

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI

**KARBAPENEM GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN
(MEROPENEM, İMİPENEM, ERTAPENEM)
ETKİSİ ALTINDA QUORUM SENSİNG
OLUMLU VE QUORUM SENSİNG OLUMSUZ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ
KONAK ETKEN ETKİLEŞİMİNİN
ARAŞTIRMASI**

DR. OKAN ALPAK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR- 2011

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI

**KARBAPENEM GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN
(MEROPENEM, İMİPENEM, ERTAPENEM)
ETKİSİ ALTINDA QUORUM SENSİNG
OLUMLU VE QUORUM SENSİNG OLUMSUZ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ
KONAK ETKEN ETKİLEŞİMİNİN
ARAŞTIRMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. OKAN ALPAK

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR
Prof. Dr. Hüseyin BASKIN**

İZMİR- 2011

TEŐEKKÜR

Öncelikle çalıŐmalarım esnasında her türlü desteklerini ve yardımlarını benden esirgemedен sunan, değerli danışman hocalarım Prof. Dr. İ.Hakkı BAHAR' a ve Prof. Dr. Hüseyin BASKIN'a ve de 4 yıllık asistanlık hayatım boyunca bana sonsuz katkıları ve emekleri olan tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma sonsuz saygı ve teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca hayatımın her aşamasında beni yüreklendiren ailemin değerli üyelerine, özellikle de eŐim Esin ALPAK'a sevgilerimi ve Őükranlarımı sunarım.

Dr. Okan ALPAK

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	III
ŞEKİL DİZİNİ	IV
KISALTIMA DİZİNİ.....	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	IX
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Genel Özellikleri	2
1.2. Biyofilm Oluşumu.....	3
1.3. Çoğunluğu Algılama	5
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Biyofilm ilişkisi.....	7
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Çoğunluğu Algılama İlişkisi.....	8
1.6. Karbapenemler:.....	10
1.6.1. İmipenem:.....	10
1.6.2. Meropenem:.....	11
1.6.3. Ertapenem.....	12
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	14
1.1. Besiyerleri.....	14
1.2. Kimyasal Maddeler ve Boyalar.....	14
1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	14
2.4. Invitro yöntemler.....	15
2.4.1. Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'larının Belirlenmesi	15
2.4.2. Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi.....	15
2.4.3. Suşların Çoğunluğu Algılama yanıtlarının Değerlendirilmesi	15
2.5. <i>Ex vivo</i> yöntemler	16
2.5.1. Hücre kültürü – Enfeksiyon modeli	16
2.5.2. Apoptozis – Nekroz	16
2.5.3. NO yanıtları	16
3. BULGULAR	18
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının İmipenem, Meropenem, Ertapenem Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri	18

3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının Çoğunluğu Algılama Yanıtları.....	18
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının Biyofilm Yanıtları	19
3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)grubu antibiyotik uygulanan HEp- 2 hücre dizisindeki NO Yanıtlarının Değerlendirilmesi	19
3. 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) grubu antibiyotik uygulanan HEp- 2 hücre dizisindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	20
4. TARTIŞMA.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
6. KAYNAKLAR	43

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının İmipenem, Meropenem, Ertapenem Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri	24
Tablo 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) Etkisinde Çoğunluğu Algılama Yanıtları (KONTROL; antibiyotik uygulanmamış suş)	25
Tablo 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)Etkisinde Biyofilm Yanıtları (KONTROL; antibiyotik uygulanmamış suş)	26
Tablo 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)grubu antibiyotik uygulanan HEP- 2 hücre dizisindeki NO Yanıtlarının Değerlendirilmesi	27

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi	28
Şekil 2: <i>rhl mutant Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi	28
Şekil 3: <i>las mutant Pseudomonas aeruginosa</i> suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi	29
Şekil 4: HEp- 2 hücresi.....	29
Şekil 5: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi.....	30
Şekil 6: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde ertapenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	30
Şekil 7: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresine ertapenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	31
Şekil 8: Las mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	31
Şekil 9: Rhl mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	32
Şekil 10: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi.....	32
Şekil 11: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	33
Şekil 12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	33
Şekil 13: Las mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	34
Şekil 14: : Las mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	34
Şekil 15: : Rhl mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	35

Şekil 16: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi.....	35
Şekil 17: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde meropenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	36
Şekil 18: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde meropenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	36
Şekil 19: Las mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	37
Şekil 20: Rhl mutant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile enfekte HEp- 2 hücresinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi	37

KISALTMA DİZİNİ

AHL: Açillenmiş Homoserin Lakton

AI: Kendi Kendini Uyarıcı, “Autoinducer”

CRP: “Catabolite Repressor Protein”

ÇA: Çoğunluğu Algılama

di c-GMP: İkincil Mesajcı Olan di Siklik Guanozin Mono Fosfat

EPS: Ekzopolisakkarit

ERTA: Ertapenem

IMP: İmipenem

Las I: 3- oxo- C12 – HSL- L, Uzun Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni

Las R: “Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen

LBA: Luria Bertani Agar Besiyeri

LBB: Luria Bertani Broth Besiyeri

LPS: Lipopolisakkarit

McF: McFarland

MER: Meropenem

MHB: Muller Hinton Broth Besiyeri

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

NO: Nitrik oksit

Rhl I: C4 – HSL, AI Sentaz Geni, Kısa Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni

Rhl R: “Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen

Sub-MİK: Subminimal İnhibitör Konsantrasyon

ÖZET

Karbapenem Grubu Antibiyotiklerin (Meropenem, İmipenem, Ertapenem) Etkisi Altında Quorum Sensing Olumlu ve Quorum Sensing Olumsuz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Konak Etken Etkileşiminin Araştırması

İnsanlarda oportunistik bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* biyotik ve abiyotik yüzeylere yerleşebilmektedir. Dünyada olduğu kadar ülkemizde de nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir kaynağıdır.

Çoğunluğu Algılama (ÇA, Quorum Sensing) olarak adlandırılan mikroorganizmaların kendi aralarında haberleşme sistemleri, virulans etkenlerinin üretiminin düzenlenmesinde etkin olduğu gösterilmiştir. Hücre dışı sinyal molekülleri ile çalışan bu sistemleri; bakteriler lokal yoğunluklarını belirlemek amacı ile kullanırlar. *Pseudomonas aeruginosa*, (*P. aeruginosa*) çoğunluğu algılama sistemlerinin açıklanmasında üzerinde en çok çalışılan gram negatif bakteridir. *P. aeruginosa* ‘ da “rhl”, “las” sistemi ve kinolon “PQS” olmak üzere üç ÇA sistemi tanımlanmıştır.

Konak (*in vitro* sistem) ve değişik antibiyotik konsantrasyonları (subminimal inhibitör konsantrasyonlar =sub-MİK) ile karşılaşmış *Pseudomonas* arasındaki ilişkinin tanımlanması sağaltımın planlanmasında önem kazanmaktadır.

Günümüzde *Pseudomonas* enfeksiyonlarının sağaltımında antibakteriyeller yanı sıra, bakterinin genotipik ve fenotipik tiplendirilmesinin de büyük önemi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada; minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlendikten sonra imipenem, ertapenem ve meropenem antibiyotiklerinin MİK ve sub-MİK konsantrasyonları ile karşılaşmış las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarının ÇA sistemleri, biyofilm oluşumu önce *in vitro* olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu suşlar ile HEp- 2 hücreleri *in vitro* koşullarda enfekte edilip, ÇA sistemlerinin yanı sıra nitrit, apoptoz- nekroz yanıtları değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak *Pseudomonas aeruginosa* sağaltımında ÇA’ nın yeni, olası “sağaltım hedefleri”ndeki rolünün anlaşılması ile; las ve rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* suşları ile konak arasındaki ilişkinin, ÇA sistemlerinin patojenite üzerine olası etkilerinin bilinmesi sağaltımın etkinliğini arttırabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, “Çoğunluğu Algılama”, subminimal konsantrasyonları,

SUMMARY

Investigation of Host Agent Relation in Quorum Sensing Positive and Quorum Sensing Negative *Pseudomonas aeruginosa* Strains Under the Effect of Carbapenem Group Antibiotics (Meropenem, Imipenem, Ertapenem).

Pseudomonas aeruginosa is a human opportunistic pathogen, that colonizes biotic and abiotic surfaces. It's an important source of nosocomial infections in Turkey and the rest of the world.

It has been shown that the interbacterial signaling system called "quorum sensing" is efficient in the regulation of virulence factor production. Bacteria use this system which works with extracellular signal molecules, to determine their local concentration. *Pseudomonas aeruginosa* is the most commonly used gram negative bacteria in the studies designed to explain quorum sensing systems. In *pseudomonas aeruginosa*, three quorum sensing systems known as "rhl", "las" and quinolone "PQS" have been identified.

The determination of relationship between the host and *Pseudomonas aeruginosa* exposed to subminimal inhibitor concentrations of antibiotics, has gained importance in planning the treatment of infections caused by this organism.

In today's conditions, the determination of the genotype and phenotype of *pseudomonas* species is as important as antibiotherapy in the treatment of infections caused by this type of bacteria.

In this study the quorum sensing systems and biofilm production of las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* and standard *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains were determined in vitro, in the presence of MIC and sub-MIC concentrations of imipenem, ertapenem, meropenem. Afterwards, HEp-2 cell cultures were infected with these strains in vitro, and nitrite and apoptosis-necrosis reactions were evaluated.

As a result, we think that understanding the relationship between las and rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* strains and the host, the effect of quorum sensing systems on

pathogenicity, and the role of quorum sensing in new/potential treatment methodologies will aid in the efficiency of treatment in *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, “Quorum Sensing”, subminimal inhibitory concentrations

GİRİŞ ve AMAC

Bakterilerin de, ökaryotik özellik olarak bilinen, “birbiri ile iletişim halinde yaşama” özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği kullanan patojenik bakteriler; virülans faktörlerini çok daha etkili kullanabilmektedir.

Topluluk düzeyindeki virülans özellikler olarak bilinen biyofilm oluşumu ve hücreden hücreye iletişim sistemini (quorum sensing: çoğunluğu algılama, ÇA) açıklamada *Pseudomonas aeruginosa* model organizmadır. ÇA sistemlerinin varlığı, bu bakterinin virülans davranışlarının yalnızca bir bölümünü açıklar görünmektedir. *P. aeruginosa* ile konak (*in vitro* sistem) ve antibakteriyeller arasındaki etkileşimi ele alan çalışmalar, bu mikroorganizmanın insan vücudundaki davranışlarını açıklamak ve sağaltım modelleri üzerindeki çalışmalara yön vermek noktasında değerli bilgiler sunacaktır.

