02-0,14 mM konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. İntakt genlerinin belirlenmesinde en iyi bant profili veren 0,08 mM (1 µL) dNTP konsantrasyonu çalışmalarda kullanılmıştır (Görsel 4.14b). İntakt genler için optimal primer bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 55-65 °C aralığı kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda intakt genler için en uygun bağlanma sıcaklığı 60 °C olarak belirlenmiştir (Görsel 4.14c).



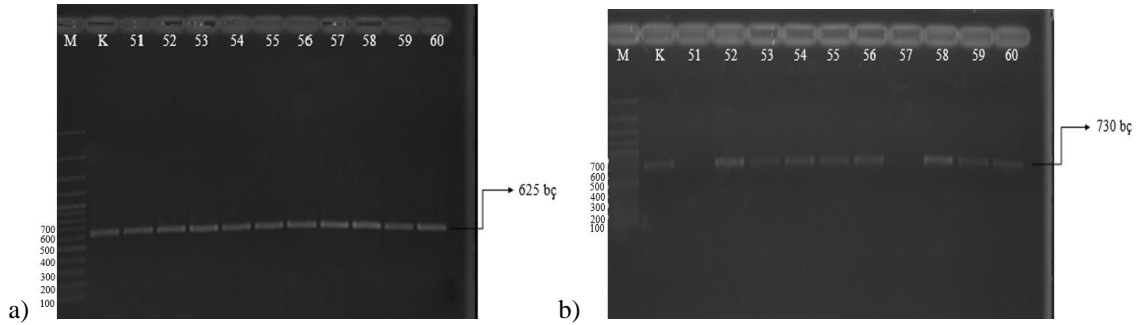
Görsel 4.14. QS intakt genlerinin optimizasyon sonuçları a) İntakt genler için magnezyum klorür optimizasyon sonuçları b) İntakt genler için dNTP optimizasyon jel görüntüsü c) Primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker)

QS mekanizması kontrolü altında olan *lasI* intakt geni; hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n: 100) 96'sında (%96) pozitif olarak bulunmuştur. 4'ünde (%4) ise *las I* intakt geni negatif olarak belirlenmiştir (Görsel 4.15a). *QS lasR intakt gen bölgesi*; *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) 91'inde (%91) pozitif olarak bulunurken, 9'unda (%9) ise *lasR* intakt geni negatif olarak belirlenmiştir (Görsel 4.15b).



Görsel 4.15. *QS mekanizması kontrolü altında olan las intakt sistemine ait gen bölgeleri, a) QS lasI intakt geni (605 bç), b) QS intakt lasR geni (725 bç) jel görüntüsü. (M: Marker 100 bç, K: Kontrol suş P. aeruginosa ATCC 15692)*

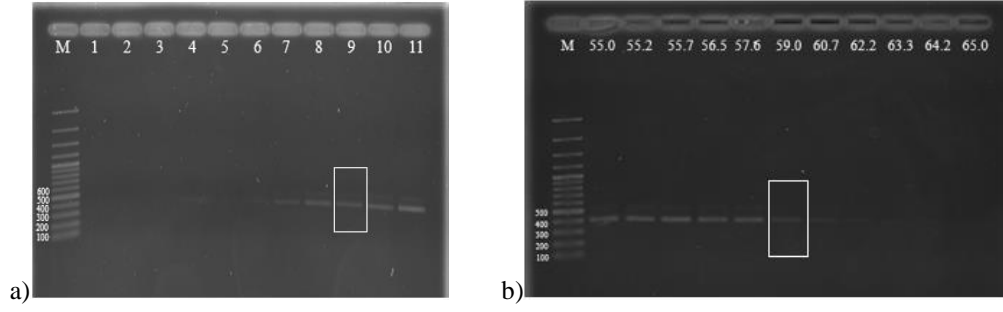
QS *rhlI* intakt gen bölgeleri seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) 91'inde (%91) pozitif olarak, 9'unda (%9) ise *rhlI* intakt geni negatif olarak belirlenmiştir (Görsel 4.16a). QS *rhlR* intakt gen bölgeleri ise izolatların 80'inde (%80) pozitif, 20'sinde (%20) ise negatif olarak belirlenmiştir (Görsel 4.16b).



Görsel 4.16. *QS mekanizması kontrolü altında olan rhl intakt sistemine ait gen bölgeleri a) QS rhlI intakt geni (625 bç), b) QS rhlR intakt geni (730 bç) jel görüntüsü. (M: Marker 100 bç, K: Kontrol suş, P. aeruginosa ATCC 1569).*

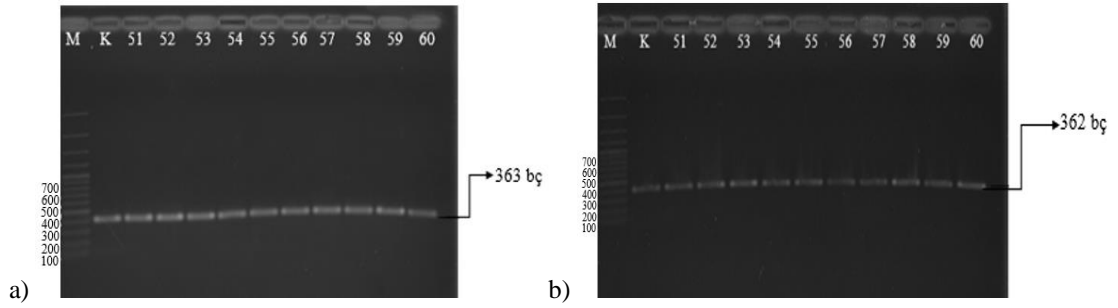
4.2.1.2. *QS internal gen profillerinin belirlenmesi*

PZR amplifikasyonunda optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla magnezyum klorür için 0,5-3 mM konsantrasyon aralığı kullanılmış ve çalışmalarda 2,5 mM (2,5 µL) MgCl₂ konsantrasyonu optimal olarak belirlenmiştir (Görsel 4.17a). Yapılan optimizasyon çalışmasında, 55-65 °C sıcaklık aralığında internal genleri için en uygun primer bağlanma sıcaklığı 59 °C olarak belirlenmiştir (Görsel 4.17b).



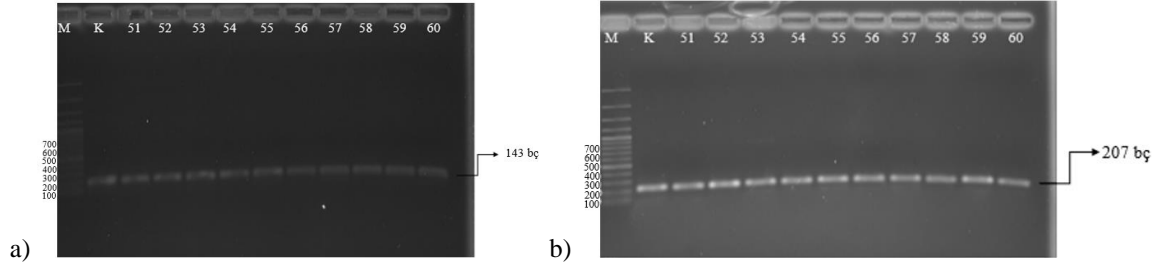
Görsel 4.17. QS internal genlerinin optimizasyon sonuçları a) İnternal genler için magnezyum klorür optimizasyonu, b) İnternal genleri için primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu (M: Marker)

QS mekanizması kontrolü altında olan *lasI* internal geni *P. aeruginosa* izolatlarının 95'inde (%95) pozitif, 5'inde (%5) ise *lasI* internal geni negatif olarak tespit edilmiştir (Görsel 4.18a). İzolatların 95'inde (%95) *lasR* internal geni pozitif ve 5'inde (%5) *lasR* internal geni negatif olarak kabul edilmiştir (Görsel 4.18b).



Görsel 4.18. QS mekanizması kontrolü altında olan *las* internal sistemine ait gen bölgeleri a) QS internal *lasI* gen bölgeleri (363 bç), b) QS internal *lasR* gen bölgeleri (362 bç) (M: Marker 100 bç, K: Kontrol suş, *P. aeruginosa* ATCC 15692).

QS mekanizması kontrolü altında olan *rhlI* internal geni *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) 90' ında (%90) pozitif, 10' unda (%10) ise *rhlI* internal geni negatif saptanmıştır (Görsel 4.19a). QS *rhlR* internal genleri izolatların 90'nında (%90) pozitif, 10' unda (%10) bu gen negatif olarak bulunmuştur (Görsel 4.19b).



Görsel 4.19. QS mekanizması kontrolü altında olan *rhl* internal sistemine ait gen bölgeleri a) QS internal *rhlI* gen bölgeleri (143 bç), b) internal *rhlR* gen bölgeleri (207 bç) (M: Marker 100 bç, K: Kontrol suş, *P. aeruginosa* ATCC 1569).

4.3. Hücre Kültürü Analizleri

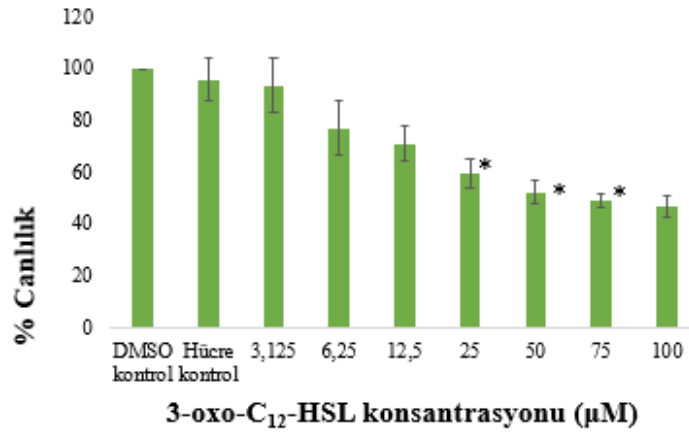
3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün hTERT-HPNE hücreleri üzerine sitotoksik etkisi yaygın olarak uygulanan MTT (hücre canlılık) testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılık testlerinden biri olan MTT, tetrazolyum halkasının mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesiyle çözünmeyen mor formazanlara dönüşüm prensibine dayanmaktadır (Abe ve Matsuki, 2000; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Optimizasyon sonucunda 100 µL'sinde 1x10⁴ olacak şekilde belirlenen hücrelerin 96'lık plakaya ekimleri yapılmıştır. Materyal ve metotta belirtildiği gibi hücreler 3-oxo-C₁₂-HSL'nin belirli dozlarına ve DMSO'ya 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. MTT test sonuçlarına göre; hTERT-HPNE hücrelerinin 3,125 µM 3-oxo-C₁₂-HSL ile 24 saat inkübasyonu sonunda canlılığı azalmaya başlamıştır.

100 µM 3-oxo-C₁₂-HSL ile 24 saat inkübasyon sonunda ise canlılığın en düşük seviyeye ulaştığı görülmüştür. 48 ve 72 saatlik test sonuçları dikkate alındığında ise kontrol grubuna göre hücre sayısında düzensiz bir artış gözlemlendiği için çalışmaya dahil edilmemiştir (Şekil 4.1).

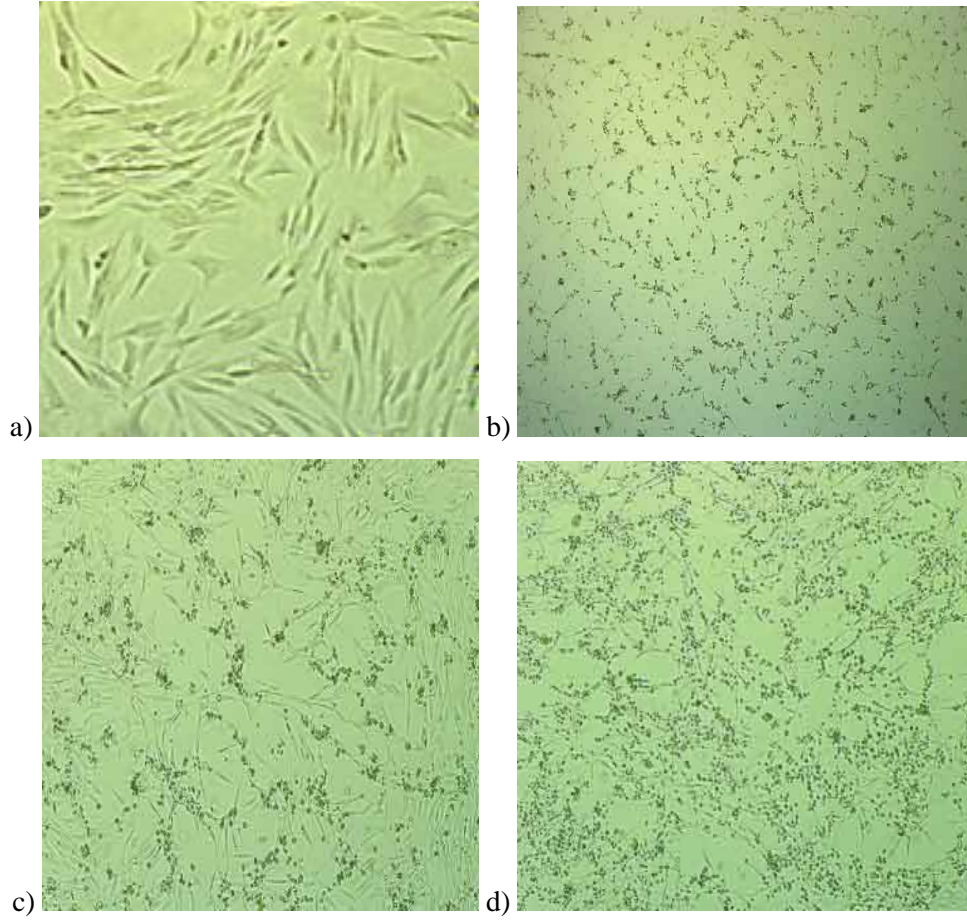
Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise; 75 µM konsantrasyonu 24 saat için yaklaşık IC₅₀ değeri olarak belirlenmiştir. 50 µM ve 25 µM 3-oxo-C₁₂-HSL ile 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı kontrol grubu hücre ile kıyaslandığında istatistiksel

olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca 3-oxo-C₁₂-HSL'nin 12,5 µM konsantrasyonunda hücre sayısında azalmaya sebep olmuştur. Çalışmalara 3-oxo-C₁₂-HSL'nin 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM olmak üzere sitotoksik dozun altındaki üç farklı konsantrasyonla devam edilmiştir (Şekil 4.2). IC₅₀ değeri olan 75 µM uygulanan hücrelerin morfolojilerinin değişerek hücrelerin yüzeyden uzaklaşmalarına bağlı olarak RNA ve protein izolasyonu yapılamadığı için bu konsantrasyon çalışmalara dahil edilmemiştir.