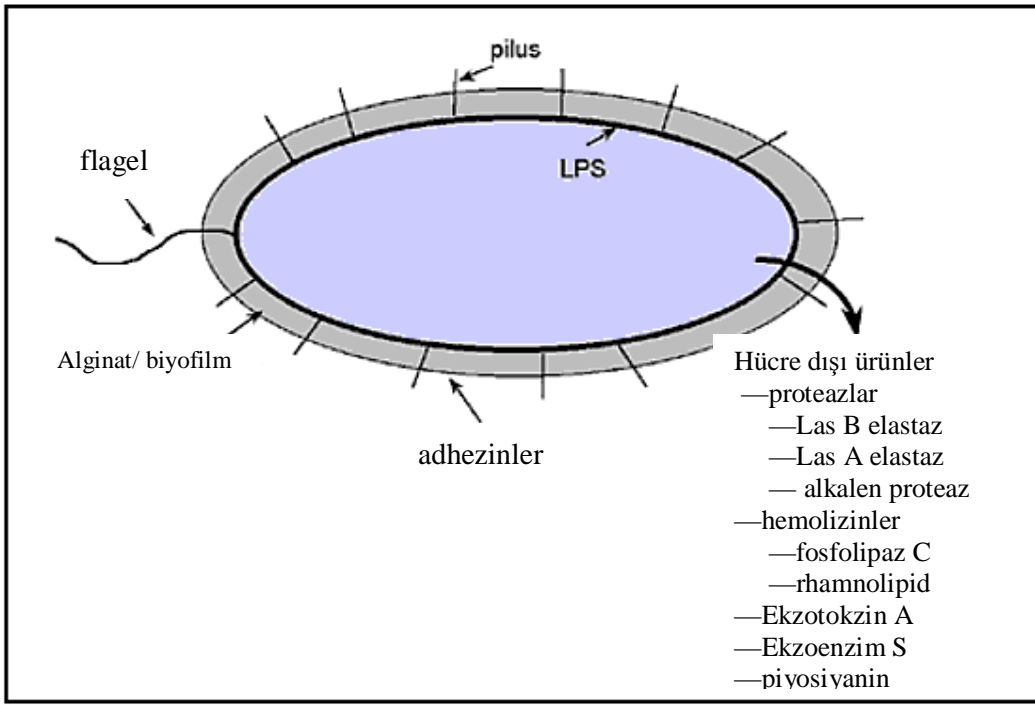
1. GENEL BİLGİLER

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*' nın Genel Özellikleri

Toprakta ve suda sıklıkla bulunan, zor koşullar altında canlı kalabilen ve fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*; kistik fibrosis, yanık enfeksiyonu ve HIV hastaları gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olabilir (1).

Bakterinin hastalık yapma kapasitesini gösteren virülans faktörleri, bakteriyi konak immun savunmasından koruyan, dokuda kolonizasyona ve / veya invazyona neden olan hücre dışı enzimler ve / veya hücre yüzeyine bağlı etmenler olarak tanımlanabilmektedir. Antibakteriyellerin hedefi olan virülans etmenlerinin enfeksiyon boyunca bakterinin yaşaması ve üremesi için gerekli olması, sadece prokaryotlara özgü bir özelliktir (2). Enfeksiyonun erken sevreleri boyunca bakteri, ökaryotik hücre yüzeylerine ve hücre dışı matrikse tutunmak için yüzey adhezinlerini oluşturur. Enfeksiyon kronikleşmeye başladığı zaman, hücre dışı toksinlerin ve konaktan korunmak için gerekli olan etmenlerin yapımı artmaktadır (3). Kolonizasyon sonrasında üretilen tüm bu virülans etmenlerinin, bakteriyel enfeksiyonların yayılmasına, kolonizasyondan sonra doku hasarına, kan dolaşımına invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu hücre dışı enzim ve toksinlerin üretimi *P. aeruginosa*' nın enfeksiyon evresine ve yerleştiği yere göre değişmektedir (4, 5).

P. aeruginosa; türe özgü hücre dışı virülans etmenleri olan elastaz, alkalin proteaz, ekzoenzim S ve ekzotokzin A gibi birçok proteaz ve toksin üretir (Şekil 1).



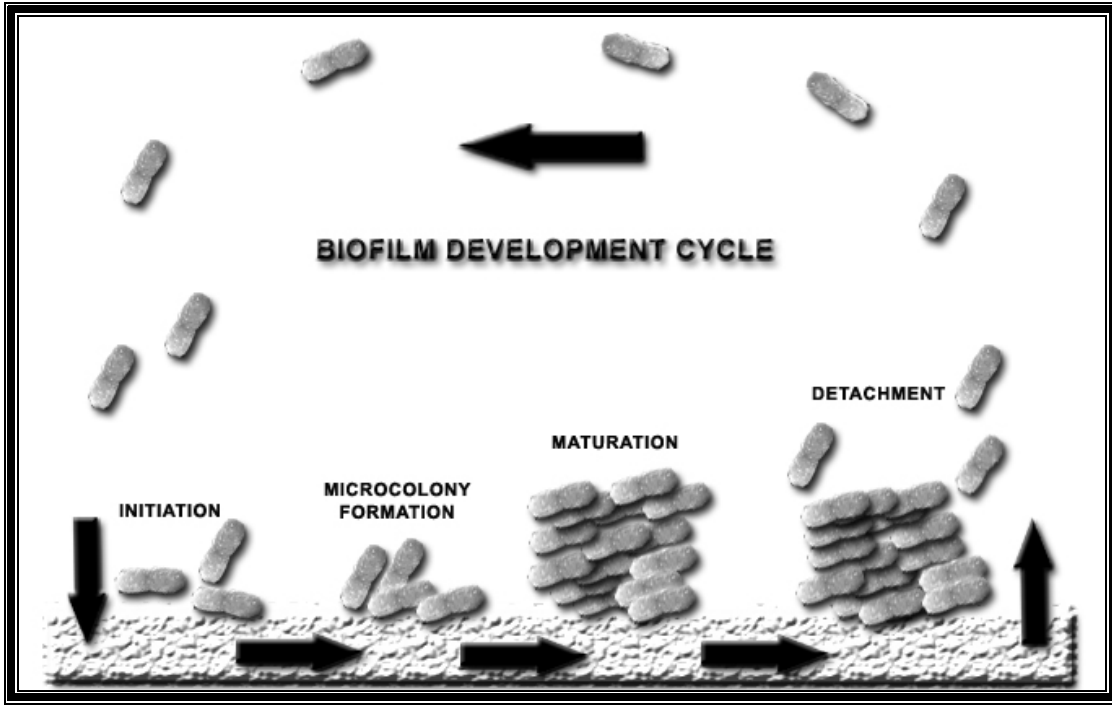
Şekil 1. *P. aeruginosa*'nın virulans etmenleri. *P. aeruginosa*'da hem hücre ile ilişkili flagel, pilus, adhezinler, alginat/biyofilm, lipopolisakkarit (LPS) hem de proteaz, hemolizin, ekzotokzin A, ekzoenzim S, piyosiyenin gibi hücre dışı virulans etmenleri bulunur (5 numaralı kaynaktan alınmıştır).

1.2. Biyofilm Oluşumu

Hemen hemen tüm bakteri türlerinin; bakteri grubunu kapsayan matriks içinde büyüme şekli olan biyofilm (canlı – cıvık tabaka) otuz yıl önce ilk defa tanımlandı (6, 7). Osteomyelit, prostatit, tonsillit, adenoid gibi kronik inflamatuvar oluşumların bakteriyel biyofilm enfeksiyonları ile ilgi olduğu anlaşıldı. Moleküler tanı tekniklerinin ve modern moleküler biliminin gelişimi ile biyofilmlerin fizyolojik ve morfolojik özellikleri aydınlatılmaya başlandı (8) .

Biyofilm oluşumu içinde bakteriler yaşam döngülerini yavaşlatıp en aza indirirler. Planktonik formdan biyofilm formuna geçişteki evreler: 1. Geri dönüşümlü tutunma, 2. Geri dönüşümsüz tutunma, 3. Büyüme, 4. Kaynaşma, 5. Biyofilme özgü mimarinin oluşması, 6. Olgunlaşma ve 7. Tekrar aynı oluşum süreci başlatmak üzere planktonik forma geri dönüşen bakterilerin ayrılması, olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2) (7, 9).

Mikroorganizmanın tipi, yüzey bileşenlerinin yapısı ve / veya çevresel etmenlerin çeşitliliği biyofilm yapısındaki farklılığa neden olmaktadır. Biyofilmler; mikroorganizma, glikokaliks (bakteriyel ekzopolisakkarit) ve yüzey olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerden birinin olmadığı durumda biyofilm yapısının oluşmadığı gösterilmiştir (10).



Şekil 2. Biyofilm oluşumunun gelişimi (11 numaralı kaynaktan alınmıştır).

Biyofilm oluşumlarında; oksijen ve besin sınırlılığı nedeniyle tutunma yüzeyine yakın bakterilerin metabolik aktivitesinin, yüzeye yakın bakterilerden daha yavaş olması, biyofilm tabakaları arasında metabolik farklılıklara neden olmaktadır. Sonuç olarak biyofilm yapısında tutunma yüzeyine yakın bakteriler, çoğunlukla anaerobik solunum yapmaktadır. Biyofilmlerdeki bu metabolik farklılık, olumsuz yöndeki çevresel değişimlerde, planktonik popülasyonlara göre biyofilmin daha avantajlı olmasını sağlamaktadır (12).

Biyofilm katmanlarındaki bakterilerin yerleşimine göre değişen fizyolojik ortam farklılığı, aynı zamanda antibiyotik sağaltımında karşılaşılan problemlerin nedeni olabilmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturduğu zaman, antibakteriyel ajanların etkisine 10–100 kat daha dirençli hale gelmeleriyle, sağaltım güçlükleri ortaya çıkmaktadır (13) .

Tek veya birçok bakteri türü birlikte; kateter, kontak lens gibi birçok gereç yüzeylerinde biyofilmler oluşturabilmektedir (12- 14).

Biyofilm oluşmasıyla birlikte ortaya çıkan direncin gelişmesinde tanımlanan mekanizmalar:

1. Fiziksel ve kimyasal olarak antibakteriyel ajanların bakteriye etkisinin engellenmesi,
 2. Besin azlığı nedeniyle biyofilm yapısındaki bakterilerin; üreme hızlarını yavaşlatmaları,
 3. Genel stres yanıtlarının etkinleşmesi,
 4. Biyofilm oluşumu ile birlikte bakteride meydana gelen fenotip değişikliği
- olarak açıklanmaktadır (7, 15, 16, 17).

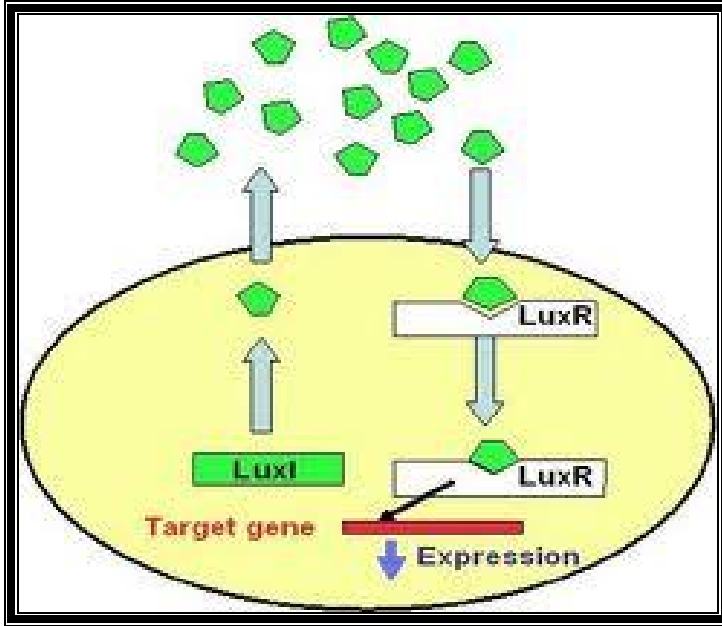
Biyofilmin temel bileşeni olan glikokaliks matriksinin üretimi, antibakteriyel ajanların biyofilm yapısında bulunan bakterilere ulaşmasını engellemektedir (18). Mimarilerindeki farklılığa göre, kalın ve ince olarak tanımlanan biyofilm türlerinde antibiyotiklere direncin farklı olduğu gösterilmiştir. Kalın biyofilm yapısında bulunan bakterilerin, hidrojen peroksidin etkisinden korundukları da belirlenmiştir (19).

1.3. Yoğunluğu Algılama

Bakteriler iletişim sinyalleri ile buldukları yerdeki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler. Bu davranış, yoğunluğu algılama (“quorum sensing”) (ÇA) olarak adlandırılmaktadır. Bakteri yoğunluğuna bağlı olarak salınan sinyal molekülleri ile çalışan ÇA sistemleri, bakteri plazmid konjugasyonu, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu ve çeşitli virulans etmenlerinin üretimi gibi birçok fizyolojik etkinliği düzenlemektedir (20- 21).

Yoğunluğu Algılama kavramı ilk kez, deniz hayvanlarının ışık organlarına yerleşerek simbiyoz yaşayan bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*)’de tanımlanmıştır. *V. fischeri* deniz hayvanının ışık organında yüksek yoğunluklara kadar üreyebilir. Belli bir eşik değer üzerindeki yoğunluğa kadar ürediklerinde, lux CDABEGH genleri ile şifrelenen lusiferaz enzimini üretirler ve bunun sonucunda bir ışımaya gerçekleşir. Bu enzimin etkinliği düşük yoğunluklarda baskılanır (22). Gram olumsuz bakterilerde de ÇA, *V. fischeri*’de ilk defa açıklanan LuxIR dizgesi aracılığıyla olabilmektedir. LuxIR dizgesi, LuxI proteinini kullanarak “kendi kendini uyarıcı” (AI) ve buna bağlanarak gen sunumunu düzenleyen LuxR’

yi birleştirir (Şekil 3) (23). Bakteri tarafından üretilen AI' lar, türe özgül olmakla birlikte nadiren diğer türlerin LuxR tipi düzenleyicileri ile birbirlerini etkiler (24, 25).



Şekil 3: Hücre- hücre iletişim sinyal sistemi. ÇA sistemi “autoinducer” (AI) sentaz genini kodlayan I geni ve transkripsiyonal etkinleştirici protein olan R geni olmak üzere iki gen bileşeninden oluşur. AI molekülünün sentezlenmesi ile R proteini ile bileşik oluşturarak hedef geni etkinleştirir ve hücre zarından çıkarak hücre dışı haberleşmede sinyal molekülü olarak kullanılır (26).

Gram olumlu bakteriler; sinyal molekülleri olarak peptidleri kullanırlar. Bu AI peptidler sitoplazmada öncül peptidler olarak üretilir, yıkılır, değiştirilir ve taşınır. Bu hücre dışı AI polipeptidler; iki bileşenli bir dizge ile çalışır. Dış zara bağlı algılayıcı bir kinaz proteinin dış bölümü AI' ları saptar, sonra fosforlanır ve DNA' ya bağlanıp onun kopyalanmasını düzenleyecek bir yanıt düzenleyicisini etkinleştirir (27, 28).

AI-2 hem Gram olumlu hem de Gram olumsuz bakterilerde kullanılan ÇA sinyal molekülleridir. AI- 2, çevre koşullarında LuxP / LuxQ adı verilen iki bileşenli dizge ile tanımlanır ve bunun sonucunda oluşan fosforlanma zinciri gen kopyalanmasının düzenlenmesi ile sonuçlanmaktadır (29, 30).

Gram olumsuz bakteriler, AI olarak adlandırılan “açillenmiş homoserin lakton” u (AHL) hücreler arası sinyal molekülü olarak kullanmaktadırlar. Fizyolojik koşullarda büyümenin özgül evreleri boyunca üretilen, bakteriden difüzyon ve/ veya transport yolu ile salınan AI molekülleri; eşik değerdeki yoğunluğa ulaşana kadar bakteri dışında birikir, çevredeki bakteriye girer, transkripsiyonal aktivatörleri etkiler ve genlerin transkripsiyonunu tetikler (30). Tüm bakterilerin AI molekülleri benzer kimyasal yapıda olmasına ve kendi yağ asitlerinin modifikasyonunun farklılığı nedeniyle türe özgü olmasına karşın değişik türdeki birçok bakterinin ortak AI moleküllerini kullandığı gösterilmiştir. (23, 31).

1.4. *Pseudomonas aeruginosa* – Biyofilm ilişkisi

Bakteri mikroçevrede birikmeye başlayınca besin azlığı nedeniyle üreme yavaşlamaktadır. Olgun biyofilmlerde meydana gelen üremenin yavaşlaması, antibiyotiklere dirence neden olabilmektedir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinden izole edilen *P. aeruginosa* virülans etmenlerinin çevre koşullarına göre düzenlendiği gösterilmiştir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin solunum yüzeylerinin düşük oksijen içermesi nedeniyle bu mikroçevrede oluşan *P. aeruginosa* biyofilmleri; aerobik koşullarda oluşan biyofilm yapıları için gerekli olan farklı genlerin aktivasyonu ile oluşmaktadır (32).

Üriner ve akciğer *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oluşan biyofilm yapı mimarisinin antibiyotik direncinin gelişmesinde oldukça önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Kalın mukozal yapı; kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin önemli bir mikroçevre özelliğidir. Landry ve arkadaşları *in vitro* yaptıkları bir çalışmada musin üzerinde büyük hücresel birikimler ile oluşan *P. aeruginosa* biyofilmlerinin mimarisinin farklı olduğunu ve musin ile ilişkili biyofilmlerin tobramisine daha dirençli olduğunu göstermişlerdir (33). *P. aeruginosa* yavaş üreme evresinde, planktonik ve biyofilm hücrelerinin siprofloksasine eşit direnç gösterdiği görülmüştür. Ancak üreme hızı arttıkça, planktonik hücreler biyofilm hücrelerinden daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sonuca göre biyofilmin yapısal elemanları ve üremenin yavaşlaması, antibiyotik sağaltımında biyofilmlerin neden olduğu dirençte oldukça önemlidir. Biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelerden 15 kat daha fazla antibiyotik direnci kazandığı dönem, durağan dönemdir. Buna göre üremenin hızlanması direnç seviyeleri için bir göstergedir ve üremenin yavaşlaması da koruyucu bir etki gösterebilmektedir (6).

Fizyolojik değişiklik olduğu zaman çevre streslerinden hücreyi korumak için “Stres yanıtları” meydana gelir. Böylelikle bakteriler sıcak ve soğuk şoklardan, pH değişikliklerinden ve kimyasal ajanların etkilerinden korunmuş olurlar. Bu stres yanıtlarının merkezi düzenleyicisi durağan dönemde sunulan sigma etmenidir (RpoS). Bakteriler yüzeye tutunmaya başladığı zaman genel biyofilm fenotipini oluşturmaya başlar veya planktonik hücrelerdeki biyofilm oluşumu ile ilgili olarak tanımlanan genleri uyarmakta veya oluşumunu baskılamaktadır. Direnç fenotiplerinin meydana gelmesinde sınırlı besin, belirli stres tipleri, artan hücre yoğunluğu veya tüm bu etmenler birden etkili olabilir (6).