Şekil 4.1. 3-oxo-C₁₂-HSL'nin hTERT-HPNE hücrelerindeki canlılık analizi
** $p<0,05$ Kontrol grubu ile 3-oxo-C₁₂-HSL'nin değişen dozları uygulanan hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır.*

3-oxo-C₁₂-HSL'nin farklı konsantrasyonlarıyla (3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM) inkübe edilen hTERT-HPNE hücrelerinin morfolojisi ters-faz mikroskop (Leica DM IL LED) ile incelenerek fotoğraflanmıştır. Şekil 4.20a'da DMSO kontrol grubu epitel benzeri hTERT-HPNE hücrelerinin morfolojisi görülmektedir. 50 µM, 25 µM ve 12,5 µM 3-oxo-C₁₂-HSL ile 24 saat muamele edilen hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında morfolojilerini kaybettiği ve hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür (Görsel 4.20 b, c ve d).



Görsel 4.20. 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinin ters faz mikroskopisi.
a) Kontrol hücre grubunun morfolojisi (DMSO kontrol), b) 50 μ M konsantrasyonda 3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen hücreler, c) 25 μ M konsantrasyonda 3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen hücreler, d) 12,5 μ M konsantrasyonda 3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen hücreler. (X 20)

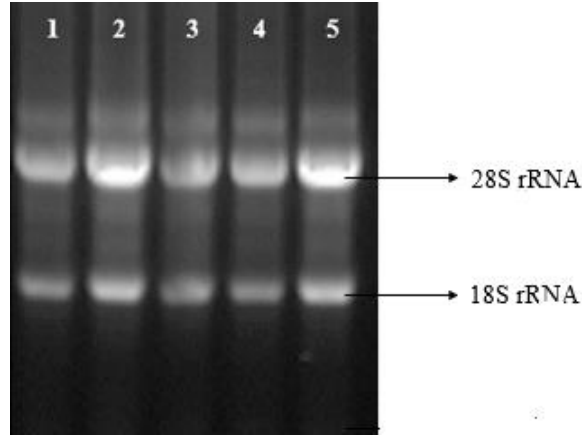
4.3.1. hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 gen ifadeleri

Farklı konsantrasyonlarda (12,5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M) 3-oxo-C₁₂-HSL ile inkübe edilen hTERT-HPNE hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra RNA miktarları nanodrop cihazıyla ölçülmüştür. 260/230 oranı 1,7'den büyük ve 260/280 oranı \cong 2,0 olan saf RNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu

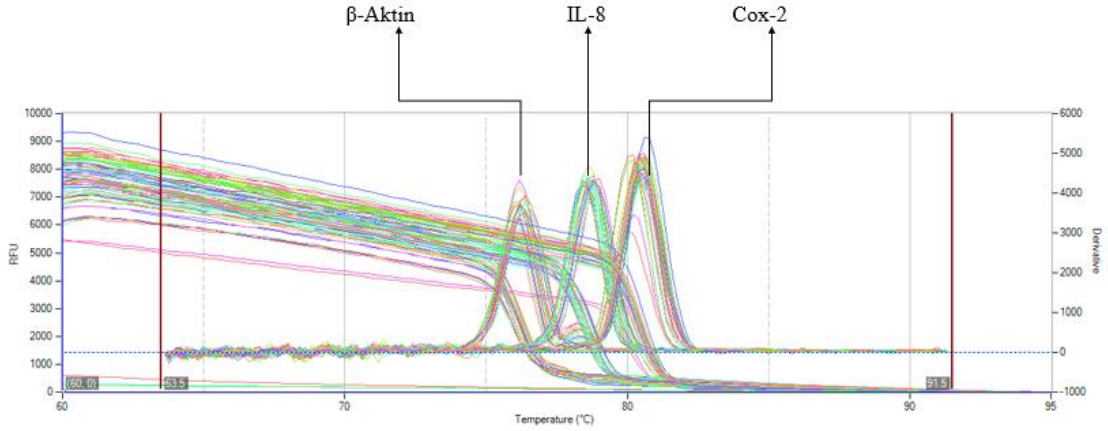
RNA	Htert-HPNE	50 μ M 3-oxo-C ₁₂ -HSL	25 μ M 3-oxo-C ₁₂ -HSL	12,5 μ M 3-oxo-C ₁₂ -HSL	DMSO Kontrol
260/280	1,89	2,09	1,9	2,05	1,94
μ g/mL	33,96	73,25	36,12	82,42	58,82

Ayrıca RNA örnekleri formaldehit jel elektroforezi aracılığıyla da belirlenmiştir. RNA örnekleri, formaldehit jel elektroforezi sonucu parçalanmadan oldukça belirgin 28S rRNA ve 18S rRNA bantları oluşturur. Özellikle 28S rRNA bandı, 18S rRNA bandının yaklaşık 2 katı kadar daha yoğun parlaklık vermesiyle ayırt edilir. Bu oran total RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin en kesin göstergesidir. Spektroskopik ölçüm sonucu RNA konsantrasyonu istenilen düzeyde çıkmış örneklerde herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır. Formaldehit agaroz jel fotoğrafları incelendiğinde ise 28S ve 18S bantlarının korunduğu, toplam RNA'larda herhangi bir yapısal yıkım olmadığı görülmüştür (Görsel 4.21).



Görsel 4.21. İzole edilen RNA örneklerinin formaldehit agaroz jel görüntüsü. 1. Kontrol hücre grubu, 2. 50 µM, 3. 25 µM, 4. 12,5 µM konsantrasyonlarda 3-oxo-C₁₂-HSL ile 24 saat inkübe olan hücrelerden izole edilen RNA, 5. DMSO kontrol.

Kontrol grubu, farklı konsantrasyonlarda test maddesi (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM 3-oxo-C₁₂-HSL) ve %0,1 DMSO uygulanan hücrelerde *Cox-2* ve *IL-8* genlerinin ifadelerinin analizleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle gerçek zamanlı PZR'da erime eğrisi grafiği incelenmiş, primer dimerlerin ve non-spesifik ürünlerin oluşmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Gerçek zamanlı PZR'da erime eğrisi analizi

Gerçek zamanlı PZR yönteminde Ct (cycle threshold) değeri, floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısının belirlemesi açısından önemlidir. Yani Ct değeri ne kadar küçükse gen ifadesinin o kadar erken döngülerde başlamaktadır. Gen ifadesinin belirlenmesi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla aşağıda belirtilen işlem basamakları sırasıyla gerçekleştirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

- ✓ Referans gene göre normalizasyon için ΔCT değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta CT = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen}).$$

- ✓ Her primer grubu için aynı verimliliği kabul etmek amacıyla $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{referans gen})$$

- ✓ İfade edilen genlerin up regüle ya da down regüle olup olmadığını $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin belirlenmesi ile analiz edilmiştir.

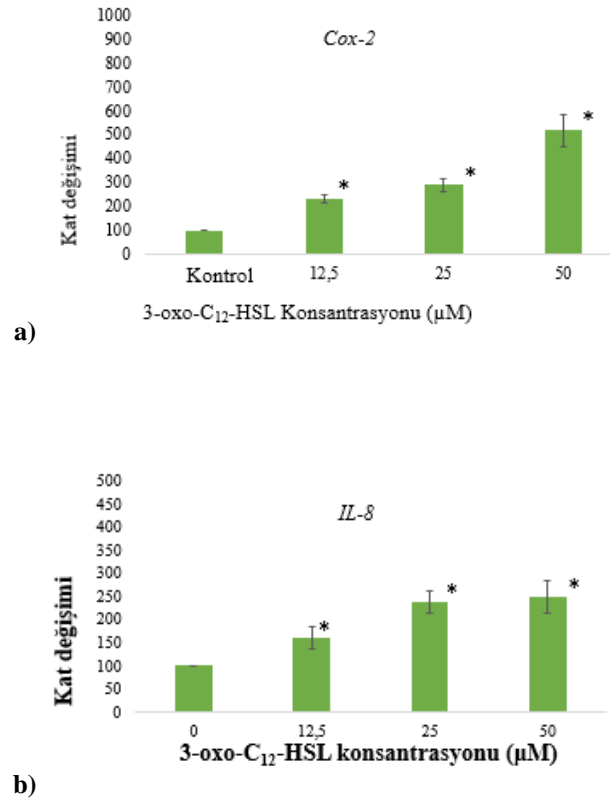
Gerçek zamanlı PZR sonuçları analiz edildiğinde, kontrol (%0,1 DMSO) grubu hücreler artan dozlarda (12,5 μM , 25 μM ve 50 μM) 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında Cox-2 ve IL-8 gen anlatımındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı

olduğu belirlenmiştir $p < 0,05$ (Tablo 4.13 ve Şekil 4.7). *Cox-2* geninin anlatım seviyesinin, hücrelere uygulanan üç farklı dozdaki en yüksek artışın kontrol grubu ($100,00 \pm 0,00$) ile karşılaştırıldığında, 5 katlık artışla ($522,47 \pm 67,17$) $50 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücrelerde olduğu görülmüştür. *IL-8* geninin anlatımındaki en yüksek artışın ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($100,00 \pm 0,00$), 2 katlık artışla ($236,40 \pm 23,66$) $25 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücrelerden elde edildiği gözlemlenmiştir.

Tablo 4.13. β -aktin geni ile normalize edilen *Cox-2* ve *IL-8* anlatımındaki değişimler

	Kontrol (DMSO)	50 μM 3-oxo- C_{12} -HSL	25 μM 3-oxo- C_{12} -HSL	12,5 μM 3-oxo- C_{12} -HSL
<i>Cox-2</i>	100,00 \pm 0,00	522,47 \pm 67,17	293,09 \pm 25,79	235,25 \pm 15,33
<i>IL-8</i>	100,00 \pm 0,00	179,53 \pm 35,38	236,40 \pm 23,66	160,55 \pm 23,01

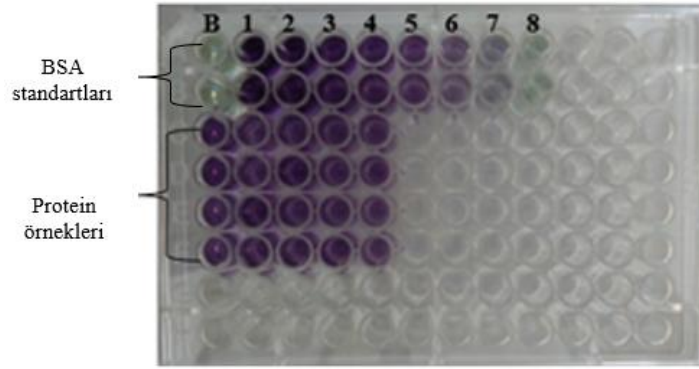
$P < 0,05$. \pm değeri standart sapmayı göstermektedir.



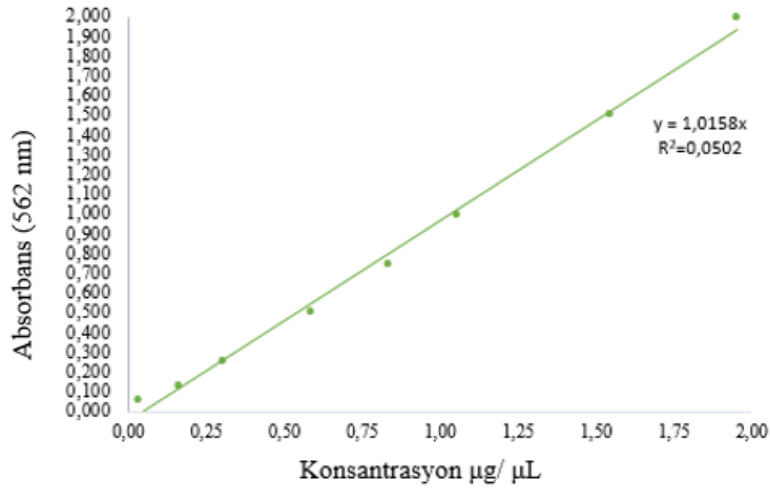
Şekil 4.3. *hTERT-HPNE* hücrelerinde gen anlatım seviyeleri, a) *Cox-2* gen anlatımı kat değişimi, b) *IL-8* gen anlatımı kat değişimi. * $p < 0,05$

4.3.2. hTERT-HPNE hücrelerindeki Cox-2 ve IL-8 proteinlerinin analizi

hTERT-HPNE hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (12,5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M) 3-oxo-C₁₂-HSL uygulandıktan sonra protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam protein konsantrasyonu, indirgenen proteinlerin bisikoninik asit (BCA) ile verdiği renk reaksiyonlarının spektrofotometrik olarak 562 nm’de ölçülmesinin ardından standart grafik oluşturularak 1 μ g/ μ L olarak belirlenmiştir (Görsel 4.22). Protein tayini sonucunda elde edilen protein konsantrasyonları eşit olarak belirlenmiştir. Jelde bulunan her bir kuyucuğa eşit olacak şekilde 25 μ g protein yüklenmiştir.

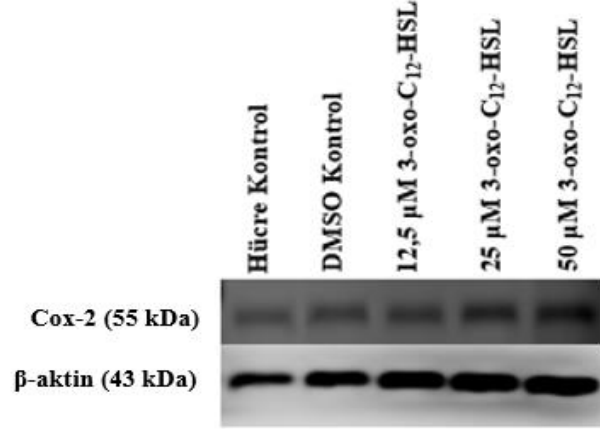


Görsel 4.22. Bisikoninik asit yöntemiyle protein konsantrasyonunun belirlenmesi, B: Blank, 1: 2 μ g/ μ L, 2: 1,5 μ g/ μ L, 3: 1 μ g/ μ L, 4: 0,75 μ g/ μ L, 5: 0,5 μ g/ μ L, 6: 0,25 μ g/ μ L, 7: 0,125 μ g/ μ L ve 8: 0,0025 μ g/ μ L. Protein örnekleri DMSO kontrol, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M ve hücre kontrol. BSA: Bovin serum albümin



Şekil 4.4. BCA yöntemi standart eğrisi

Western Blot analizi, 3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen hTERT-HPNE hücrelerinde Cox-2 ve IL-8 proteinlerinin ifadesindeki değişimin gözlemlenmesi amaçlanarak yapılmıştır. Housekeeping olarak kullanılan β-aktinin (43 kDa) hem farklı konsantrasyonlarda 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücrelerde hem de kontrol (DMSO) hücresinde ifade edildiği görülmüştür (Görsel 4.23).