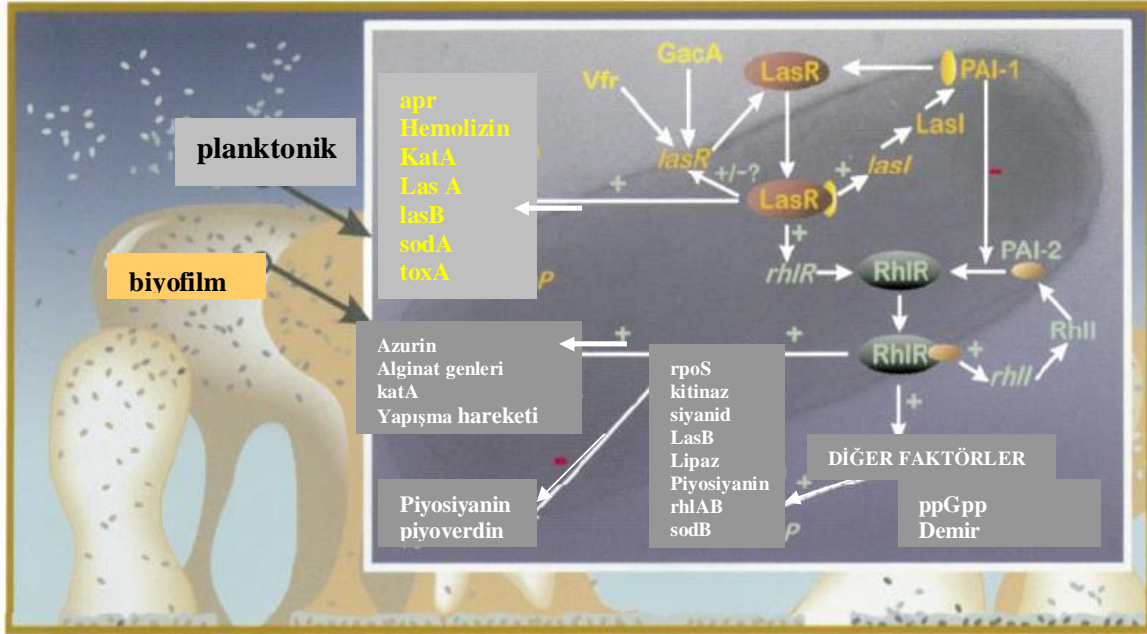
1.5. *Pseudomonas aeruginosa* - Çoğunluğu Algılama İlişkisi

P. aeruginosa'nın hücre dışına salgıladığı birçok virulans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili “las” ve “rhl” olarak tanımlanan iki ÇA sistemi ile kontrol edildiği gösterilmiştir (7). Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (LasA ve Las B), alkalin proteaz, hidrojen siyanid, ekzotokzin A, piyosiyenin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen (rpoS), ve süperoksid dismütaz başta olmak üzere çeşitli virulans etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (32).

Las B elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de “las sistemi” olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3-oxo-C12 – HSL- L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI sentaz geni) ve *Las R* (“transcriptional activator” proteini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotokzin A gibi diğer ekstrasellüler virulans etmenlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder (33-34).

İkincil ÇA sistemi olan “rhl sistem” ise; *rhl I* (C4 – HSL, AI sentaz geni, kısa zincirli AHL) ve *rhl R* (“transcriptional activator” proteini kodlayan gen)‘ den oluşur. Rhl AB operonunun (operon: yönetici DNA bölgesi) yapımını kontrol eden bu sistemin, rhamnolipid üretimi için gerekli olan “rhamnosyltransferase” enziminin sentezlemesini düzenlemesinin yanı sıra, Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyenin, siyanid ve alkalin proteazın üretimini de düzenlediği bilinmektedir (Şekil 4). (32, 34).

P. aeruginosa'da çoğunluğu algılama kontrolünün modeli Şekil 4' de gösterilmiştir (36).



Şekil 4: *P. aeruginosa*' da çoğunluğu algılama kontrolünün modeli (36. numaralı kaynaktan alınmıştır).

P. aeruginosa' da tanımlanan lipaz ve proteaz, enfeksiyon süresince yüzeye tutunmayı sağlayarak, biyofilm oluşumu için gerekli olan Tip IV pili gibi virülans etmenlerinin düzenleyicisi; *Esheria coli*' de tanımlanan "catabolite repressor protein" (CRP) ile homolog olan "Vfr" dir. Virülans etmenlerinin genel düzenleyicisi olarak tanımlanan Vfr, lasR ' nin kopyalamayı başlatan bölgesine özgün bağlanarak, dolaylı yoldan ÇA sistemlerinin kontrolünü yapmaktadır. Değişik sinyaller ile birçok geni harekete geçiren Vfr; LasR' yi harekete geçirerek elastaz ve piyosiyenin üretimini sağlamaktadır (37- 38).

Durağan dönemde yapılan ve stres yanıtlarının merkezi düzenleyicisi olan RpoS; besin azlığı, osmotik basınç, oksidatif stres gibi çeşitli stres etmenlerine karşı birçok genin aktivasyonunu tetiklemektedir (39). Yeterli bakteri yoğunluğunda RpoS; rhlI RNA' sının kopyalanmasını düzenlediği gösterilmiştir (40, 41).

Doğal veya kimyasallardan üretilen baskılayıcı etki gösteren antibiyotikler; diğer canlı mikroorganizmaların üremelerini engeller. Tüm antibiyotiklerin makromoleküler hedefleri diğer birçok hücresel eleman ile işlevsel etkileşim halindedir. Sub-MİK değerlerinde, birçok

antibiyotiğin farklı bakterilerde transkriptin büyük bir grubunun oluşumunun artmasına veya azalmasına neden olmaktadır. Yüksek antibiyotik yoğunluklarında stres cevaplarının üretildiği ve sub-MİK yoğunluklarındaki değişik cevapların uyarıldığı gösterilmiştir (42).

Fiziksel olarak antibiyotik penetrasyonunun baskılanması ile biyofilmler direncin artışına neden olmaktadır (43, 44). Hoffman ve arkadaşları aminoglikozidlerin sub-MİK konsantrasyonlarının; ikincil mesajcı olan di siklik GMP (di c-GMP)' in metabolizmasında gerekli gen bölgesi olan; "aminoglycoside response regulator" (Arr) genini aktive ederek *P. aeruginosa*' da biyofilm oluşumunu arttırdıklarını göstermişlerdir (45). *P. aeruginosa*' da di c-GMP metabolizması biyofilm oluşumu, virülans etmenlerinin oluşumu ve antibiyotik direnci için gerekli proteinlerin sentezlenmesinde önemlidir (46).

1.6. Karbapenemler:

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve "thienamycin adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. Beta-laktamların en geniş spektrumlusudur. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktam ajanlardan ayrılır. Beta laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan biyosentezi üzerine etki göstermektedir. Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar, nadir nonfermentatifler ve *Aeromonas* dışında Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob mikroorganizmalarla oluşan hastane infeksiyonları ve toplumdan kazanılmış infeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir. Genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) ve AmpC enzimini fazla miktarda üreten GN bakterilere karşı etkinliklerini korurlar. (47). İlk bulunan ajan imipenemdir. 1996 yılından sonra ise karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmiştir. Meropenem, dihidropeptidaz enziminden etkilenmez. Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob bakterilere karşı etkindir (48).

1.6.1. İmipenem: Bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olan imipenem gram-pozitif, GN, aerob ve anaerob mikroorganizmaları içine alan çok geniş biretkinlik kapsamı vardır. Bu mikroorganizmaların çoğu için MİK 4mg/L'nin altındadır. Farklı antibiyotik kombinasyonlarıyla kıyaslandığında, çeşitli ciddi infeksiyonların tedavisinde son derece etkin

bir monoterapötik ajandır ve in vitro olarak imipenem, klinik olarak önem taşıyan bakterilerin çoğuna etkilidir (49).

Yapı: Bir beta-laktam halkası içermekle birlikte diğer beta-laktam antibiyotiklerden farklı olarak sis konfigürasyonundaki acil amino yan zincirinin yerine trans konfigürasyonunda hidroksietil yan zinciri içerir. Trans konformasyonu imipenemin beta-laktamaz dayanıklılığını sağlar. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak a-halkasında sülfür atomunda metilen (-CH₂-) yapısı içerir. Bu yapı karbapenemlerin bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını arttırır. Bu da antibiyotiğin etki spektrumunu genişletir ve antibakteriyel gücünü arttırır. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre membranından girişini kolaylaştırır. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkinliği sağlamaktadır (50).

İmipenem bu olağan üstü geniş etki spektrumuna ve beta-laktamaz direncine karşın, böbrekte ileri derecede enzimatik yıkıma uğrar. Metaboliti nefrotoksik bir ajandır. Bu nedenle tek başına kullanılamaz. Bir dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1/1 oranında birleştirilerek pazarlanmaktadır. Silastatin sodyum, DHP-1'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür. Silastatinin antibakteriyel etkinliği ya da beta-laktamazlar üzerine etkisi yoktur. İmipenemin etkisini antagonize etmez (51, 52)

Etki Mekanizması: Diğer beta-laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek etki eder, bakterisidaldir. İmipenem gram-pozitif ve GN bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerine yüksek bir afinite ile bağlanır. Bağlanma ilk önce PBP2'ye ve arkasından da PBP1a'ya olur. PBP2'ye bağlanması GN basillerin sferoblastlara dönüşmesine neden olur. İlave olarak PBP1'e bağlanması gram-pozitif ve GN bakterilerde hücrelerin daha hızlı lizisine yol açar. *E.coli'de* PBP1a, 1b, 2, 4, 5 ve 6'ya; *P.aeruginosa'da* PBP1a, 1b, 2, 4, 5'e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder (53, 54). GN bakterilerde dış membrana penetrasyonu da daha fazladır (55). Düşük molekül ağırlığı ve zwitteryonik (nötral yük) nedeniyle bakterinin hücre duvarına, penisilin ve sefalosporinlerden daha hızlı penetre olur (56).

1.6.2.Meropenem: İmipenemin aksine insan böbrek dehidropeptidaz I (DHP-1) enzimine karşı çok yüksek stabilite gösteren bir karbapenemdir. Klinik olarak önemli olan hemen tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. PBP2, hem imipenemin hem de

meropenemin başlıca hedefidir. Ancak meropenem, *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin PBP2 ve 3'üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve GN bakterilerdeki karbapenemazlar hariç diğer tüm beta-laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden imipenem, gram-pozitif organizmalara karşı daha etkili gözükürken meropenem, GN'lere özellikle de *P.aeruginosa*'ya daha etkilidir (57, 58) .

Meropenem genel olarak 3.kuşak sefalosporinlerden daha güçlü bir indükleyici olmasına karşın, *Enterobacter* ve *P.aeruginosa* izolatlarındaki grup 1 betalaktamazlar üzerindeki indükleyici etkisi imipeneme göre daha zayıftır (59, 60). Meropenemin *P.aeruginosa*'daki PBP2 ve PBP3'e karşı yüksek afinitesi olmasına rağmen, imipenemin afinitesi sadece PBP2'ye karşıdır. Bu durumun, özellikle meropenemin *P.aeruginosa* üzerinde daha güçlü bir etki gösterebilmesinde katkısının olabileceği ifade edilmektedir (61, 62). Meropenem için asıl hedef *P.aeruginosa*'daki PBP3'dür (63).

1.6.3. Ertapenem: Türkiye'de klinik kullanımda iki karbapenem (imipenem/silastatin ve meropenem) mevcuttur. İmipenem bobekte bulunan dihidropeptidaz-I (DHP-I) enzimine dayanıksızdır, bu nedenle DHP-1 inhibitörü olan silastatin ile birleştirilmiştir. Ertapenemin yapısında bulunan 1β-metil grubu renal DHP-1 enzimine karşı dayanıklılığı sağlar. İmipenem ve meropeneme benzer şekilde 6-hidroksietil grubu betalaktamazlara karşı stabiliteyi sağlar. İmipenemden farklı olarak C-4 pozisyonunda metil grubu içerir, benzoat anyonik yan zinciri ise proteine bağlanmada artış ve serum yarı omrunde uzamaya neden olur (64).