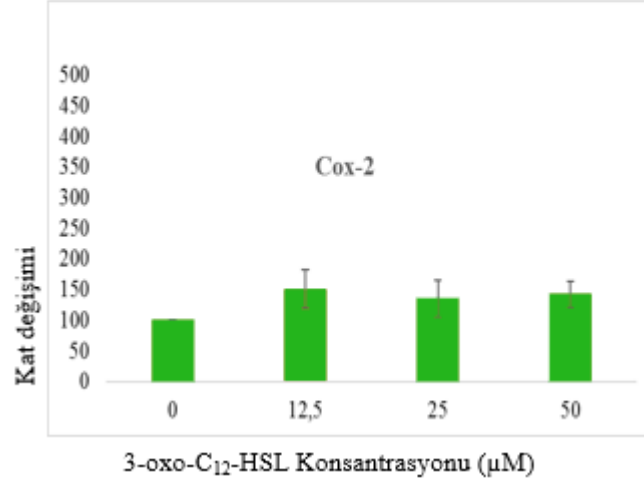
Görsel. 4.23. Cox-2 ifadesi Western Blot sonucu

Kontrol (%0,1 DMSO) grubu hücre artan dozlarda (12,5 μM, 25 μM ve 50 μM) 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında Cox-2 proteininin ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir $p < 0,05$ (Tablo 4.14 ve Şekil 4.6). Cox-2 proteininin, hücrelere uygulanan üç farklı dozdaki en yüksek artışın kontrol grubu (100,00±,00) ile karşılaştırıldığında 1,5 katlık artışla (151,38±31,44) 12,5 μM konsantrasyonunda 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücrelerde olduğu görülmüştür.

Tablo 4.14. β-aktin geni ile normalize edilen Cox-2 proteininin ifadesindeki değişimler

Western Blot	Kontrol (DMSO)	50 μM 3-oxo-C ₁₂ -HSL	25 μM 3-oxo-C ₁₂ -HSL	12,5 μM 3-oxo-C ₁₂ -HSL
Cox-2	100,00±,00	143,16±21,49	135,02±29,95	151,38±31,44

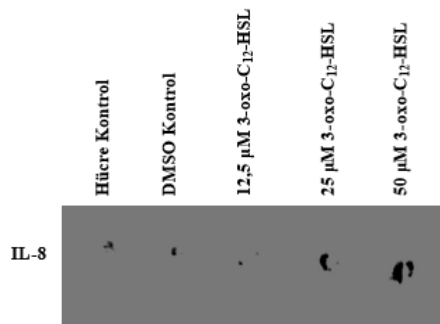
$P < 0,05$ ± değeri standart sapmayı göstermektedir.



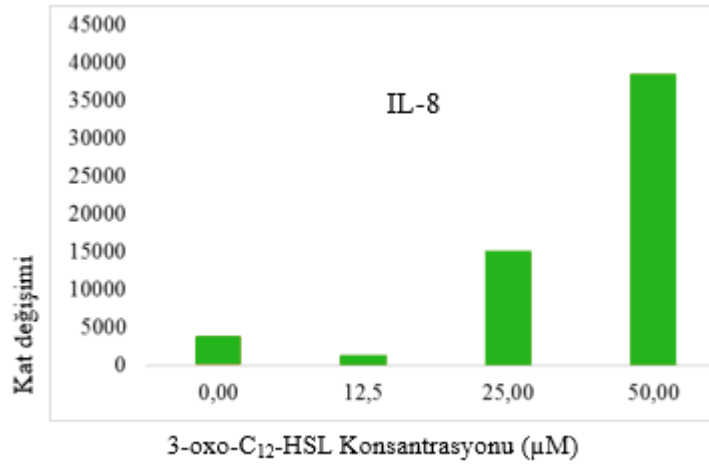
Şekil 4.5. 3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen *hTERT-HPNE* hücrelerinde *Cox-2* proteini kat değişimi

3-oxo-C₁₂-HSL ile muamele edilen *hTERT-HPNE* hücrelerinde IL-8 proteinin Western Blot analizi sonucu gen ifadesindeki değişiklik görüntülenememiştir. Bu nedenle Dot Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

Dot Blot sonucunda, IL-8 birincil antikoruyla işaretlenen 3-oxo-C₁₂-HSL'nin farklı konsantrasyonları uygulanan (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) protein örneklerinin konsantrasyonları analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyasladığımızda konsantrasyona bağlı olarak IL-8 proteinin konsantrasyonunda artış gözlemlenmiştir (Görsel 4.24. ve Şekil 4.6).



Görsel 4.24. IL-8 proteininin ifadesi Dot Blot sonucu.



Şekil 4.6. 3-oxo- C₁₂-HSL ile muamele edilen *hTERT-HPNE* hücrelerinde *IL-8* protein yoğunluğu

5. TARTIŞMA

5.1. İzolatların Klinik Örneklerle ve Hastane Servislerine göre Dağılımı

Hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık rastlanan etkenlerinden biri olan *P. aeruginosa* morbidite ve mortaliteyi arttıran antibiyotik direnci nedeniyle özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Genel olarak nemli ortamlarda kolonizasyon oluşturan *P. aeruginosa*, hastanelerde çok geniş yaşam alanına sahiptir. *P. aeruginosa* farklı vücut bölgelerinde yaşam alanı oluşturmakla birlikte solunum yoluna ait klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir (Chatterjee vd., 2016). Özellikle ventilatörle ilişkili enfeksiyonlarda rol oynamasına rağmen üriner sistem enfeksiyonlarında da karşılaşılan fırsatçı bir patojen olarak bilinmektedir (Ardıç vd., 2004; Berktaş vd., 2011; Mittal vd., 2009).

Bu çalışmada izole edilen *P. aeruginosa* suşları elde edildiği klinik örnekler açısından değerlendirildiğinde; %49'unun (%29 balgam ve %20 trekea) solunum yolu ve ikinci sıklıkta ise %28 oranında idrar örneklerine ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri tarafından yayınlanan son raporda, genel olarak yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının %13'ünün solunum yoluna ait örnekler olduğu belirtilmiştir (Chatterjee vd., 2016). İran'da yapılan bir çalışmada hastane kaynaklı 500 izolat çalışmaya dahil edilmiş ve bu izolatların 150'si *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların 92'si solunum yolu, 23'ü üriner sistem örneklerinden ve kalan 35 izolat ise diğer klinik örneklerden izole edildiği bildirilmiştir (Jamshidi vd., 2009). Türkiye'de yapılan bir çalışmada izole edilen 636 *P. aeruginosa* izolatının hastane servislerindeki dağılımı araştırılmış olup en yüksek oranın %36 solunum yolu örneklerinden balgama ait olduğu görülmüştür. Daha önceki yapılan çalışmalarda olduğu gibi sonuçlarımızda da *P. aeruginosa*'nın büyük bir oranla solunum yoluna ait örneklerden izole edildiği görülmüştür. Bu durum gerekli sterilizasyon önlemlerinin tam olarak alınmadığı solunum cihazlarında *P. aeruginosa*'nın kolonizasyon yaparak bir bulaş etmeni olarak risk taşıdığına işaret etmektedir.

İzole ettiğimiz *P. aeruginosa* suşları, hastane servisleri bakımından incelendiğinde en fazla %38'lik oranla yoğun bakım ünitesinden, %21'lik oranla ikinci göğüs hastalıkları ünitesinden, %12 oranla üçüncü sırada ise üroloji ünitesinden izole edildiği görülmüştür

(Tablo 4.1). Türkiye’de hastane kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonlarıyla yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan biri olan geniş çaplı sürveyans çalışmasında, bir yıllık süreç içerisinde 307 *P. aeruginosa* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların hastane servislerine göre dağılımı incelendiğinde ise en yüksek değerle 106 izolatu yoğun bakım ünitesinden izole edildiği belirtilmiştir (Jones et al., 2005). Yapılan başka bir çalışmada ise hastalık etmeni olan *P. aeruginosa* izolatu’nun %68,8’i yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir (Özer vd., 2016). Diğer bir çalışmayla Akçay vd., (2003) yoğun bakım ünitelerinden izole edilen bakterilerin %52’sinin *P. aeruginosa* olduğunu bildirmiştir. Yurt dışında da *P. aeruginosa* izolatu’nun Avrupa’da 17 ülkeden 1417 yoğun bakım ünitesinin dahil olduğu European Prevalence Infection in Intensive Care (EPIC) çalışmasında, en sık izole edilen bakterinin *P. aeruginosa* olduğu görülmüştür (Samad vd., 2017). Harris vd., (2016) yapmış oldukları çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde yatan 1840 hastanın 213 tanesinde *P. aeruginosa*’nın kolonizasyon oluşturduğunu tespit etmiştir. Literatürde de görüldüğü gibi *P. aeruginosa* sıklıkla yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir. Bunun nedeni fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa* yoğun bakım üniteleri gibi immün sistemi baskılanmış hastaların bulunduğu servislerde kolaylıkla kolonizasyon oluşturması ile açıklanabilir.

5.2. *P. aeruginosa*’nın Antibiyotik Duyarlılıkları

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun bakım, göğüs ve enfeksiyon hastalıkları ünitelerinde aşırı ve bilinçsiz bir şekilde kullanılması bu ortamda dirençli ve aynı plazmid paternine sahip mutantların seleksiyonuna yol açmaktadır (Chatterjee vd., 2016).

P. aeruginosa’nın birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmasının yanı sıra tedavi sırasında ya da herhangi bir nedenle oluşan mutasyonla antibiyotiğe dirençli hale gelmesi, son zamanlarda çoklu ilaç direncini aşan panrezistan suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Xiong vd., 2017). Özellikle günümüzde 3. kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler, karbapenemler, antipseudomonal penisilinler ve kinolon grubu antibiyotikler tedavi için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, 3. kuşak sefalosporinlerden özellikle seftazidime karşı bakteriyel direncinin arttığını göstermiştir. Bu dirençin %55-%83 arasında değiştiği ileri sürülmüştür (Kos, McLaughlina ve Gardner, 2016; Kutu vd., 2015). Sefalosporinlere karşı artan bu direnç profilinin nedeninin dış zar geçirgenliğindeki

azalma, efluks pompa sistemi ya da sefalosporinaz enziminin aşırı sentezlenmesine bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir. Ancak Amerika’da yapılan başka bir çalışmada ise hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının %14,9 gibi daha düşük bir oranla seftazidime karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Humphries vd., 2017). Türkiye’de yapılan bir çalışmada hastanelerinin çeşitli servislerinden 287 *P. aeruginosa* izole edilmiştir. Söz konusu çalışmada bu izolatlarının %39’unun seftazidime karşı dirençli olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmaya göre yoğun bakımdan izole edilen suşların ise %62’sinin seftazidime karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Akçay vd., 2003). Bu çalışma sonucunda *P. aeruginosa* izolatlarının 3. kuşak sefalosporin olan seftazidime karşı %100 dirençli olduğu gibi ilginç bir şekilde yüksek oran bulunmuştur. Burada bulduğumuz sonuçlar Türkiye’de yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler nitelikte olmasına rağmen çok daha yüksek bulunmuştur. Diğer ülkelerdeki çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda bu çalışmada seftazidim direncinin önemli derecede yüksek olmasının nedeninin antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki ilişkiyle birlikte, antibiyotiğe bağlı olarak ortamdaki bakteri dağılımı ve direnç oranlarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışma sonucunda seftazidim dirençli izolatların karbapenem ve aminoglikozit antibiyotiklerine karşıda yüksek oranda dirençli olduğu görülmüştür.

Karbapenemler bilinen en geniş spektrumlu β laktam grubu antibiyotiklerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, *P. aeruginosa*’larda karbapenemazların varlığının antibiyotik dirençliliği ile ilgili olduğu bulunmuştur (Fujimura vd., 2009; Rizek vd., 2014; Yaman vd., 2014). Çok sayıda karbapenem grubu antibiyotik bulunmakla birlikte, *P. aeruginosa* kökenlerine karşı etkin antibiyotik olmaları açısından imipenem ve meropenem amprik tedavide sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında da imipenem ve meropenem direnç profili analiz edilmiş ve izolatların %21 oranında meropenem ve %33 oranında ise imipeneme karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Venezuela’da yapılan bir çalışma sonuçları bu çalışma ile karşılaştırıldığında karbapenem direncinin yaklaşık olarak %50 daha fazla olduğunu göstermiştir. Söz konusu bu çalışmada hastanelerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarındaki karbapenem direncinin %66’lara kadar çıktığı görülmüştür (Labarca vd., 2016). Brazilya’da yapılan bir çalışmada hastaneden izole edilen karbapenem dirençli 129

P. aeruginosa izolatının sadece 50 tanesinde karbapenemaz enziminin varlığı tespit edilmiştir. Karbapenem dirençliliğinin dış zar proteinlerinin değişimi ve efluks pompa sistemi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Rizek vd., 2014). Boeckel vd., (2014) yılında yapmış oldukları bir derlemede ise karbapenem direncinin Amerika'da %35 olduğunu belirtmiş, bu oranın Brazilya, Rusya, Hindistan, Çin ve Güney Afrika'da yaklaşık olarak %76'ler gibi çok yüksek değerlere ulaştığını bildirmişlerdir.

P. aeruginosa tedavisinde kullanılan diğer bir antibiyotik grubunu ise florokinolonlar oluşturmaktadır. Bu bakterilerin florokinolonlara karşı direnç kazanma mekanizmasının kromozomal mutasyonlara dayandığı bilinmektedir (Safarika vd., 2015). Bu çalışmada, *P. aeruginosa*'nın florokinolon grubu antibiyotiklerden levofloksasine karşı dirençliliği test edilmiş ve %38 oranında bir direnç profili gösterdiği bulunmuştur. Ülkemizde ise 9 merkezin katılımı ile yapılan çalışmada, *P. aeruginosa*'nın %30 direnç oranına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada idrar yollarından izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında levofloksasin direncinin %31,5 olduğu bildirilmiştir (Er, Şen ve Altındış., 2015). Safarika vd., (2015) yapmış oldukları bir çalışmada; Kanada'da 19 sağlık merkezinin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının florokinolan antibiyotik grubundan olan levofloksasine karşı %68 oranında dirençli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ülkemizde elde edilen direnç oranları ile benzerlik göstermesine rağmen yurt dışında yapılan çalışma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında daha düşük bir oran belirlenmiştir. Bu durum, ülkemizde florokinolon grubu antibiyotiklerin yurtdışına oranla daha az kullanıldığını ve dolayısıyla bakterilerin bu antibiyotiğe karşı daha düşük direnç profili sergilediğini göstermektedir.

Günümüzde rasyonel olmayan antibiyotik kullanımı, hızla yükselen antibiyotik dirençliliğine yol açmaktadır. Sentezlenen yeni grup antibiyotiklerin direnç oranları ise gün geçtikçe artmaktadır. Son zamanlarda, yeni grup antibiyotik sentezlemek yerine var olan antibiyotiklerin çeşitli kombinasyonları kullanılarak sinerjik etki yaratılmaya çalışılmaktadır. *P. aeruginosa*'nın genomunun büyük olması nedeniyle birden çok direnç paterni geliştirebildiği için antibiyotik kombinasyonlarından olumlu sonuçlar alınmaktadır. Özellikle β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonu içerisinde sefoperazon-sulbaktam ve piperasilin tazobaktam antibiyotikleri *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılmaktadır (Zelenitsky vd., 2016; Ak vd., 2016). Çeşitli ülkelerde yapılan farklı

çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın piperasilin-tazobaktam'a dirençlilik oranlarının Fransa'da %22 (Bonten ve Weinstein 2002), Kanada'da %9,3, Amerika'da %16, Belçika'da %17 (Uzun vd., 2012) olduğu rapor edilmiştir. Yapmış olan bir derlemede SENTRY antimikrobiyal sürveyans programında Avrupa ve Latin Amerika ülkelerinde ve HİTİT-2 antimikrobiyal sürveyans programında Türkiye'de piperasilin-tazobaktamın en etkili antibiyotik olduğu belirlenmiştir (Uzun vd., 2012). Piperasilin-tazobaktam ise yurt dışı ve yurt içinde yapılan sürveyans çalışmalarda etkin antibiyotiklerden biri olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonu antibiyotiklerden piperasilin tazobaktam kullanılmış ve yukarıda belirtilen literatürlerle benzer sonuç olarak dirençlilik paterni %16 olarak belirlenmiştir.

P. aeruginosa'nın dirençliliğini test ettiğimiz başka bir antibiyotik olan kolistin (polimiksin E) antibiyotiği, Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan anyonik yapıdaki lipopolisakkaritlere bağlanıp zar geçirgenliğini bozarak bakterileri inhibe etmektedir. Günümüzdeki çalışmalar *P. aeruginosa*'nın kolistine yüksek oranda duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ise hastanenin çeşitli ünitelerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarına karşı kullanılan en etkili antibiyotiğin kolistin olduğu bulunmuştur. Bu sonuç %1'lik direnç profili oluşturmasıyla literatürü destekler niteliktedir. Türkiye'de yapılan çok yeni çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde, Ankara, Eğitim Araştırma Hastanesi'nin yoğun bakım ünitelerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarına uygulanan diğer antibiyotiklere karşı kolistin yüksek oranda duyarlı olduğu belirtilmiştir (Varışlı vd., 2017). Yapılan başka bir çalışmada ise klinik izolatların kolistin antibiyotiğine karşı %7 oranında direnç profili sergilediği bildirilmiştir (Durmaz ve Özer, 2015). Örneğin çeşitli ülkelerde yapılan yapılan çalışmalarda çoklu ilaç direnci gösteren *P. aeruginosa* izolatlarından kaynaklanan enfeksiyonlarda, en etkili antibiyotiğin kolistin olduğu bildirilmiştir (Haworth vd., 2014; Neang vd., 2015; Yamagishi vd., 2017; Wi vd., 2017).

Aminoglikozid grubu bir antibiyotik olan gentamisin ise *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılan bir diğer antibiyotiktir. Fakat son zamanlarda aminoglikozidlerin nefrotoksik ve geri dönüşümsüz ototoksik yan etkilerinden dolayı çok tercih edilmemeye başlanmıştır (Kang vd., 2017). Bu çalışmada da gentamisinin *P. aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkisi test edilmiştir. Klinik izolatların %32 oranında direnç profili sergilediği görülmüştür. Ülkemizde göze çarpan bir çalışmada klinik kökenli

P. aeruginosa izolatlarının bu çalışmadaki sonuçlardan farklı olarak yaklaşık iki kat daha fazla gentamisine dirençli olduğunu bulmuşlardır. Söz konusu çalışmada gentamisin dirençliliğinin %70 olduğu bildirilmiştir (Duman vd., 2012). Yurt dışında yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatları gentamisine karşı %40,5 oranında direnç profili sergilerken (Ameen vd., 2016), başka bir çalışmada ise *P. aeruginosa*'nın gentamisin direnci %91,3 gibi bir oranla çok yüksek olduğunu görmüşlerdir (Hombach vd., 2017).

Antipseudomonal antibiyotik olarak kullanılan ve aminoglikozid grubu olan bir diğer antibiyotik ise tobramisindir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* tobramisine karşı %25 oranında dirençli bulunmuştur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 665 *P. aeruginosa* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı *in vitro* duyarlılıkları test edilmiş olup, izolatların tobramisine karşı %77 oranında dirençli olduğunu bulmuşlardır (Dündar ve Sönmez, 2009). Dikkat çeken başka bir çalışma sonuçlarına baktığımızda klinik kökenli *P. aeruginosa* izolatları %91 gibi yüksek bir oranla tobramisine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Kireççi ve Sevinç, 2008). Ülkemizde yapılan bu yüksek sonuçlardan farklı olarak yapılan bir çalışmada ise hastane kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında en etkili antibiyotik grubunun %11,4'lük duyarlılık oranıyla tobramisin olarak belirlenmiştir (Gültekin vd., 2014).

Sonuç olarak *P. aeruginosa* izolatlarının farklı hastanelerde hatta bir hastanenin farklı servislerinde bile kullanılan antibiyotiğin yoğunluğuna ve çeşidine göre farklı direnç profili sergilediği görülmüştür. Bu durumdaki farklılığın izolatların elde edildiği hastanenin *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda kullandığı antibiyotiklerle ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle her hastanenin antibiyotik direnç gelişimi sürekli olarak takip edilmelidir. Akılcı antibiyotik kullanım politikası takip edilerek antibiyotikler bireye özgü karar verilip, antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre uygulanmalıdır. Böylece antibiyotik direnç probleminin önüne geçilebilmesine katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

5.3. Biyofilm Oluşumu

P. aeruginosa'nın daha öncede bahsedildiği gibi birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmasının yanı sıra bakterinin biyofilm oluşturabilme yeteneği antibiyotik dirençliliğinde rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Biyofilm tabakası antibiyotik penetrasyonunu azalttığı için antibiyotikler bakterilere ulaşamaz. Aynı zamanda

esktrasellüler matriks içerisinde gömülü halde olan bakteriler birbirlerine yakın halde buldukları için direnç genlerinin aktarılması çok daha hızlı olarak gerçekleşir (Perez vd., 2016).

Aşırı antibiyotik kullanımının ekzopolisakkarit aljinat üretimini artırarak, mukoid özellikte izolatların oluşumuna neden olduğu ve bakterilerin biyofilm üretimini tetiklediği belirtilmiştir (Karaman vd., 2010; Deziel, Comeau ve Villemur, 2001). Bu duruma örnek olarak Brezilya’da yapılan 157 klinik izolatla yapılan çalışmada, izolatlar arasından metallo-β-laktamaz üreten izolatların karbapeneme dirençli olduğu ayrıca adeziv özellikte olduğu ve tamamının biyofilm ürettiği gösterilmiştir (Goncalves vd., 2017). Biyofilm oluşturan izolatların antibiyotiklere karşı bin kat daha fazla dirençli olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Perez vd., 2016; Chatterje vd., 2017; Sabaeifard vd., 2017).

P. aeruginosa’nın biyofilm oluşumu farklı yöntemlerle belirlenmektedir. Mikrotitrasyon ve hücre akış yöntemleri, absorbans ölçümüne dayanmakta olup kantitatif sonuçlar elde edilmekte, tüp yönteminde ise biyofilm oluşumu kalitatif olarak belirlenmektedir (Sharvari ve Chitra 2012; Perez vd., 2016). Bu çalışmada ise hastane kaynaklı 100 *P. aeruginosa* izolatının biyofilm oluşumu tüpte biyofilm oluşumu ve mikrotitrasyon yöntemleriyle test edilmiştir. İzolatların %67’sinde tüpte biyofilm yöntemine ve aynı izolatların %76’sında ise mikrotitrasyon yöntemine göre pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu oransal farklılığın nedeninin kantitatif bir yöntem olan mikrotitrasyon yönteminin, kalitatif bir yöntem olan tüpte biyofilm yöntemine göre daha geçerli olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise solunum yoluna ait klinik örneklerden elde edilen 60 *P. aeruginosa* izolatının biyofilm oluşturma özelliği tüp yöntemi ile test edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bu izolatların biyofilm üretimi %33,3 (20/60) oranında bulunmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada biyofilm oluşturan 20 izolatın slime faktör üretmek mukoid özellikte koloni morfolojisi gösterdiği de bildirilmiştir (Çoban vd., 2009). Söz konusu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmada da solunum yolundan izole edilen bakterilerin diğer klinik örneklere göre daha yüksek oranda biyofilm üretimine sahip olduğu belirlenmiştir. Üstelik bu çalışmada izolatların aminoglikozid grubuna ait bir antibiyotik olan gentamisin direnci ile biyofilm üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durumun nedeninin

biyofilm içerisindeki bakterilerin yavaş büyümesi ve biyofilm tabanında azalan oksijen miktarı gibi faktörlerden kaynaklandığı söylenebilir. Özellikle aminoglikozit grubu antibiyotiklere karşı direncin, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü aljinat polimerlerine bağlanmasıyla birlikte antibiyotik penetrasyonu için bir bariyer yapmasıyla ilişkili olduğu düşünülebilir. Aynı zamanda bu çalışmada, klinik izolatlar slime faktör yönünden de incelenmiş, göğüs hastalıkları ünitesinden elde edilen izolatların %42,86'sı mukoid özellikte koloniler oluşturup, slime faktör pozitif olarak değerlendirilmiştir. Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada klinik *P. aeruginosa* izolatları dirençli ve duyarlı izolatlar olmak üzere iki grup altında incelenmiştir. Duyarlı *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumu %40, dirençli izolatların ise %42,8'lik daha yüksek oranla biyofilm oluşturabildikleri test edilmiştir (Aktaş vd., 2005). Amerika'da yapılan bir çalışmada; hastanenin çeşitli ünitelerinden elde edilen çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n:50) biyofilm üretimi mikrotitrasyon yöntemi ile test edilmiş ve bütün izolatların biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Perez vd., 2016).

5.4. Quorum Sensing ve Virülans Faktörler

P. aeruginosa'nın biyofilm oluşturabilmesi ve virülans faktörlerini üretebilmesi QS mekanizmasının kontrolü altındadır. QS mekanizmasında rol oynayan *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* genlerinin HSL sentezinde önemli rol üstlendiği bilinmektedir. Artan bakteri popülasyonuna bağlı olarak eşik seviyeye ulaşan HSL miktarı diğer bakteriler tarafından algılanarak ilgili virülans faktörleri sentezlemesinde rol oynar (Silva vd., 2014).

Bu çalışmada, *P. aeruginosa*'nın konakçı savunmasına karşı geliştirdiği HSL, piyosiyenin, elastaz ve proteaz gibi önemli virülans faktörler test edilmiş ayrıca biyofilm oluşumunda *P. aeruginosa* izolatlarının bir yüzeye yapışması ve kolonizasyonunda önemli olan hareket edebilme özelliği QS yönünden değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa*'nın hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturmasının temel nedeni çok sayıda virülans faktöre sahip olmasıdır. Bu nedenle enfeksiyonların kökenine inebilmek için sahip olduğu virülans faktörlerin bilinmesi gerekmektedir.

Çalışmada izolatlar HSL bakımından değerlendirildiğinde; 51 izolatın HSL üretiminin pozitif, 49 izolatın ise HSL üretiminin negatif olduğu bulunmuştur. HSL sinyal molekülü üretmeyen izolatların ise elastaz ve piyosiyenin gibi diğer virülans faktörlerini

ürettiği görülmüştür. Benzer sonuçlar Erickson vd.,'nin (2002) yaptığı çalışmada; *P. aeruginosa*'nın HSL üretim miktarının belirlenmesi için optimum koşullar sağlanmasına rağmen bazı izolatların HSL ürettiği görülmüş, bazı izolatlarda ise HSL üretimine rastlanılmamıştır. Aynı çalışmada izolatlar virülans faktör üretimi bakımından değerlendirilmiştir. Fakat HSL üretemeyen izolatların proteaz, piyosiyenin ve elastaz virülans faktörlerini üretebildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Tınaz vd.,'nin (2005) yapmış olduğu çalışma verileriyle bazı farklılıklar göstermektedir. Söz konusu çalışmada incelenen 50 *P. aeruginosa* izolatında HSL üretimi pozitif olarak bulunmuştur. Fakat bunların bazılarında virülans faktör sentezlenmediği bildirilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucu, virülans faktörlerin üretimi genellikle QS mekanizması kontrolü altında olan HSL sinyal iletim moleküllerine dayandırılmaktadır. Fakat bir bakterinin virülans faktörlerinin değerlendirilmesinin temelinde yatan mekanizmanın sadece sinyal moleküllerin olmadığına yönelik sonuçların bulunduğu çalışmalarda bulunmaktadır. Çünkü sinyal iletim mekanizmasındaki herhangi bir bozukluk sonucu bile bakteri izolatları virülans faktör sentezleyerek konakta enfeksiyon oluşturabileceği ileri sürülmektedir (Ulusoy, 2007). Yapılan çeşitli hayvan çalışmalarında; *P. aeruginosa*'nın QS mekanizmasında görev alan genlerde meydana gelen herhangi bir mutasyonun, virülans faktörlerin birçoğunun kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Pearson vd., 2000; Silva vd., 2014; Chugani ve Greenberg, 2014). Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda; *P. aeruginosa*'da sadece lasI ve rhl sistemler'inin olmadığı bunun dışında kinolon sisteminin de bulunduğu gösterilmiştir (Kohler vd., 2014; Viducic vd., 2017). Dolayısıyla virülans faktör üretimindeki azalmanın sadece las ve rhl sistemlerine bağlı olmadığını birden çok mekanizmadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bakterinin bulunduğu çevresel koşulların virülans faktörlerin ifade edilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Schaber vd., 2004). *P. aeruginosa* tarafından sekonder metabolit olarak üretilen piyosiyenin pigmenti, mavi-yeşil renkte olan önemli bir virülans faktördür. Yapılan çalışmalar piyosiyenin hücre solunumunu inhibe ettiği ve α 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek akciğerlerde hasara sebep olduğunu ortaya koymuştur (Karatuna ve Yağcı, 2008). Bu çalışmada ise hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) 65'inde (%65) piyosiyenin üretimi pozitif ve 35 (%35)'inde ise negatif olarak belirlenmiştir. Klinik örnekler açısından değerlendirildiğinde

ise literatürle benzer şekilde piyosiyenin üretimini yoğun bakım, göğüs hastalıkları ve üroloji servisinden elde edilen enfeksiyon riski taşıyan izolatlar oluşturmuştur. Piyosiyenin üretiminin araştırılmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bir tanesi Silva vd.,'nın (2014) yaptığı kistik fibrozisli hastaların solunum yolundan elde ettiği *P. aeruginosa* izolatlarının piyosiyenin üretim miktarlarını belirlemiş ve trekeal aspirat klinik örneklerinden izole edilen bakterilerin yüksek oranda piyosiyenin oluşturduğunu bildirmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise farklı nişlere sahip (toprak, su ve çeşitli klinik örnekler) 63 *P. aeruginosa* izolatın 43'ünün yüksek oranda (9,3 ve 5,9 µg/mL) piyosiyenin ürettiği ve özellikle klinik örneklerden üroloji servisinden elde edilenlerde bu oranın daha yüksek olduğu saptanmıştır (El-Fouly vd., 2015). Sonuçların çeşitli klinik örneklere bağlı olarak farklı miktarlarda piyosiyenin üretilmesinin temel sebebinin, değişen çevresel koşullara bağlı olarak bakterilerin farklı fenotip özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde piyosiyenin üretimi ile QS mekanizması arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır (Dietrich vd., 2006). Piyosiyenin üretimini düzenleyen QS mekanizmasında görev alan sinyal moleküllerinin olduğu ve üretimi doğrudan *rhl* sistemi tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir. Fakat *rhl* sisteminin aktif hale gelebilmesi için öncelikli olarak *las* sisteminin etkin olması gerekmektedir (Schaber vd., 2004; Kievit ve Iglewski, 2000). Bu çalışmada ise *rhl* sisteminde bulunan herhangi bir genin eksikliğinde, solunum yolu ve göğüs hastalıklarından izole edilen örneklerde, piyosiyenin üretiminin çok düşük miktarda olduğu ya da hiç üretilmediği gözlemlenmiştir.