Ertapenem betalaktam antibiyotikler gibi hucre duvar sentezini engelleyerek bakterisidal etki gösterir. Ertapenem aerobik gram pozitif mikroorganizmalardan *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae* (penisilin duyarlı), *S. pyogenes*'e etkilidir. Aerobik gram negatif mikroorganizmalardan *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* ertapeneme duyarlıdır (65, 66). Anaerob mikroorganizmalardan *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium clostridioforme*, *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus species*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella bivia*'ya etkilidir (67- 68). Ertapenem *Stenotrophomonas maltophilia*, MRSA ve *Enterococcus spp.* etkisizdir. (69). *Acinetobacter spp.* ve *Pseudomonas spp.* meropeneme ve imipeneme göre ertapeneme daha az duyarlıdır (70).

Ertapenem penisilinaz, sefalosporinaz, ampC ve genişlemiş spektrumlu betalaktamaz (ESBL)'lardan etkilenmez, diğer karbapenemler gibi metallo betalaktamazlara dayanıksızdır. Ertapenem proteinlere özellikle albumine yüksek oranda bağlanır(% 85-95).Proteine bağlanma oranı ertapenemin plazma konsantrasyonu ile ilişkilidir, Ertapenem konsantrasyonu <100 mg/L iken proteine bağlanma % 95,300 mg/L iken ise % 85'dir. 1 gram IM uygulama sonrası 2- 3 saatte tepe düzeyine ulaşır (64- 65). Ertapenem başlıca bobrekler aracılığı ile atılır. Plazma yarı omru 4 saattir (69). Hemodializ ile ertapenemin % 30'u uzaklaştırılır. Hepatik metabolizması yoktur. 1 gram IV uygulama sonrası % 10'u dışkı ile atılır (70).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

1.1. Besiyerleri

1. Mueller Hinton Broth Besiyeri (Oxoid)
2. Luria Bertani Agar (Oxoid)
3. Luria Bertani Broth (Oxoid)
4. Skim Milk (Applichem)
5. Nutrient Agar (Applichem)
6. RPMI 1640 (Biochrom)
7. Fetal Bovine Serum (Biochrom)
8. Penicilin/ Streptomycin (Biochrom)
9. L- Glutamine (Biochrom)

1.2. Kimyasal Maddeler ve Boyalar

1. İmipenem
2. Meropenem
3. Ertapenem
4. Hoechst 33342 (Applichem)
6. Popidium iodide (Applichem)
7. Nphthyethylene-diamine dihydrochloride (Applichem)
8. O- phosphoric asit içinde sulfanilamide (Applichem)

1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarının *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanıldı.

ÇA yanıtlarını göstermek için rhl sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Chromobacterium violaceum* (CV026); las sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Agrobacterium tumefaciens* (A136) suşları kullanıldı.

2.4. *Invitro* yöntemler

2.4.1. Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'larının Belirlenmesi

Her suş için imipenem, meropenem ve ertapenem antibiyotiklerinin MİK değerleri, mikrodilusyon yöntemi ile katyon eklenmiş Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde saptandı. Bakteriler McFarland (McF) 0.5 ($1,5 \times 10^8$ hücre/mL)' e eşit bulanıklıkta hazırlandı. ELISA mikro plaklarındaki kuyucuklara önce MHB besiyerinden eşit miktarlarda dağıtılıp, daha sonra antibiyotiklerin iki kat dilusyonları ve son olarak da bakteri süspansiyondan dağıtıldı. Plaklar 18 saat 37°C' de inkübe edildikten sonra 450 nm' de spektrofotometrik (Multiskan FC.1.00.75, SN: 357- 00097)olarak değerlendirildi (71, 72).

2.4.2. Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarının imipenem, meropenem ve ertapenem antibiyotiklerine karşı MİK' lerinin belirlendiği mikroplyetler boşaltıldı. PBS ile üç kez planktonik formu uzaklaştırmak için yıkandıktan sonra % 1' lik kristal viyole uygulayarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar PBS ile üç kez yıkayıp, % 70' lik etil alkol uygulayarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip, 450 nm' de spektrofotometrik (Multiskan FC.1.00.75, SN: 357- 00097)olarak değerlendirilmiş ve besiyerinin iki katı absorbans değerleri biyofilm pozitif olarak kabul edilmiştir (73).

2.4.3. Suşların Çoğunluğu Algılama yanıtlarının Değerlendirilmesi

Louria Bertani Agar (LBA) dökülen 96 çukurlu ELISA mikro plakların LBB' da 30 °C 18 saat inkübe edilip McF 0.5' e eşit bulanıkta ayarlanan *Chromobacterium violaceum*(rhl sistemini görüntülemek (C4- HSL) için) ve *Agrobacterium tumefaciens* (Las sistemini (3-oxo-C12-HSL) göstermek için) ile birlikte antibiyotiklerin (imipenem, meropenem ve ertapenem) belirlenen MİK, %50 MİK ve % 25 MİK değerleri ile karşılaşmış las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginos* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarından eşit miktarda ekilerek 37 °C' de 36 saat inkübe edilerek değerlendirilmeleri yapıldı. AHL varlığı makroskobik olarak değerlendirildi. "mavi- yeşil" renk görülmesi pozitif olarak kabul edildi (74).

2.5. Ex vivo yöntemler

2.5.1. Hücre kültürü – Enfeksiyon modeli

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

Plate'lerde %80 yoğunlukta hazırlanan hücrelerin üzerine m.o.i 100:1 olmak üzere; las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşları eklenmiştir (73). Daha sonra imipenem, meropenem, ertapenem antibiyotiklerinin MİK ve sub-MİK yoğunlukları eklenerek inkübe edilip, bakterilerin biyofilm ve ÇA yanıtları, hücrelerin de apoptoz/nekroz, NO, yanıtları değerlendirildi.

2.5.2. Apoptozis – Nekroz

Pseudomonas aeruginosa suşları ile enfekte edilen hücrelerde oluşacak olası apoptoz; Hoechst 33342 (HOE) ve propidium iodide (PI) ile belirlendi. HOE; çift sarmallı DNA'ların AT'DEN zengin bölgelerine özgün vital bir boyadır. Bu iki boyanın kullanımı, hücre duvarının geçirgenlikleri arasındaki farklılıklara dayanır. Ölü hücreler bu boyalara geçirgendir, ancak canlı hücreler her iki boyayı da dışarı pompalar. Apoptotik hücreler ise PI' i atabilmesine rağmen HOE boyasını atamazlar. İnkubasyon sonunda hücreler fiske edildi ve HOE ile boyandı ve üç kez PBS ile yıkandıktan sonra PI boyası hemen mikroskopiden önce eklendi. Hücreler eksitasyon dalga boyu 330 nm ve bariyer filtresi olan 420 nm floresan mikroskop (Leica DMIL, Leica Microsystems Type 1130702071/ BZ.01) ile sayıldı (75).

2.5.3. NO yanıtları

iNOS ile üretilen nitrit, Griess ile ölçülmektedir. Nitrit, nitrit oksitin hızlı oksidasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Nitritin ölçümü için; 100 µL 'lik örnekler, 100 µL eşit hacimdeki Griess Reagent (A: naphthyethylene-diamine dihydrochloride, %0.1,5 mM; B: o-phosphoric asit içinde sulfanilamide, % 1,5 mM) ile 96'lık mikrotitre plaklarında karıştırılıp (Maxisorb Immunoplate, NUNC) ve 10 dakika oda sıcaklığında bekledikten

sonra 540 nm' de plaklar okutuldu. (spektro model system, Holland) sodyum nitritin iki kat sulandırımı ile de standart eğri çizdirilerek, değerler saptandı (76).

3. BULGULAR

3.1 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının İmipenem, Meropenem, Ertapenem Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri

Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ve Las mutant *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropenem antibiyotikleri için MİK değerleri aynı olup sırasıyla 8, 0.5 µg/ mL olarak bulunmuştur. Rhl mutant *P. aeruginosa* suşunun imipenem ve meropenem antibiyotikleri için MİK değeri ise 1 µg/ mL olarak belirlenmiştir. Ertapenem antibiyotiği için ise las mutant ve rhl mutant *P. aeruginosa* suşları için aynı olup 4 µg/ mL, standart PAO1 suşu için ise 2 µg/ mL olarak bulunmuştur (Tablo 1).

İmipenem antibiyotiği için standart *P. aeruginosa* PAO1 ve Las mutant *P. aeruginosa* suşları orta duyarlı, rhl mutant *P. aeruginosa* suşu duyarlıdır. Meropenem ve ertapenem antibiyotikleri için her üç suşta duyarlıdır.

3.2 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Çoğunluğu Algılama Yanıtları

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarının *in vitro* ve *ex vivo* uygulamalarda imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında ÇA sistemlerin çalışmasının aynı olduğu, değişmediği belirlenmiştir.

İmipenem etkisinde standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun ÇA sistemlerinden las sistemin sadece MİK değerinde çalışıp, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde çalışmadığı; rhl sisteminin ise sadece % 50 MİK ve %25 MİK değerlerinde çalıştığı gösterilmiştir. Meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve %25 MİK değerlerinde standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun her iki ÇA sisteminin de çalıştığı belirlenmiştir (Tablo 2).

İmipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde Las mutant *P. aeruginosa* suşunun rhl sistemi çalışırken las sistemin çalışmadığı gösterilmiştir. rhl mutant *P. aeruginosa* suşunun ise imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50

MİK ve % 25 MİK değerlerinde rhl sistemi çalışırken, las sisteminin çalışmadığı görülmüştür (Tablo 2).

3.3. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Biyofilm Yanıtları

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa*, rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşlarının *in vitro* ve *ex vivo* uygulamalarda imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir.

Las mutant ve rhl mutant *P. aeruginosa* suşlarının imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluşturduğu gözlenirken, standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun imipenemin sadece % 25 MİK değerinde biyofilm oluşturup, MİK ve % 50 MİK değerinde oluşturmadığı gözlenmiştir (Tablo 3).

Her üç *P. aeruginosa* suşunun meropenemin % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluştururken, MİK değerinde oluşturmadığı belirlenmiştir (Tablo 3).