Söz konusu durum önemli bir diğer virülans faktör olan elastaz üretiminde de görülmüştür. Bu çalışmada elastaz üretimi %66 oranında belirlenmiştir. Hastane servisleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmakla birlikte ($p < 0,05$), yoğun bakım ünitelerinden elde edilen solunum yolu örneklerinin elastaz değeri, enfeksiyon servisindekilere oranla anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Literatürde elastaz üretimi ve QS arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışmaya rastlanmıştır (Karatuna ve Yagci, 2010; Szamosvári vd., 2016; Criq vd., 2017). Woods vd., (1986) yapmış oldukları çalışmada yara, idrar, trekeal aspirat ve kan gibi farklı klinik örneklerden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarında virülans faktör bakımından farklılıklar araştırılmıştır. Akut pnömoni hastalarının izolatlarında diğer

linik örneklerle oranla yüksek düzeyde elastaz üretimine rastlamışlardır. Kistik fibrozisli hastaların balgamlarından izole edilen klinik örneklerde ise elastaz ve proteaz miktarlarının daha düşük oranda olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise *P. aeruginosa* kaynaklı akciğer patogeneziinde elastaz üretiminin arttığı ve solunum yolu örneklerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarında %76 oranında elastaz üretimi olduğu bildirilmiştir (Karatuna, 2008). Schaber vd.,'nin (2004) yaptıkları bir çalışmada; farklı enfeksiyonlardan elde edilen *P. aeruginosa* 200 izolatının elastaz oluşumunu araştırmış ve QS mekanizması sorunlu 5 izolatın elastaz üretmediğini göstermiştir. Ayrıca doğrulama testleri yapılmış, elastin kongo kırmızısı kullanılarak kantitatif bir veri elde etmek için bu izolatların süpernetantlarının absorbansları ölçülmüştür. Ayrıca LasB özgül antikorlar kullanılarak immünblotlama yöntemiyle elastaz aktivitesi belirlenmeye çalışılmış fakat elastaz aktivitesine rastlanmamıştır. Yapılan literatür taraması, elastaz üretiminin de QS mekanizmasının denetimi altında olduğunu göstermiştir.

P. aeruginosa'ya ait önemli bir diğer virülans faktör ise proteazdır. Özellikle akut akciğer enfeksiyonlarının başlangıç aşamalarında fibrinin erimesinde rol oynayarak enfeksiyonların ilerlemesine neden olur. Ayrıca elastaz gibi doku bütünlüğünün bozulmasına sebep olarak bakterilerin dokular arasında kolonizasyonunu sağlamaktadır (Maçın vd., 2017). Karatuna, 'nın (2008) yapmış olduğu çalışmada 16 izolatı çalışmaya dahil etmiştir. PZR analizi sonucu bu izolatlardan 9'unun QS genlerinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu 9 izolatın proteaz üretimi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında eşik değerinin üzerinde bulunmuş, bir izolatın ise QS genleri pozitif olmasına rağmen proteaz üretmediği bildirilmiştir. QS gen ya da genleri bulunmayan 7 izolatın yoğun bakım ünitesi hastalarına ait olduğu ve antibiyotik tedavisi gördüğü bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise proteaz testi sonucunda izolatların (n: 100) 88'inde (%88) proteaz aktivitesi pozitif, 22'sinde negatif olarak belirlenmiştir. Proteaz aktivitesi pozitif olan izolatların solunum yoluna ait klinik örnekler olduğu belirlenmiştir.

P. aeruginosa'nın hücreler arası sinyal iletiminde, yüzeye tutunarak kolonizasyon ve biyofilm oluşturabilmesinde önemli rol oynayan bir diğer virülans faktörü ise hareket edebilme özelliğidir. Flajel aracılığıyla olan yüzme hareketi, Tip IV pili aracılığıyla olan titreme hareketi ve flajel ile Tip IV pili kombinasyonuyla gerçekleşen kayma hareketi olmak üzere üç farklı tip özelliğe sahip bir bakteridir. QS ile motilite arasındaki ilişkinin

incelendiğine yönelik literatürde farklı çalışmalar yapılmıştır (Schaber vd., 2004; Harmer vd., 2013; Maçın vd., 2017). Schaber vd.,'nın (2007) yapmış oldukları çalışmada; QS mekanizmasında meydana gelen herhangi bir problemin bakterinin titreme ve kayma hareketini belirgin şekilde etkilediği bildirilmiştir. Hareket yeteneğini kaybeden izolatların ise invazyon özelliğini kaybederek olgun biyofilm yoğunluğunun belirgin şekilde dağılarak azaldığını kayıt etmişlerdir. Dikkat çeken başka bir çalışmada ise *lasI* ve *rhlI* gen bölgeleri hatalı olan küçük koloni varyantlarının titreme ve yüzme hareketi yapamadığını ve bu gen bölgelerinin bakterinin hareket yetenekleri ile ilişkili olduğunu tespit edilmiştir (Deziel, Comeau ve Villemur, 2001). Bu çalışmada ise *las* ve *rhl* genlerinin bulunmadığı *P. aeruginosa* izolatlarının kayma ve yüzme hareketlerini kaybettikleri ya da kontrol grubu izolatla kıyasladığımızda hareket yeteneğinde azalmanın olduğu görülmüştür.

P. aeruginosa'da tanımlanan *las* ve *rhl* sisteminin bağlantılı bir şekilde çalışarak 3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL sinyal moleküllerinin sentezlenmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Literatürde *P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemine ait intak ve internal *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin varlığının araştırılmasında PZR, gerçek zamanlı PZR, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve Southern Blot yöntemleri sıklıkla kullanılmıştır (Schaber vd., 2004).

las sisteminin 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün üretiminden, *rhl* sisteminin ise C₄-HSL sinyal molekülünün üretiminden sorumlu olduğu bilinmektedir. *las* sistemi tarafından elastaz ve proteaz gibi virülans faktörler sentezlenirken, *rhl* sistemi tarafından ise piyosiyenin sentezlenmektedir. Ayrıca QS mekanizmasında bulunan *las* ve *rhl* sistemi yardımcı sistemlerle koordineli bir şekilde çalışarak 200'den fazla genin sentezinde rol oynamaktadır (Schaber vd., 2004; Smith ve Iglewski, 2003).

Bu tez kapsamında ise intakt ve internal fragmentler PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, QS sistemine ait dört genin intak ve internal fragmentlerini içeren *P. aeruginosa* 15692 izolatı kullanılmıştır. İki izolatta *las* ve *rhl* sisteminde bulunan genlerin hiçbirine rastlanmamış ve bu izolatlarda yapılan bütün virülans testlerin negatif olduğu görülmüştür. Bu izolatlardan bir tanesi yoğun bakım ünitelerinden, diğeri göğüs hastalıkları ünitesinden elde edilmiştir. Aynı zamanda antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına bakıldığında bu izolatların çoklu ilaç direncine sahip olduğu görülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında las ve rhl sisteminde bulunan genlerin sentezlenmemesi durumunda, izolatların fenotipik olan HSL testinde de negatif sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu çalışmada *A. tumefaciens* kullanılarak cross feeding test yapılmış ve las sisteminin kontrolü altında olan 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal moleküllerinin üretimi fenotipik olarak belirlenmiştir. Çalışmada las sistemindeki gen bölgeleri belirlenemeyen izolatların fenotipik olarak da negatif olduğu görülmüştür. Sadece rhl sisteminde bulunan genlerin negatif olması durumunda bazı izolatlarda HSL üretiminin görüldüğü saptanmıştır. Bu tez çalışmasındaki PZR analizi sonucuna göre 100 izolattan bazılarının (%35) las ve rhl sistemindeki bütün genleri bulundurmasına rağmen HSL üretiminin negatif olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına benzer olarak literatürde farklı çalışmalara rastlanılmıştır. Schaber vd.,'nin (2004) yapmış oldukları çalışmada; QS sistemindeki genlerin eksik olduğu 5 *P. aeruginosa* izolatının 2'sinde intakt *rhlR* genine rastlanırken 3 izolatta belirlenmemiştir. Internal fragmentte ise tam tersi sonuçlar elde edilmiş, yani 3 izolatta bulunurken 2 izolatta tesbit edilememiştir. Bu durumun *P. aeruginosa*'nın önemli bir özelliği olan genomik çeşitliliği nedeniyle oluştuğunu, genom üzerindeki internal fragmanların farklı bölgelerde yerleşebileceğini ve bu sebeple bazı suşlarda intakt gen bulunurken bazılarında internal genlerin bulunabileceğini bildirmişlerdir. Bu konu ile ilgili benzer bir çalışma Cabrol vd., (2003) tarafında yapılmıştır. 66 klinik izolatın kullanıldığı bu çalışmada; izolatların 54 tanesinde *lasR* geni bulunurken, geriye kalan 12'sinde bu gene rastlanmamıştır. Bu 12 izolatın dizi analizi sonucu 9 tanesinde nükleotit değişiminin olduğu, 3 tanesinde de insersiyon sıra değişiminin olduğu ve PZR analizi sonucu primer hibridizasyonu olmadığı için ilgili gen bölgelerinin belirlenemediği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasındaki virülans faktörlerin belirlenmesine yönelik testlerden elde ettiğimiz sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında, QS mekanizmasındaki genlerin büyük öneme sahip olmasıyla birlikte virülans faktörler üzerinde henüz aydınlatılmayan farklı sinyal yollarının etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, bakterilerin değişen çevresel koşullar sonucu operon sisteminde bulunan genleri aktif ya da inaktif hale getirmesi farklı klinik örneklerdeki virülans faktör üretimindeki değişimlere sebep olabilmektedir. Buna ilaveten las ve rhl sisteminde bulunan farklı yardımcı genlerin (*Vfr*, *GacA*, *RsaL*, *RpoS*, *RpoN*) ifadesinde meydana gelen herhangi bir sorun virülans faktörlerin üretimindeki farklılığın kaynağı olabilir. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasına yönelik

çok sayıda çalışma yapılmış ve bu araştırmada QS mekanizmasındaki las ve rhl sistemlerinin yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir.

5.5. Önemli Bir Sinyal Molekülü Olan 3-oxo-C₁₂-HSL'nin hTERT-HPNE Hücreleri Üzerine Etkileri

Hücreler arası sinyal iletimi, *P. aeruginosa* tarafından konakçı savunmasına karşı koymada kullanılan önemli bir mekanizmadır. Bakterinin virülans faktörlerinin konağın hücrelerarası sıkı bağlantılarının yıkımı ile bariyer görevi gören epitel hücrelerin parçalanmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu duruma bağlı olarak artan epitelyal geçirgenlik sonucu nötrofil göçü kolaylaşarak proinflamatuar sitokinler ortamda birikmeye başlar (Franciosi vd., 2005).

P. aeruginosa epitelyal geçirgenlik sonucu bakteriyel translokasyona neden olduğu için intrasellüler bir patojendir (Yücel, 2011). Translokasyon kaynaklı retroperitonel abselerde enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olarak gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan literatür taramalarında; akut pankreas infeksiyolarından ve pankreatik apse hastalarından elde edilen izolatların, bağırsak mikrobiyatasında bulunan aerop ve anaerop enterik bakteriler olduğu görülmüştür. Aerop ve fakültatifler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve Streptococcus türleri, anaeroplara ise *Clostridium* sp. türleridir. Bakteriler dışında *Candida* türleri de inflamasyon bölgesinden izole edilen mikroorganizmalar arasındadır (Smith ve Iglewski, 2003).

Bu çalışma kapsamında ise *P. aeruginosa*'nın QS mekanizmasında rol oynayan 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün, epitel hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla hTERT-HPNE (immortalized human pancreas nestin expressing) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 3-oxo-C₁₂-HSL'nin farklı dozlarına (3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılmış ve sitotoksik etkileri MTT sonuçlarına göre incelenmiştir. 24 saat için IC₅₀ değeri 75 µM olarak belirlenmiştir. IC₅₀ altındaki üç farklı konsantrasyon (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) deneylerde kullanılmıştır. hTERT-HPNE hücrelerinin 48 ve 72 saat için IC₅₀ değeri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak 3-oxo-C₁₂-HSL'nin hTERT-HPNE hücresi üzerine 24 saatlik uygulama sonucunda IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi 3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL'nin farklı grup hücre hatları

üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Tateda vd., 2003; Smith ve Iglewski, 2003; Mayer vd., 2011; Karlsson vd., 2012; Losa vd., 2015). Yapılan bir çalışmada, sentetik 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal moleküllerinin konak immün sistemi uyararak bazı hücre tiplerini apoptozise sürüklediği görülmüştür. Söz konusu çalışmada, 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün farklı konsantrasyonlarının (12-50 µM) nötrofil ve monosit hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteleri test edilmiş, bu molekülün apoptozisi hızlandırdığı bildirilmiştir. Ayrıca HEp-2 (HeLa contaminant, Carcinoma) epitel hücre hattında da etkileri incelendiğinde apoptozisin uyarıldığı ve hücrelerin farklılaşmaya doğru gittiği görülmüştür. Bu nedenle de *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlarda 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün, konak epitel hücrelerinde kritik rol oynayarak sadece virülans faktörlerin sentezlenmesinde rol oynamayıp aynı zamanda konak yanıtının modülasyonunda değişimler oluşturduğu bildirilmiştir (Tateda vd., 2003). Başka bir çalışmada ise, 3-oxo-C₁₂-HSL molekülünün A549 (akciğer epitel) hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan hücre canlılık testinde 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal moleküllerinin 10 µM, 100 µM ve 250 µM farklı konsantrasyonları hücrelere uygulanmış, bunlardan 100 µM konsantrasyonun sitotoksik doz olduğu bildirilmiştir. 3-oxo-C₁₂-HSL'nin normal hücrelerde sitotoksik etkisinin yüksek bulunması, bakteriyal virülans faktörlerin önemini ortaya koyabilen örnek bir çalışmadır.