Standart *P. aeruginosa* PAO1 ve rhl mutant *P. aeruginosa* suşlarının ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluşturduğu görülürken, las mutant *P. aeruginosa* ertapenemin % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluşturup, MİK de oluşturmadığı belirlenmiştir (Tablo 3).

3.4. *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem)grubu antibiyotik uygulanan HEp- 2 hücre dizisindeki NO Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Bakteri ile enfekte edilmeyen ve antibiyotik uygulaması yapılmayan, HEp- 2 hücre dizisinin NO yanıtı; 15 µM olarak belirlenmiştir. Sadece standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, las mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ve suşları ile enfekte edip, antibiyotik uygulanmayan hücre dizilerinde meydana gelen NO yanıtları sırasıyla 45. 2 µM, 38. 0 µM ve 55. 7 µM olduğu gösterilmiştir (Tablo 4).

Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücre dizilerine imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında gözlenen NO yanıtları sırasıyla 63. 3 µM, 64. 4 µM ve 71. 7 µM; meropenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında 63. 6 µM, 65. 3 µM, 63. 3 µM; ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında ise; 55. 9 µM, 65. 3 µM ve 67. 5 µM olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte HEp- 2 hücre dizilerine imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında gözlenen NO yanıtları sırasıyla 58. 8 µM, 53. 7 µM ve 51. 7 µM; meropenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında 73. 8 µM, 53. 2 µM, 49. 8 µM; ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında ise; 63. 6 µM, 53. 0 µM ve 50. 3 µM olarak bulunmuştur (Tablo 4).

Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte HEp- 2 hücre dizilerine imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında gözlenen NO yanıtları sırasıyla 59. 3 µM, 63. 6 µM ve 50. 3 µM; meropenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında 58. 1 µM, 51. 7 µM, 51. 4 µM; ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunlukları uygulandığında ise; 56. 8 µM, 51. 7 µM ve 60. 8 µM olarak bulunmuştur (Tablo 4).

3. 5. *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) grubu antibiyotik uygulanan HEp- 2 hücre dizisindeki Apoptoz-Nekroz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte edilen HEp- 2 hücresi 18 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirildiğinde hücre sayısının azaldığı ve kalan hücrelerin % 90' ında nekroz kalan % 10 ise apoptoz meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 1). Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücreler de % 70 oranında nekroz, % 30 oranında apoptoz görülürken, las mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde hücrelerin büyük ölçüde azaldığı ve kalan hücrelerin % 50 ' inde nekroz % 50' inde ise apoptoz meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3). Yapılan değerlendirmeler sonucunda standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ve las mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde biyofilm benzeri

yapılar gözlenmiştir. Bakteri ile enfekte edilmeyen HEp- 2 hücrelerinin 18 saatlik inkübasyon sonunda canlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).

Ertapenemin MİK konsantrasyonunun uygulandığı standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücresinde % 5 oranında nekroz, % 25 oranında apoptoz meydana gelirken geriye kalan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği belirlenmiştir (Şekil 5). Aynı suş ile enfekte hücre dizisine ertapenemin % 50 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücre sayısının bir önceki dilusyona göre belirgin oranda azaldığı ve hücrelerin % 50' inde nekroz, % 50' inde apoptoz meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 6). Ertapenemin % 25 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücre sayısının oldukça azaldığı ve kalan hücrelerde nekroz meydana geldiği görülmüştür (Şekil 7).

Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere ertapenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında hücre sayısının azaldığı fakat kalan hücrelerde apoptoz meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 8). Aynı suş ile enfekte hücrelere ertapenemin % 50 MİK ve % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere ertapenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında % 5 oranında nekroz, % 25 oranında apoptoz meydana gelirken diğer hücrelerin canlı oldukları görülmüştür (Şekil 9). Aynı suş ile enfekte hücrelere ertapenemin % 50 MİK ve % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

İmipenemin MİK konsantrasyonunun uygulandığı standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücresinde % 6 oranında nekroz, % 20 oranında apoptoz meydana gelirken geriye kalan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği belirlenmiştir (Şekil 10). Aynı suş ile enfekte hücre dizisine imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücrelerin % 80' inde nekroz, % 20' inde apoptoz meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 11). İmipenemin % 25 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücre sayısının oldukça azaldığı ve kalan hücrelerde nekroz meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca bu enfekte bu hücrelerde biyofilm benzeri yapı oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 12).

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere imipenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında hücrelerde % 25 oranında nekroz, % 35 oranında

apoptoz meydana gelirken geriye kalan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği belirlenmiştir (Şekil 13). Enfekte hücre dizisine imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücrelerin uygulandığında % 7 oranında nekroz, % 45 oranında apoptoz meydana gelirken diğer hücrelerin canlı oldukları görülmüştür (Şekil 14). Aynı suş ile enfekte hücrelere imipenemin % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere imipenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında % 20 oranında nekroz ve % 80 oranında apoptoz meydana geldiği belirlenmiştir. (Şekil 15). Enfekte hücrelere imipenemin % 50 MİK ve % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

Meropenemin MİK konsantrasyonunun uygulandığı standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte HEp- 2 hücresi sayısında azalma olduğu ve % 10 oranında nekroz, % 45 oranında apoptoz meydana gelirken geriye kalan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği belirlenmiştir (Şekil 16). Aynı suş ile enfekte hücre dizisine meropenemin % 50 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücrelerin % 40' inde nekroz, % 45' inde apoptoz meydana geldiği ve geri kalan hücrelerin canlı oldukları gözlenmiştir (Şekil 17). Meropenemin % 25 MİK konsantrasyonu uygulandığında ise hücre sayısının oldukça azaldığı ve % 30 oranında nekroz gözlenirken kalan hücrelerde nekroz meydana geldiği görülmüştür (Şekil 18).

Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere meropenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında HEp- 2 hücresinde % 2 oranında nekroz, % 40 oranında apoptoz meydana gelirken geriye kalan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiği belirlenmiştir (Şekil 19). Aynı suş ile enfekte hücrelere meropenemin % 50 MİK ve % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte hücrelere meropenemin MİK konsantrasyonu uygulandığında % 20 oranında apoptoz meydana geldiği ve kalan diğer hücrelerin canlı olduğu belirlenmiştir. (Şekil 20). Enfekte hücrelere meropenemin % 50 MİK ve % 25 MİK konsantrasyonları uygulandığında hiç hücre kalmadığı gözlenmiştir.

Standart suşla enfekte edilen hücrelerde yaygın hücre ölümü oluşuyor. Bu deneylerin doğru oluşturulduğunu gösteren bir iç kontrol sonucudur. Rhl mutant suşta nekroz (ölüm)

oranı azalırken, nekroz oranı las mutantta daha düşük olmaktadır. Ayrıca standart suş ve las mutant suşta biyofilm benzeri yapılar gözlenmiştir. Bu sonuç çok ilginçtir, çünkü in vivo (ex vivo) biyofilm sonucu, biyotik ortamda gösterimi çok zordur.

Ertapenem uygulamasında MİK'te nekroz oranı düşerken, sub MİK düzeylerinde nekroz oranı artmaktadır. Bu da ilginç bir sonuçtur, çünkü ertapenem rutin olarak, yan etkileri nedeniyle, Pseudomonas enfeksiyonları tedavisinde kullanılmaz. Rhl mutant ve las mutant suşlarda ertapenem uygulama sonuçları da farklıdır.

Tablo 1: *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının İmipenem, Meropenem, Ertapenem Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri

	İMİPENEM	MEROPENEM	ERTAPENEM
PAO1	8 µg/ mL	0.5 µg/ mL	2 µg/ mL
Las mutant <i>P. aeruginosa</i>	8 µg/ mL	0.5 µg/ mL	4 µg/ mL
Rhl mutant <i>P. aeruginosa</i>	1 µg/ mL	1 µg/ mL	4 µg/ mL

Tablo 2 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Çoğunluğu Algılama Yanıtları

ANTİBİYOTİK	SUŞLAR	ÇA	MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	KONTROL
İMİPENEM	PAO1	las	+	-	-	+
		rhl	-	+	+	+
	Las mutant	las	-	-	-	-
		rhl	+	+	+	+
	Rhl mutant	las	-	+	+	+
		rhl	-	+	+	-
MEROPENEM	PAO1	las	+	+	+	+
		rhl	+	+	+	+
	Las mutant	las	-	-	-	-
		rhl	+	+	+	+
	Rhl mutant	las	-	+	+	+
		rhl	-	+	+	-
ERTAPENEM	PAO1	las	+	+	+	+
		rhl	+	+	+	+
	Las mutant	las	-	-	-	-
		rhl	+	+	+	+
	Rhl mutant	las	-	+	+	+
		rhl	-	+	+	-

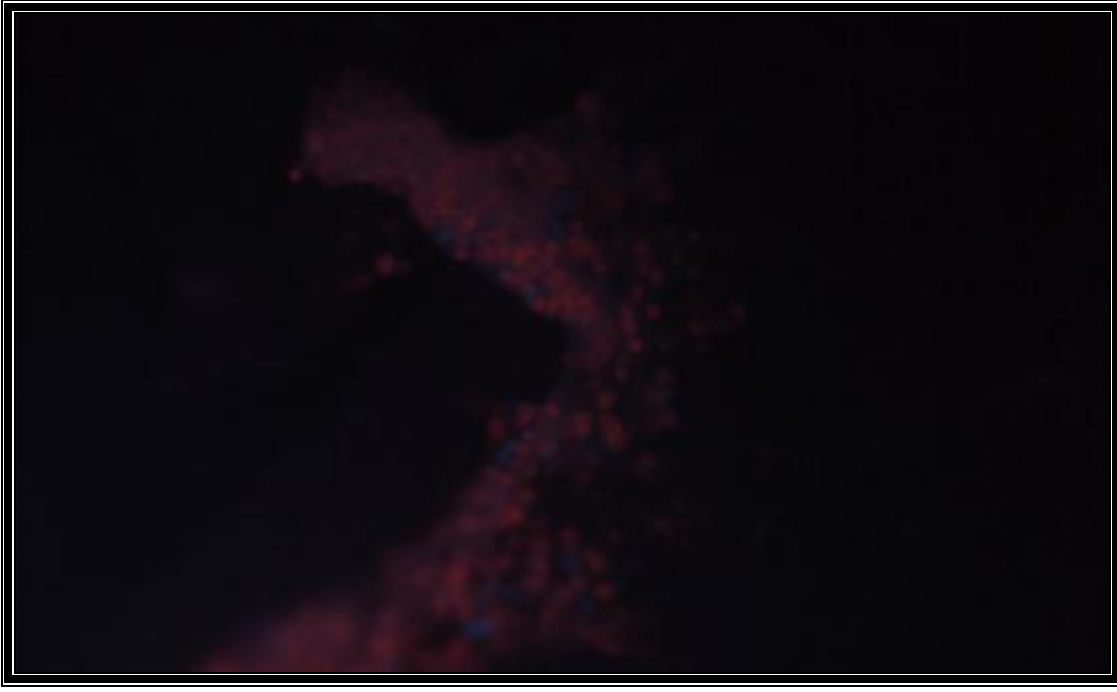
Tablo 3. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Karbapenemler (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) Etkisinde ve Enfeksiyon modeli uygulandıktan sonra Hücreden İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Biyofilm Yanıtları

ANTİBİYOTİK	SUŞLAR	MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	KONTROL
İMİPENEM	PAO1	-	-	+	+
	Las mutant	+	+	+	+
	Rhl mutant	+	+	+	+
MEROPENEM	PAO1	-	+	+	+
	Las mutant	-	+	+	+
	Rhl mutant	-	+	+	+
ERTAPENEM	PAO1	+	+	+	+
	Las mutant	-	+	+	+
	Rhl mutant	+	+	+	+

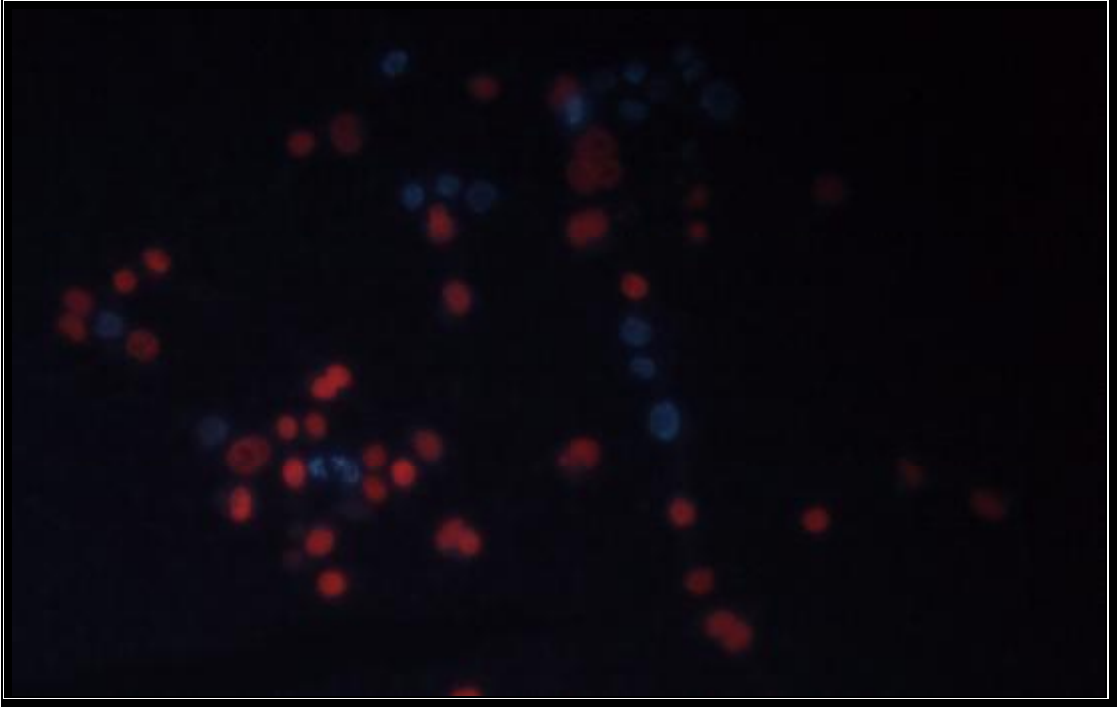
Tablo 4. *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilen ve Karbapenem (İmipenem, Meropenem, Ertapenem) grubu antibiyotik uygulanan HEp- 2 hücre dizisindeki NO Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ANTİBİYOTİK	SUŞLAR	MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	KONTROL
İMİPENEM	PAO1	63. 3 µM	64. 4 µM	71, 7 µM	45. 2µM
	Las mutant	58. 8 µM	53. 7 µM	57. 7 µM	38.0 µM
	Rhl mutant	59. 3 µM	63. 6 µM	50. 3 µM	55. 7 µM
MEROPENEM	PAO1	63. 6 µM	65. 3 µM	63. 3 µM	45. 2µM
	Las mutant	73. 8 µM	53. 2 µM	49. 8 µM	38.0 µM
	Rhl mutant	58. 1 µM	51. 7 µM	51. 4 µM	55. 7 µM
ERTAPENEM	PAO1	55. 9 µM	65. 3 µM	67. 5 µM	45. 2µM
	Las mutant	63. 6 µM	53. 0 µM	50. 3 µM	38.0 µM
	Rhl mutant	56. 8 µM	51. 7 µM	60. 8 µM	55. 7 µM

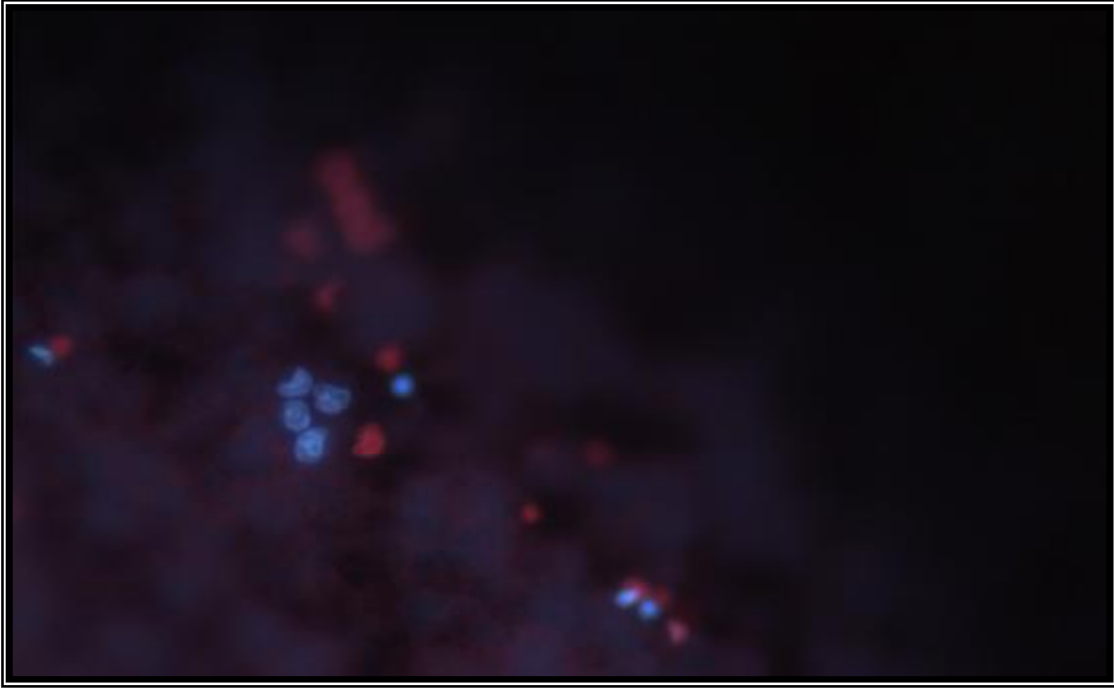
* HEp- 2 hücre dizisinin bakteri ve antibiyotik uygulaması olmaksızın NO yanıtı: 15 µM



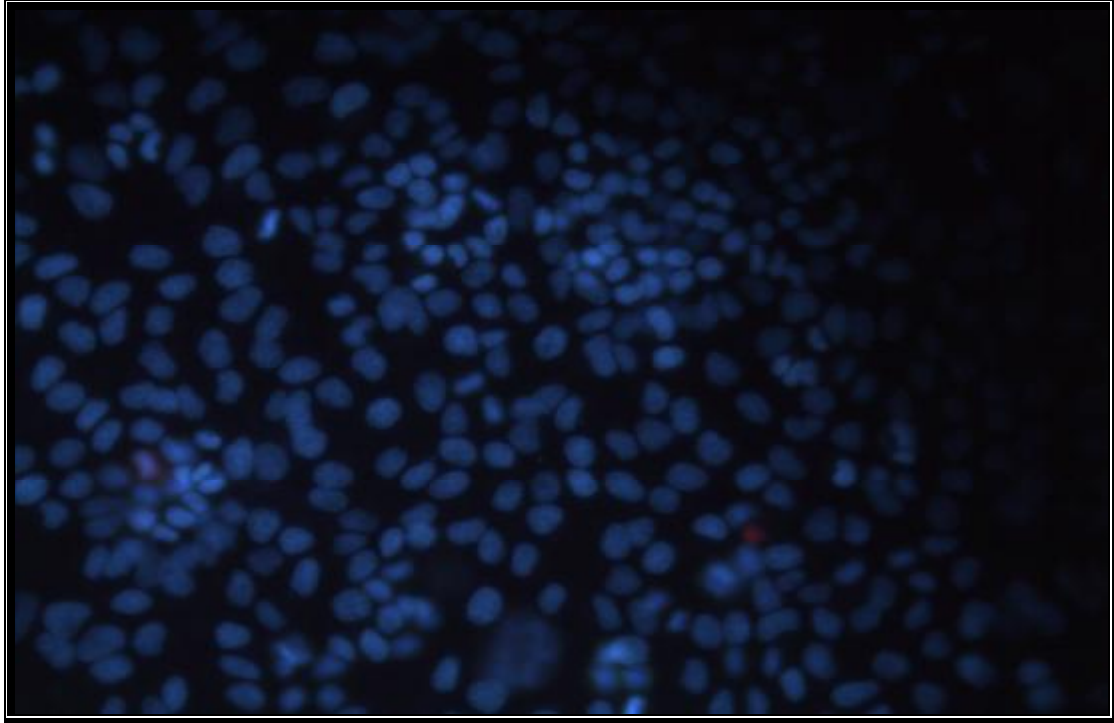
Şekil 1: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi



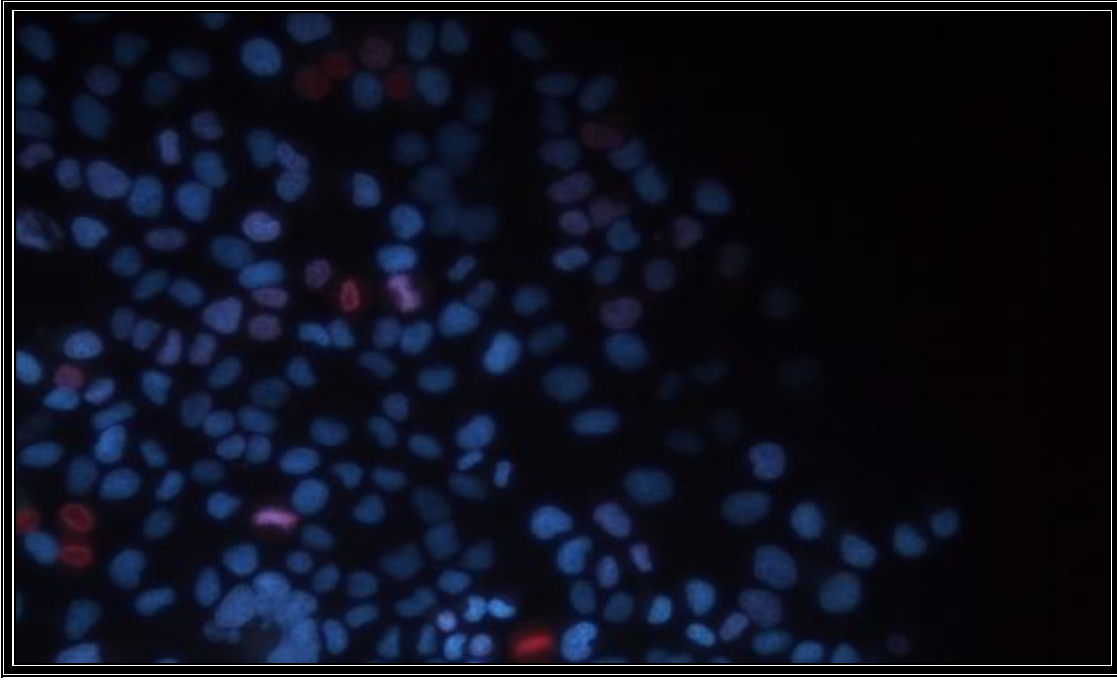
Şekil 2: *rhl mutant Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi



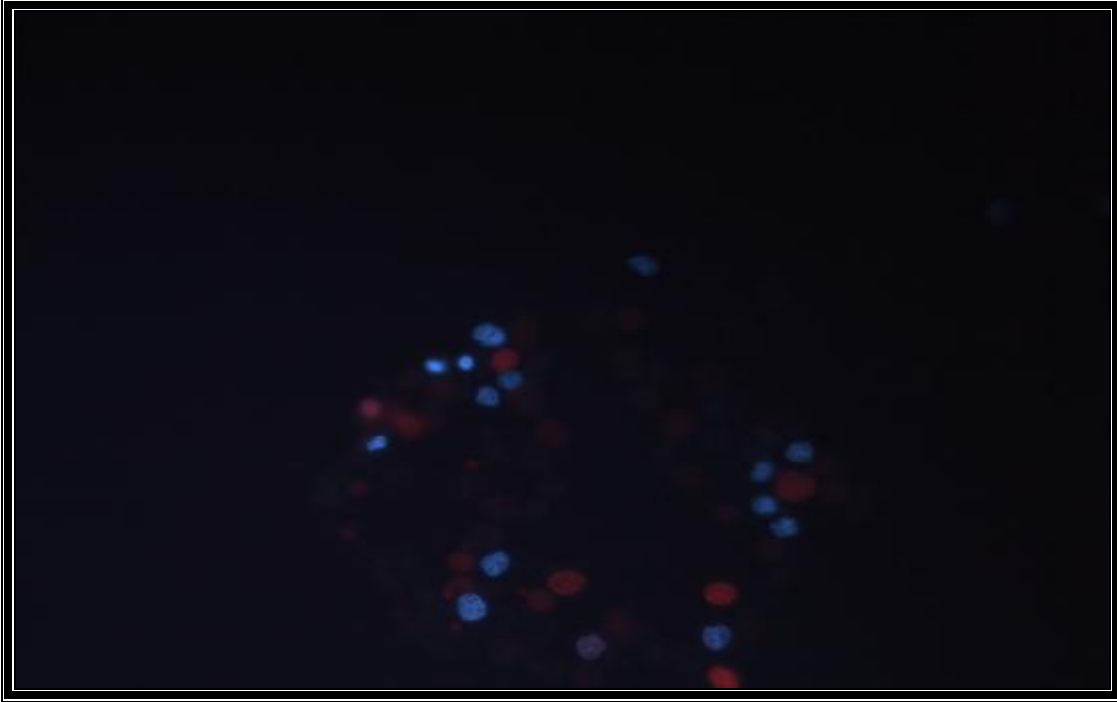
Şekil 3: *las mutant Pseudomonas aeruginosa* suşu ile enfekte edilmiş HEp- 2 hücre dizisinin apoptoz- nekroz değerlendirmesi



Şekil 4: HEp- 2 hücresi



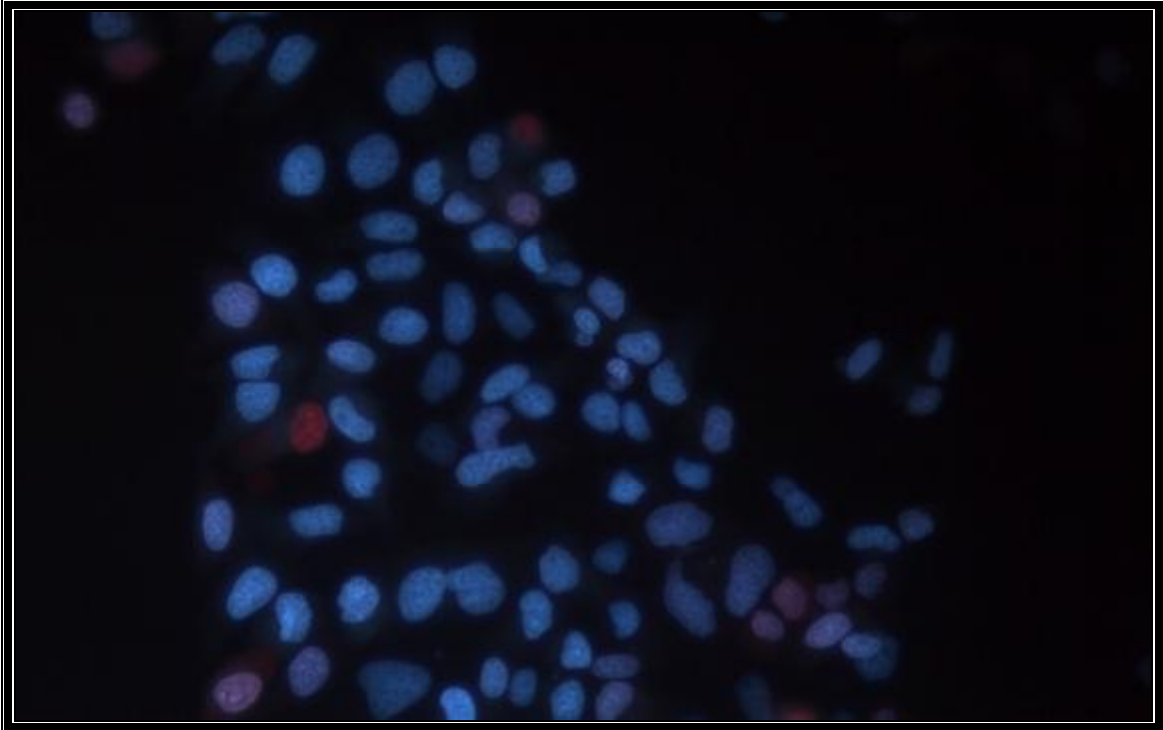
Şekil 5: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



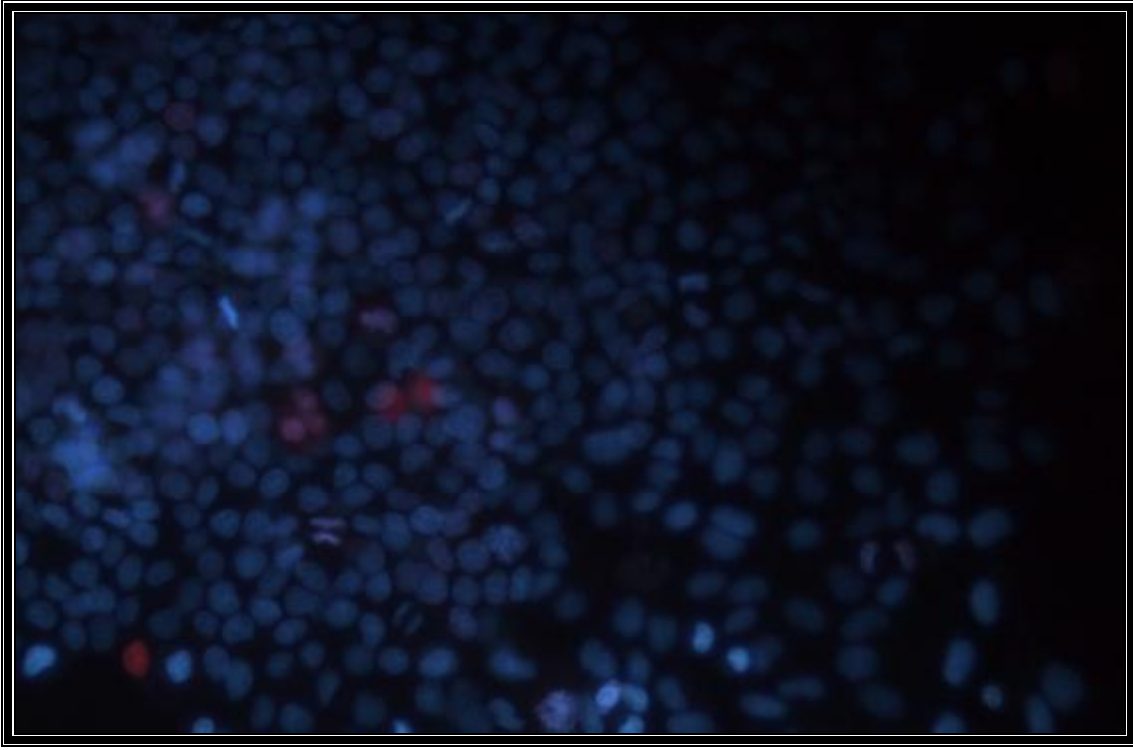
Şekil 6: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde ertapenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