P. aeruginosa'ya ait olan 3-oxo-C₁₂-HSL molekülünün apoptoz, hücre göçü ve epitel hücrelerin bariyer bütünlüğünü bozarak inflamasyonun başlaması gibi birçok önemli derecede etkisinin olduğu bilinmektedir. Fakat hTERT-HPNE hücreleri üzerine Cox-2 ve IL-8'in ifadesinin değişimini belirlemeye yönelik daha önceden yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalar *P. aeruginosa*'nın bağırsak mikrobiyotasından ayrılarak karaciğer ve böbreğe kadar ulaştığını göstermiştir (Yücel, 2011). Tez çalışmasının bu bölümünde ise hTERT-HPNE hücreleri 3-oxo-C₁₂-HSL'nin üç farklı konsantrasyonuna (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) 24 saat maruz bırakıldıktan sonra inflamasyon belirteci olarak Cox-2 ve IL-8 ifadesi üzerine etkisi gerçek zamanlı PZR, Western Blot ve Dot Blot yöntemiyle araştırılmıştır.

Proinflamatuvar bir belirteç olan *Cox-2* geninin inflamasyon durumlarında mezankimal kök hücresinde (Zhang vd., 2016), MCF-7-Meme kanseri hücresinde (Majumder ve Chari, 2016), CuFi-bronşial epitel hücresinde (Mayer vd., 2011) ve

kolorektal adenokarsinoma hücresinde (Liu vd., 2017) ifadesinde artış olduğu görülmüştür. 3-oxo-C₁₂-HSL ile uyarılan hTERT-HPNE hücrelerin *Cox-2* seviyesinin belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışması sonucunda *Cox-2* gen ifadesinde, hücrelere uygulanan 3-oxo-C₁₂-HSL'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlemlenmiştir. Bu durum bize bakterinin sistemik enfeksiyonlara neden olan durumlarda bakterinin pankreasta kolonizasyon oluşturabileceğini ve önemli sinyal molekülü olan 3-oxo-C₁₂-HSL'nin *Cox-2* gen ifadesini arttırıcı özelliğe sahip olması nedeniyle, epitel hücrelerinde doku hasarını arttırarak inflamasyona neden olabileceğini düşündürmektedir.

Cox-2, inflamasyon, tümör anjiyojenezis, invazyon, metastaz gibi patolojik süreçler, hücre büyümesinin düzenlenmesi, farklılaşma ve apoptozda önemli rol alan uyarılabilir bir protein çeşididir. Bu nedenle inflamasyon görülen hücrelerde *Cox-2* proteinin seviyesinin belirlenmesi önemlidir (Zhang vd., 2016). Yapılan çalışmalar *Cox-2* proteininin posttranslasyonel modifikasyon sonrasında, yaygın olarak 70-74 kDa ağırlığında bir protein olduğunu göstermiştir. Fakat *Cox-2*'nin posttraslasyonel modifikasyona uğramadığı formlarının 55-64 kDa ağırlığında olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2006).

Bu tez çalışmasında 3-oxo-C₁₂-HSL ile uyarılan hTERT-HPNE hücrelerinin *Cox-2* proteinin seviyesinin belirlenmesinde Western Blot yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *Cox-2* seviyesinde, en yüksek etkinin 12,5 µM 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücrelerde olduğu belirlenmiştir. *Cox-2* geninin ifadesi gerçek zamanlı PZR ile analiz edildiğinde en yüksek etkinin 50 µM 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücrelerde olduğu tespit edilmiştir. Bu durumdaki farklılığın posttranskripsiyonel modifikasyon sonucu proteinin tam olarak ifade edilememesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar *P. aeruginosa*'ya ait önemli sinyal molekülü olan 3-oxo-C₁₂-HSL ile uyarılan hücrelerde proinflamatuvar sitokin olan IL-8'in ifadesinde artış olduğunu göstermiştir. IL-8'in ifadesinin belirlenmesine yönelik yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (Françiosis vd., 2005; Roussel vd., 2016). Bu tez çalışmasında 3-oxo-C₁₂-HSL ile uyarılan hTERT-HPNE hücrelerinde IL-8'in ifadesi real time PZR ve Dot Blot yöntemiyle belirlenmiştir. 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün artan konsantrasyonuna (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) bağlı olarak IL-8 gen ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* sıklıkla solunum yolunda kolonizasyon oluşturduğu

için bronşiyal epitel hücreleri kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada *P. aeruginosa*'ya ait virülans faktörlerle uyarılan hücrelerde *IL-8* ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir (Smith ve Iglewski, 2003). Bu çalışmada *IL-8* proteinin varlığı ise Dot Bot yöntemiyle yarı nicel olarak analiz edilmiştir. *IL-8* gen ifadesine bağlı olarak Dot Blot sonucunda da protein seviyesinde artış gözlemlenmiştir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada; hastane kökenli seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin QS yönünden değerlendirilmesi ve epitel hücrelerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya OMÜ KAEK 2014/577 karar no'lu etik kurul belgesi alındıktan sonra başlanmıştır. Sonrasında Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına polikliniklerden ve hastanede yatan hastalara ait klinik örneklerden 100 seftazidim dirençli *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Çalışma sonucunda;

➤ İzolatların servislere göre dağılımı incelendiğinde; birinci sırada yoğun bakım ünitelerinin olduğu ve 38 (%38) *P. aeruginosa* izole edildiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra göğüs hastalıklarından 21 (%21), ürolojiden 12 (%12), iç hastalıklarından (%8), enfeksiyon hastalıklarından 6 (%6), plastik cerrahiden 6 (%6), onkolojiden 3 (%3), yanık ünitesinden 3 (%3), ortopedi ve travmatoloji, kulak burun boğaz ve romatoloji servislerinden ise 1 (%1) olarak *P. aeruginosa* izole edilmiştir.

➤ İzolatlar klinik örnekler açısından değerlendirildiğinde; *P. aeruginosa* izolatları birinci sırada solunum yolu örneklerinden toplam 49 (%49; 29 balgam ve 20 trakeal aspirat), ikinci sırada ise idrar örneklerinden 28 (%28), yara sürüntüsü örneklerinden 18 (%18) ve diğer örneklerden (kan ve deri sürüntüsü) (5%) oranında izole edildiği tespit edilmiştir.

➤ İzolatların %76'sının biyofilm, %57'sinin slime faktör, %51'inin homoserin lakton oluşturduğu, %65'inin piyosiyanın, %66'sın elastaz ve %88'in proteaz ürettiği ve hareketli olduğu bulunmuştur.

➤ İzolatların QS analizinde; las sistemi için *lasI* geni %96 intakt, %95 internal ve *lasR* geni %91 intakt, %95 internal, rhl sistemi için *rhlI* geni %91 intakt, %90 ise internal ve *rhlR* geni %80 intakt, %90'ı internal olarak bulunmuştur.

➤ hTERT-HPNE hücrelerinde, 3-oxo-C₁₂-HSL'nin sitotoksik olduğu (IC₅₀ 75 µM) belirlenmiştir.

➤ 3-oxo-C₁₂-HSL, Cox-2 mRNA seviyesini 2-5 kat, IL-8 mRNA seviyesini 1,5-2 kat arttırmıştır. Gerçek zamanlı PZR sonuçları analiz edildiğinde, kontrol (%0,1 DMSO) grubu hücreler artan dozlarda (12,5 µM, 25 µM ve 50 µM) 3-oxo-C₁₂-HSL uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında Cox-2 ve IL-8 gen anlatımındaki artışın istatistiksel olarak

anlamli olduğu belirlenmiştir $p < 0,05$ (Tablo 4.13 ve Şekil 4.7). *Cox-2* geninin anlatım seviyesinin, hücreslere uygulanan üç farklı dozdaki en yüksek artışın kontrol grubu ($100,00 \pm 0,00$) ile karşılaştırıldığında, 5 katlık artışla ($522,47 \pm 67,17$) 50 μM konsantrasyonunda 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücrelerde olduğu görülmüştür.

➤ *IL-8* geninin anlatımındaki en yüksek artışın ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($100,00 \pm 0,00$), 2 katlık artışla ($236,40 \pm 23,66$) 25 μM konsantrasyonunda 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücrelerden elde edildiği gözlemlenmiştir.

➤ Kontrol (%0,1 DMSO) grubu olan hücre, artan dozlarda (12,5 μM , 25 μM ve 50 μM) 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında *Cox-2* proteininin ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamli olduğu belirlenmiştir $p < 0,05$ (Tablo 4.14 ve Şekil 4.6). *Cox-2* proteininin, hücreslere uygulanan üç farklı dozdaki en yüksek artış kontrol grubu ($100,00 \pm 0,00$) ile karşılaştırıldığında 1,5 katlık artışla ($151,38 \pm 31,44$) 50 μM konsantrasyonunda 3-oxo- C_{12} -HSL uygulanan hücrelerde olduğu görülmüştür.

➤ Dot Blot sonucunda, *IL-8* birincil antikoruyla işaretlenen 3-oxo- C_{12} -HSL'nin farklı konsantrasyonları (12,5 μM , 25 μM ve 50 μM) uygulanan hücrelerden izole edilen protein örneklerinin konsantrasyonları analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyasladığımızda konsantrasyona bağlı olarak *IL-8* protein ifadesinde artış gözlemlenmiştir.

7. ÖNERİLER

Antimikrobiyal direnç profilleri hastaneden hastaneye, hatta bir hastanenin farklı servisleri arasında bile değişiklik göstermektedir. Antimikrobiyallere direnç gelişimi sıklığı hastanenin yapısı, hastaların özellikleri, hastanedeki invaziv girişim sıklığı ve en önemlisi antibiyotik kullanım politikasına göre değişmektedir. Bu nedenle her hastanenin kendi izolatlarının antimikrobiyal direnç profilini düzenli olarak takip etmesi, rutin antimikrobiyal tedavide yer alan antibiyotiklere karşı direnç oranlarını belirlemesi ve kendi tedavi şekillerini bu sonuçlara göre düzenlemesi önerilmektedir.

Literatürde *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnç profilinin, virülans faktörlerinin fenotipik testlerle, QS mekanizmasındaki bulunan genlerin PZR yöntemiyle belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının virülans faktörlerinin QS yönünden değerlendirilip 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün hTERT-HPNE hücreler üzerindeki olası inflamasyon etkilerinin moleküler yöntemlerle (gerçek zamanlı PZR ve Western Blot) belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmayı destekleyici olarak;

- Pankreasta *P. aeruginosa*'nın kolonizasyon oluşturarak inflamasyona neden olabileceğini gösteren ve bunun önüne geçilebilecek hedef ilaçların geliştirilmesi,
- Değişen antibiyotik konsantrasyonunun biyofilm oluşumuna etkisi,
- Antibiyotik dirençliliğinin biyofilm içerisinde yatay gen transferiyle aktarımı,
- Virülans faktörlerin oluşumu sırasında QS mekanizmasında etkili olan sinyal yolları,
- *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında doku özgünlüğü önemli olduğu için konak konakçı ilişkilerinin farklı hücre hatları üzerindeki etkileri,
- İnflamasyondan sorumlu diğer protein belirteçlerinin analizinin yapılmasının katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abe, K. and Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res.*, 38, 325-329.
- Ak, S., Yıldız, F., Gündüz, A., Köroğlu, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının vitek 2 otomatize sistemi ile değerlendirilmesi. *Gazi Med. J.*, 27, 62-64.
- Akan, E. ve Kınık, Ö. (2014). Biofilm oluşum mekanizması ve gıda güvenliğine etkisi. *J. food and feed sci.*, 14, 42-51.
- Akçay, S.T., Topkaya, A., Oğuzoğlu, N., Küçükercan, M., Ertem, S.A., Göktaş, P. (2003). Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında imipenem ve meropenem duyarlılığı. *Turk. J. Infec.*, 17, 465-470.
- Aktaş, Z., Poirel, L., Şalcıoğlu, M., Özcan, P., Midilli, K., Bal, Ç., Nordmann, P. (2005). Original Article: PER-1 and OXA-10-like β -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clinic. Microbiol. Infec.*, 11, 193-198.
- Alcorn, J.F. and Wright, J.R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J. Biol. Chem.*, 279, 30871-30879.
- Almine, J.F., Bax, D.V., Mithieux, S.M., Nivison-Smith, L., Rnjak, J., Waterhouse, A., Wise, S.G., Weiss, A.S. (2010). Elastin-based materials. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 3371-3379.
- Ameen, S.S., Bairy, K.L. and Bairy, I.A. (2016). Prospective study to analyse antibiotic susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory infections in a tertiary care hospital. *Indian J. Pharmacol.*, 45, 37-44.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol.*, 156, 2271-2282.
- Archer, J. (2015). Type IV pili influence swarming of *Pseudomonas aeruginosa*: an overview. Sponsored Content by Bruker BioSpin - NMR, EPR and ImagingMay.
- Ardıç, N.T., Özyurt, M.T., İlga, U.T., Erdemoğlu, A.T., Haznedaroğlu, T.T. (2004). Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*, 18, 145-150.
- Artenstein, A.W. and Cross, A.S. (1993). *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*. Edited by Campa, M., Bendinelli, M. and Friedman H. ISBN 978-1-4613-6324-8, New York: Springer Science Business Media.

- Balasubmanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1-20.
- Bassler, B.L. and Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell.*, 125, 237-246.
- Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Semmler, A.B.T., Mattick, J.S. (2002). Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 184, 3605-3613.
- Berktaş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Yaman, G., Hüseyin G., (2011). Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotiklere direnç. *Fırat Tıp Derg.*, 18, 192-196.
- Bielen, K., Jongers, B.S., Boddaert, J., Raju, T.K., Lammens, C., Kumar, S.M., Jorens, P.G., Goossens, H., Singh, S.K. (2017). Biofilm-induced type 2 innate immunity in a cystic fibrosis model of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 21, 274-284.
- Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*. İzmir; Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol.*, 13, 42-52.
- Blondel, E., Henry, D.A. and Speert, D.P. (2007). *Pseudomonas*. P.R. Murray, E.J. Baron and H.J. Jorgensen (Eds.), *Manual of Clin. Microbiol.*, Washington DC: ASM Press.
- Boeckel, T.P.V., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.*, 14, 742-751.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K. (2005). Rhamnolipids mediated etachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.*, 57, 1210–1223.
- Bonten, M. and Weinstein, R. (2002). Transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units don't go near the water. *Crit. Care. Med.*, 30, 10-12.
- Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G.B., Andremont, A., Ruimy, R. (2003). Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 185, 222-7230.
- Carlsson, M., Shukla, S., Petersson, C.A., Segelmark, M., Hellmark T. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Pyocyanin negative strains are associated with BPI-ANCA and progressive lung disease. *J. Cyst. Fibros.*, 10, 265-271.
- Celotti, F. and Laufer, S. (2001). Anti-inflammatory drugs: New multitarget compounds to face an old problem-the dual inhibition concept. *Pharmacol. Res.*, 43, 429-435.

- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11, 1119–1129.
- Champe, C.P., Harvey, R.A. and Ferrier, D.R. (2005). *Biochemistry* (Çev: Engin Ulukaya). Ankara: Nobel Tıp.
- Chatterjee, M., Anju, C., Biswas, L., Kumar, A.V., Mohan, G.C., Biswas, R. (2016). Mini Review: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *J. Med. Microbiol.*, 30, 648-658.
- Christensen, G.D., Simson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plantes: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 996-1006.
- Chugani, S. and Greenberg, E.P (2014). An evolving perspective on the *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum sensing regulator QscR. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 4, 152-159.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement.*, USA. Wayne, PA
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.B. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci.*, 284, 5427-5433.
- Cortés, M.E., Bonilla, J.C. and Sinisterra, R.D. (2011). Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Science Microbial. Path.*, 896-906.
- Criq, V.S., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Gaudelus, I.S., Verdugo, I.G., Edelman, A., Sallenave, J.M. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator–IL-6–antimicrobial–repair pathway. *Thor.*, 73, 49-61.
- Çakar, A. (2009). Mikrobiyoloji serisi-1. Klinik bakteriyoloji el kitabı. C. Özkuyumcu (Editör), *Pseudomonas*, Ankara: Güneş tıp kitapevleri.
- Çiftçi, A. and Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *J. Vet. Sci. Pharmacol. Toxicol. Spe. Top.*, 1, 1-11.
- Çoban, A.Y., Çiftçi, A., Onuk, E.E., Erturan, Z., Çaycı, Y.T, Durupinar, B. (2009). Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyol. Bul.*, 43, 563-573.

- Davey, M.E., Caiazza, N.C. and O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 185, 1027-1036.
- Davis, R. and Brown, P.D. (2016). Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *J. Med. Microbiol.*, 65, 261–271.
- Demirci, M., Yorgancıgil, B. and Arda, M. (2001). Değişik klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg.*, 15, 30-33.
- Denning, G.M, Iyer, S.S., Reszka, K.J., O'Malley, Y., Rasmussen, G.T., Britigan, B.E. (2003). Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285, 584–592.
- Deziel, E., Comeau, Y. and Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *P. aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyper piliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.*, 183, 1195–1204.
- Dietrich, L., Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., Newman, D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 61, 1308-1321.
- Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infections Disease. *J. Infect.*, 64, 207-217.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P., Zhang, L. (2005). The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 56, 1287-1301.
- Duman, Y., Kuzucu, Ç., Kaysadu, H., Tekerekoğlu, M.S. (2012). Bir yıllık sürede izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılığının araştırılması: Kesitsel bir Çalışma. *İnönü Üniversitesi sağlık bilimleri dergisi*, 1, 41-55.
- Durmaz, S. and Özer, T.T. (2015). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *Abant Med. J.*, 4, 1-4.
- Dündar, D. ve Sönmez, T.G. (2009). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen pseudomonas aeruginosa suşlarının anti mikrobiyal direnci: üç yıllık değerlendirme. *ANKEM Derg.*, 23, 17-21.
- El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Shahin A.A.M., El-Bialy, H.A., Omara A.M.A., (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Rad. Res. App. Sci.*, 36, 36-48.

- Er, H. (2013). *Seftazidim dirençli P. aeruginosa izolatlarında beta laktamazların moleküler epidemiyolojisi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Afyon Kocatepe üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Er, H., Şen, M. and Altındış, M. (2015) İdrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*'larda antibiyotik direnci. The antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*s isolated from urinary tract infections. *Turk. J. Clin. Lab.*, 3, 80-84.
- Erickson, D.L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D.D., Rabin, H.R., Mitchell, L., Storey, D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *ASM.*, 70, 1783-1790.
- Everett, J., Gabriliska, R., Rumbaugh, K.P., Vikström, E. (2017). Assessing *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer effects on mammalian epithelial cells. *Quorum sensing*, 213-225
- Fiester, S.E., Brock A., Arivett, B.A., Schmidt, R.E., Beckett, A.C., Ticak, T., Carrier, M.V., Ghosh, R., Ohneck, E.J., Metz, M.L., Jeffries, M.K.S. Actis, L.A. (2017). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLOS. One.*, 11, 1-26.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assay: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, 160, 171-177.
- Franciosi S., Choi H.B., Kim S.U., McLarnon J.G. (2005). IL-8 enhancement of amyloid-beta (A beta (1-42))-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia. (n.d). *J. Neuro.*, 159, 66-74.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, CT. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, 42, 872-874.
- Friedrich, M.C. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* infections clinical presentation. Chief Editor: Michael Stuart Bronze.
- Fujimura, T., Anan, N., Sugimori, G., Watanabe, T., Jinushi, Y., Yoshida, I., Yamano, Y. (2009). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan to doripenem and other antipseudomonal agents, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34, 523-528.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.*, 35, 439-468.

- Gahlout, M., Prajapati, H., Chauhan, P., Patel, N., Solanki, D. (2017). Isolation and screening of pyocyanin producing *Pseudomonas* spp. from soil. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 147-152.
- Gellatly, S.L. and Hancock, R.E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.*, 67, 159–173.
- Gera, C. and Srivastava S. (2006). Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. *Curr. Sci.*, 90, 666-676.
- Gomi, H., Takada, T., Miura, F., Wada, K., Hwang, T., Chen, M., Yamamoto, M. (2017). Updated comprehensive epidemiology, microbiology, and outcomes among patients with acute cholangitis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, 24, 310-318.
- Goncalves, I.R., Dantas, R.C.C.D., Ferreira, M.L., Batistão, D.W.F., Filho, P.P.G., Rosineide Marques Ribas, R.M. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazil. J. Microbiol.*, 48, 211-217.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and preventions a journey to break the wall: a review. *Arch. Microbiol.*, 1, 1-9.
- Güler, S.A. (2010). *Meme kanserinde siklooksijenaz-2 ekspresyonu artışının sağkalım üzerine etkisi*. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi. İstanbul: Marmara Üniveristesi
- Gültekin, E.T., Uyanık, M.T., Hancı, H.T., Erdil, Z.T., Gelen, F.T., Çelebi, S.T. (2014). Kan kültürlerinden izole edilen nonfermentatif Gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*, 28, 79-85.
- Güneş, M. (2012). *Türkiye kaynaklı Salmonella izolatlarının antibiyotik direnç özelliklerinin genomik analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gür, D. (2017). Bakterilerde antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç. *J. Inf. Dis.*, 10, 20-5.
- Güzel, Ç.B. and Gerçeker, A.A. (2006). The molecular biology and pathogenesis of cystic fibrosis. *Turk J. Infect.*, 20, 73-78.
- Ha, D.G. and O'Toole, G.A. (2015). c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiol. Spectr.*, 3, 1-20.
- Hair, P.S., Sass, L.A., Vazifedan, T., Shah, T.A., Krishna, N.K., Cunnion, K.M. (2017). Complement effectors, C5a and C3a, in cystic fibrosis lung fluid correlate with disease severity. *PLoS. One.*, 12, 1-13.
- Harmer, C., Alnassafi, K., Hu, H., Elkins, M., Bye, P., Rose, B., Manos, J. (2013). Modulation of gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* during chronic infection in the adult cystic fibrosis lung. *Microbiol.*, 159, 2354-2360.

- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J., Nielsen, T.T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 59, 253-268.
- Harris, A., Jackson, S., Robinson, G., Pineles, L., Leekha, S., Thom, K., Pettigrew, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit: Prevalence, risk factors, and clinical outcomes. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 37, 544-548.
- Hasdemir, U. (2007). Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonu ve aktif pompa sistemlerinin rolü. *Mikrobiyol. Bült.*, 41, 309-327.
- Hashem, H., Hanora, A., Abdalla, S., Shawky, A., Saad A. (2016). Carbapenem susceptibility and multidrug-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt. *Jundishapur J. Microbiol.*, 9, 1-6.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.*, 15, 305-311.
- Haworth, C.S., Foweraker, J.E., Wilkinson, P., Kenyon, R.F., Bilton, D. (2014). Inhaled colistin in patients with bronchiectasis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 975–982.
- Hentzer, M., Teitzeli, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.*, 183, 5395-5401.
- Hentzer, M., Givskov, M. and Parsek, M.R. (2002). Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections. *Ins. Trans.*, 33, 295-306.
- Hershberg, R. (2017). Antibiotic-independent adaptive effects of antibiotic resistance mutations. *Trends Genet.*, 33, 521-528.
- Hombach, M., Jetter, M., Blöchliger, N., Goldmann, N.K., Keller, P.M., Böttger, E.C. (2017). Rapid disc diffusion antibiotic susceptibility testing for *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus* spp. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1-7.
- Huang, J., Shi, Y., Zeng, G., Gu, Y., Chen, G., Shi, L., Hu, Y., Tang, B., Zhou, J. (2016). Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere.*, 157, 137-151.
- Humphries, R.M., Hindler, J.A., Beringer, V.A., Miller, S.A. (2017). Activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22, 1-4.

- Hurley, M.N., Cámara, M., and Smyth, A.R. (2012). Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*, 40, 1014-1023.
- Jamshidi, M., Javadpour, S., Eftekhari, T.E., Moradi, N., Jomehpour, F. (2009). Antimicrobial resistance pattern among intensive care unit patients. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3, 590-594.
- Japoni, A., Alborzi, A., Kalani, M., Nasiri, J., Hayati, M., Farshad, S. (2005). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns*, 32, 343-347.
- Jefferies, J.M.C., Cooper, T., Yam, T., Clarke, S.C. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in the neonatal intensive care unit – a systematic review of risk factors and environmental sources. *J. Med. Microbiol.*, 61, 1052-1061.
- Jones, A.M., Dodd, M.E., Govan, J.R.W., Doherty, J.C., Smith, M.C., Isalska, J.B., Webb, K.A. (2005). Prospective Surveillance for *Pseudomonas aeruginosa* Cross-Infection at a Cystic Fibrosis Center. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 171, 1-4.
- Kang, A.D., Smith, K.P., Eliopoulos, G.M., Berg, A.H., McCoy, C., Kirby, J.E. (2017). In vitro apramycin activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 88, 188-191.
- Karaman, M.T., Yılmaz, O.T., Bayrakal, V.T., Bahar, İ.T. (2010). Gentamisin ve imipenem etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: In-vivo modelleme. *ANKEM Derg.*, 24, 76-79.
- Karatuna, O. (2008). *Solunum sistemi enfeksiyonlarından izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi*. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Karatuna, O. and Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 38, 42-51.
- Karlsson, T., Turkina, M.V., Yakymenko, O., Magnusson, K.E., Vikström, E. (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* N-Acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLOS. Pathog.*, 8, 1-9.
- Kıska, D.L. and Gilligan, P.H. (2003). *Pseudomonas*. Eight Ed., In: P.R., Murray, E.J., Baron, J.H., Jorgensen, M.A., Tenover, R.H. Tenover, *Manual of Clinic. Microbiol.* ASM press.
- Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. İmmün.*, 68, 4839-4849.

- King, J.D., Kocincova, D., Erin, L., Westman, E.L., Lam, J.S. (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Innate. İmmün.*, 15, 261–312.
- Kireççi, E.T. ve Sevinç, İ.T. (2008). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*, 22, 209-214.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., Parsek, M.R. (2005). Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4809-4821.
- Kohler, T., Sakouhi, H.O., Cosson, P., Delden, C. (2014). QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS.*, 9, 1-11.
- Kos, V.N., McLaughlin, R. and Gardner, H.A. (2016). Elucidation of mechanisms of ceftazidime resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by using genomic data. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60, 3856-3860.
- Kragh, N.K., Alhede, M., Rybtke, M., Stavnsberg, C., Jensen, P., Nielsa, T.T., Whiteley, M., Bjarnsholt, T. (2017). Inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 21, 1-38.
- Kuti, J.L., Pettit, R.S., Neu, N., Cies, J.J., Lapin, C., Muhlebach, M.S., Nicolau, D.P. (2015). Antimicrobial Susceptibility Studies: Microbiological activity of ceftolozane/tazobactam, ceftazidime, meropenem, and piperacillin/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 83, 53-55.
- Labarca, J.A., Salles, M.C., Seas, C., Blanco, M.G. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit. Rev. Microbiol.*, 42, 276-292.
- Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., Yin, X. (2015). Ramnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas SWP-4*. *Biochem. Eng. J.*, 101, 44-54.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., Kong, F. (2004). The Role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends. Mol. Med.*, 10, 599-606.
- Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerob.*, 17, 280-285.
- Li, J., Matteo, M.E. Metruccio, M.M.E., Evans, D.J., Fleiszig, S.M.J. (2017). Mucosal fluid glycoprotein DMBT1 suppresses twitching motility and virulence of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS. Path.*, 1-26.
- Limoli, D.H., Whitfield, G.B., Kitao, T., Ivey, M.L., Davis, M.R., Grahl, N., Hogan, D.A., Rahme, L.G., Howell, P.L., O’Toole, G.A., Goldberg, J.B. (2017). *Pseudomonas*

- aeruginosa* alginate overproduction promotes coexistence with *Staphylococcus aureus* in a model of cystic fibrosis respiratory infection. *ASM.*, 8, 1-18.
- Lindley, I.J.D., Westwick, J. and Kunkel, S.L. (1993). Nomenclature announcement- the chemokines. *İmmünol.*, 1993, 14-24.
- Lister, P.D., Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, *Clin. Microbiol.*, 22, 582-610.
- Liu, Y., Kardosh, A., Cooc, J., Schönthal, A.H. (2006). Potential misidentification of cyclooxygenase-2 by Western Blot analysis and prevention through the inclusion of appropriate controls. *Mol. Biotech.*, 34, 329-335.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Meth.*, 25, 402-408.
- Livermore, D.M. (2001). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 557-584.
- Long, X., Ye, Y., Zhang, L., Liu, P., Yu, W., Wei, F., Yu, J. (2015). IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (review). *Int. J. Oncol.*, 48, 5-12.
- Losa, D., Kohler, T., Bacchetta, M., Saab, J.B., Frieden, M., Delden, C.V., Chanson, M. (2015). Airway epithelial cell integrity protects from cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signals. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2, 265-275.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Path.*, 27, 1-11.
- Maçın, S., (2014). *Pigmentli ve pigmentless Pseudomonas aeruginosa suşlarının virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması*. Yayımlanmamış Uzmanlık Tezi. Ankara: T.C. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Maçın, S., Akarca, M., Sener, B., Akyon, Y. (2017). Comparison of virulence factors and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with and without cystic fibrosis. *Rev. Romana. Med. Lab.*, 25, 327-334.
- Madigan, T.M. and Martinko, J.M. (2009). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, (Çev: C. çökmüş. Ankara: PALME Dizgi-Grafik Tasarım Birimi.
- Majumder, S. and Chari, S.T. (2016). Chronic pancreatitis. *Lancet.*, 387, 1957-1966.
- Mantero, M., Gramegna, A., Pizzamiglio, G., D'Adda, A., Tarsia, P., Blasi, F. (2017). Once daily aerosolised tobramycin in adult patients with cystic fibrosis in the management of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection. *Multidisciplinary Resp. Med.*, 12, 1-4.

- Markou, P. and Apidianakis, Y. (2014). Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cancer. *Cell. Infect. Microbiol.*, 3, 1-5.
- Mayer, M.L., Sheridan, J.A., Blohmke, C.J., Turvey, S.E., Hancock, R.E.W. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer 3O-C₁₂ homoserine lactone provokes hypere inflammatory responses from cystic fibrosis airway epithelial cells. *PLOS. one.*, 6, 1-9.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J. Infect. Public. Health.*, 2, 101-111.
- Morita, Y., Tornida, J. and Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol.*, 4, 422-425.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. (2002). *Pseudomonas* and related organisms. *Med. Microbiol.*, 297-304.
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C.D., Goldberg, J.B., Bassler, B.L. (2017). The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLOS. Path.*, 13, 1-25.
- Nakamura, A., Miyake, K., Misawa, S., Kuno, Y., Horii, T., Kondo, S., Ohsaka, A. (2013). Short report: Meropenem as predictive risk factor for isolation of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.*, 83, 153-155.
- Nealson, K.H., Platt, T. and Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.*, 104, 313-322.
- Neang S. L., Bulitta, J.B., Rao, G.G., Landersdorfer, C.B., Holden, P.N., Forrest, A., Bergen, P.J., Nation, R.L., Li, J., Tsuji, B.T. (2015). Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 70, 1434-1442.
- Nouraldin, A.A.M., Baddour, M.M., Harfoush, R.A.H., Essa, S.A.M. (2016). Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria J. Med.*, 52, 99-105.
- Ochman, H., Lawrence, J. and Groisman, E. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.*, 405, 299-304.

- Ohman, D.E., Cryz, S.J. and Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produce saltered elastase. *J. Bacteriol.*, 142, 836-842.
- Oliver, A., Mulet, X., Causapé, C.L., Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat.*, 22, 41–59.
- Oluwaseuna, A.C., Kolab, O.J., Mishrac, P., Singhc, J.R., Singhd, A.K., Cameotrad, S.S. Micheale, B.O. (2017). Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. *Sus. Chem. Pharm.*, 6, 26-36.
- Özer, B., Babayiğit, C., Çolak, S., Önlen, C., Çimen, F., Boyacıgil, İ., Akküçük, Ş. (2016). Pnömoni etkenleri ve antimikrobiyal direnç durumları. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Derg.*, 7, 12-27
- Parlakay, A.Ö., Kara, A., Çelik, İ., Cengiz, A.B., Karagöz, T., Devrim, İ., Ceyhan, M. (2010). Winning the Battle Against *Pseudomonas aeruginosa* Endocarditis: A Case Report. *Çocuk Enf. Derg.*, 4, 114-116.
- Parsek, M.R. and Greenberg E.P. (2002). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 8789-8793.
- Patel, K., Kram, J.J.F. and Baumgardner, D.J. (2016). Path to resistance: risk factors associated with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Patient. Cent. Res. Rev.*, 3, 236-240.
- Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H., Prince, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. İmmün.*, 68, 4331–4334.
- Perez, A.V., Malan, S.S., Kohner, P., Karau, M., Quaintance, K.G., Patel, R. (2016). In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the planktonic and biofilm states. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 85, 356-359.
- Pesci, E.C., Milbank, J.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 28, 11229-11234.
- Rampioni, G., Pillai, C.R., Longo, F., Bondi, R., Baldelli, V., Messina, M., Imperi, F., Visca, P., Leoni, L. (2017). Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. *Sci. Report.*, 7, 1-14.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., Jaziri, M.E. (2015). The formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed. Res. Int.*, 15, 1-17.

- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., Gram, L. (2001). Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J. Microbiol. Methods.*, 44, 239–251.
- Rizek, C., Fu, L., Santos, L., Leite, G., Ramos, J., Rossi, F., Costa, S. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 13, 4-10.
- Rizzo, M.T. (2010) *Cyclooxygenase-2 in oncogenesis*. United States, Indianapolis, Indiana University, School of Medicine, Methodist Research Institute, Clarian Health and Department of Pharmacology, Signal Transduction Laboratory.
- Roquigny, R., Novinscak, A., Biessy, A., Filion, M. (2017). *Pseudomonadaceae: from biocontrol to plant growth promotion*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017 39 S. Mehnaz (ed.), Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation, microorganisms for sustainability.
- Roussel, L., LaFayette, S., Nguyen, D., Baglolle, C.J., Rousseau, S. (2016). Differential contribution of the Aryl-Hydrocarbon Receptor and Toll-Like Receptor Pathways to IL-8 expression in normal and Cystic Fibrosis Airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 4, 1-8.
- Rust, L., Messing, C.R. and Iglewski, B.H. (1994). Elastase assay. *Methods Enzymol.*, 235, 554-562.
- Sabaeifard, P., Ali, A.P., Gamazo, C., Irache, J.M., Souidi, M.R. (2017). Improved effect of amikacin-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 66, 137-148,
- Safarika, A., Galani, I., Pistiki, A., Bourboulis, G.E.J. (2015). Time-kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2, 317-324.
- Saleeb, M., Sundin, C., Aglar, Ö., Pinto, A. F., Ebrahimi, M., Forsberg, A., Elofsson, M. (2017). Research paper: Structure–activity relationships for inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 143, 568-576.
- Salyer, A.A. and Whitt, D.D. (1994), “Bacterial pathogenesis: A molecular approach,” *American Soc. Microbiol.*, 260-268.

- Samad, A., Ahmed, T., Rahim, A., Khalil, A., Ali, I. (2017). Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of respiratory tract infections in a Tertiary Care Hospital, Peshawar. *Pak. J. Med. Sci.*, 33, 670-674.
- Sambrook, J.J. and Russell, D.D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, United States of America.
- Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 7, 56-66.
- Saraswathi, P. and Beuerman, R.W. (2015). Corneal biofilms: from planktonic to microcolony formation in an experimental keratitis infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *Ocular Surf.*, 4, 331-345.
- Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H., Vande, W.J., Stevens, T. (2004). Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.*, 95, 196-203.
- Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A., Hamood, A.N. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 53, 841–853.
- Schaber, J.A., Hammond, A., Carty, N.L., Williams, S.C., Hamood, J.C.A., Burrowes, B. H., Hamood, A.N. (2007). Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 56, 738-743.
- Schweizer, H.P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Gen. Mol. Res.*, 2, 48-62.
- Sedlmayer, F., Jaeger, T., Jenal, U., Fussenegger, M. (2017). Quorum-quenching human designer cells for closed-loop control of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nano Lett.*, 17, 5043-5050.
- Sezgin, F.M. (2012). *Acinetobacter baumannii* izolatlarında bioyfilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonun da araştırılması. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi: Samsun.
- Sharvari, A.S. and Chitra, G.P (2012). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates of Staphylococci. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 3, 724 – 733,
- Shaw, P.D., Ping, G. and Daly, S.L. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6036–6041.


- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS. Microbiol.*, 35, 652–680.
- Silva, L.V., Galdino, A.C.M., Nunes A.P.F., Santos K.R.N., Moreira B.M., Cacci L.C., Sondré C.L., Ziccardi M., Branquinha M.H., Santos A.L.S. (2014). Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 8, 990–1000.
- Silva, D.P., Schofield, M.C., Parsek, M.R., Tseng, B.S. (2017). An update on the sociomicrobiology of quorum sensing in gram-negative biofilm development. *Path.*, 4, 51-55.
- Siriyong, T., Srimanote, P., Chusri, S., Yingyongnarongkul, B., Suaisom, C., Tipmanee, V., Voravuthikunchai, S.P. (2017). Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17, 405-412.
- Smith, R.S., Kelly, R., Iglewski, B.H. Phipps, R.P. (2002). The *Pseudomonas* Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Production in Human Lung Fibroblasts: Implications for Inflammation. *J. İmmünol.*, 169, 2636-2642.
- Smith, R.S. and Iglewski, B.H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 56-60.
- Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., Diederich, M. (2010). The role of Cyclooxygenase-2 in cell poliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell Biol.*, 1-23.
- Soheil, V., Bazzaz, B.S.F., Abdollahpour, N., Hadizadeh, F. (2015). Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signaling system for identifying multiple inhibitors using molecular docking and structural analysis methodology. *Microb. Path.*, 89, 73-78.
- Stepanovic, S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M.A. (2000). Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.*, 40, 175-9.
- Szamosvári, D., Reichle, V., Jureschi, M., Böttcher, T. (2016). Synthetic quinolone signal analogues inhibiting the virulence factor elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Commun.*, 52, 13440-13443.
- Şentürk, S. (2011). *Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında yeterli çoğunluk algılanması (Quorum Sensing)'nin belirlenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Şimşek, H. (2017). Antimikrobiyal Dirence Global Bakış ve Türkiye Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Verileri Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Birimi 6. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu, 05-08 Nisan 2017, Antalya.
- Taguchi, R., Tanaka, S., Joe, G., Maseda, H., Nomura, N., Ohnishi, J., Miyazaki, H. (2014). Mucin 3 is involved in intestinal epithelial cell apoptosis via N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone-induced suppression of akt phosphorylation. *American Journal of Physiology. Cell Physiol.*, 307, 162-170.
- Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, T., Miyairi, S., Pechere, J. C., Yamaguchi, K. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *J. Neuro.*, 159, 66-74.
- Tınaz, G.B., Ulusoy, S., Arıdoğan, B., Eroğlu, F., Kaya, S. (2005). N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbial. Res.*, 160, 399-403.
- Tran, L. and Heuertz, R. (2016). Determining kinetics of reversible and irreversible biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB J.*, 30, 1-5.
- Trautmann, M., Lepper, P.M. and Mathias, H. (2005). Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am. J. Infect. Control.*, 33, 541-549.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA). Mol. Cell Res.*, 1843, 2563-2582.
- Ulusoy, S. (2007). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında N-açıl homoserin lakton üretiminin araştırılması. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü.
- Uzun, B.T., Güngör, S.T., Yurtsever, S.T., Afşar, İ.T., Demirci, M.T. (2012). Yoğun bakım hastalarının kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. *ANKEM Derg.*, 26, 55-62.
- Varışlı, A.N., Aksoy, A., Baran, I., Aksu, N. (2017). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik direnci. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 74, 229-236.
- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., Yarlagadda, P.K. (2014). *Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review*. London, England: SAGE Publications.

- Viducic, D., Murakami, K., Amoh, T., Ono, T., Miyake, Y. (2017). Role of the interplay between quorum sensing regulator VqsR and the *Pseudomonas* quinolone signal in mediating carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.*, 168, 450-460.
- Wang, M., Schaeferb, A.L., Dandekarb, A.A., Greenberg, E.E. (2015). Quorum sensing and policing of *Pseudomonas aeruginosa* social cheaters. *Pnas*. 112, 2187-219.
- Waugh, D.J.J. and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 14, 6735-6741.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 365-404.
- Wi, Y.M., Choi, J., Lee, J., Kang, C., Chung, D.R., Peck, K.R., Ko, K.S. (2017). Emergence of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone in South Korea. *Int. J. Antimicrob. Age*, 6, 767-774.
- Wick, M.J., Hamood, A.N. and Iglewski, B.H. (1990). Analysis of the structure function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-A. *Mol. Microbiol.*, 4, 527-535.
- Williams, B.J., Dehnbostel, J. and Blackwell, A. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirolog.*, 15, 1037-1056.
- Winn, J.W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. (2006). *The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. (Çev: E. Ulukaya). 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Woods, D.E., Schaffer, M.S., Rabin, H.R., Campbell, G.D., Sokol, P.A. (1986). Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.*, 24, 260-264.
- Wu, L.R., Zaborina, O., Zaborin, A., Chang, E.B., Musch, M., Holbrook, C., Turner, J.R., Alverdy, J.C. (2005). Surgical injury and metabolic stress enhance the virulence of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *Surg. Infect.*, 6, 185–195.
- Xiong, J., Deraspe, M., Iqbal, N., Krajden, S., Chapman, W., Dewar, K., Roy, P.H. (2017). Complete genome of a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, isolated from a patient with respiratory failure in a canadian community hospital. *Genome Announc.*, 5, 1-10.
- Yamagishi, Y., Hagihara, M., Kato, H., Hirai, J., Nishiyama, N., Koizumi, Y., Sakanashi, D., Suematsu, H., Nakai, H., Mikamo, H. (2017). In vitro and in vivo pharmacodynamics of colistin and aztreonam alone and in combination against multidrug *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemot.*, 62, 105–110.

- Yaman, G., Gdcoğlu, H., ıkman, A., Bektaş, A., Berktaş, M. (2015). Investigation of doripenem sensitivity by E-Test method in nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sakarya Üniversitesi*.
- Yang, J., Toyokufu, M., Sakai, R., Nomur, N. (2017). Influence of the alginate production on cell to cell communication in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ. Microbiol. Rep.*, 3, 239-249.
- York, M.K., Traylor, M.M., Hardy, J., Henry, M. (2010). Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Oxidase test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 1-73.
- Yücel, D. (2011). *Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Ratlarda Glutamin Ve Probiyotik Kullanımının İntestinal Bariyer, Bakteriyel Translokasyon, Hepatosit Apoptozisi, Oksidatif Kapasite Ve Kupffer Hücre Fonksiyonları zerindeki Etkileri*. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Zelenitsky, S., Nash, J., Weber, Z., Iacovides, H., Ariano, R. (2016). Targeted benefits of prolonged-infusion piperacillin-tazobactam in an in vitro infection model of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Chemother.*, 28, 390-394.
- Zhang, Y., Wang, J., Zhongying, L.V., Zhao, D., Luo, M. (2016). Cox-2 promotes mesenchymal stem cells differentiation into cardiocytes by activating JNK and ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480, 101-105.
- Zorrilla, S.G., Calatayud, L., Juan, C., Cabot, G., Tubau, F., Oliver, A., Dominguez, M.A., Ariza, J., Carmen Peņa, C. (2017). Understanding the acute inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infection: differences between susceptible and multidrug-resistant strains in a mouse peritonitis model. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 49, 198–203.

EK_1. Klinik araştırmalar etik kurul onay formu




T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/17 28.04.2014

Sayın : Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin quorum sensing yönünden değerlendirilmesi ve epitel hücrelerindeki etkileri başlıklı OMÜ KAEK 2014/577 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması+ Genetik çalışma+ Hücre/Doku kültürü çalışması nitelikli araştırma projeniz: Amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 27.03.2014 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak Samsun Eğitim Araştırma Hastanesinden çalışma için izin alınıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof.Dr.Abdülkerim BEDİR
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı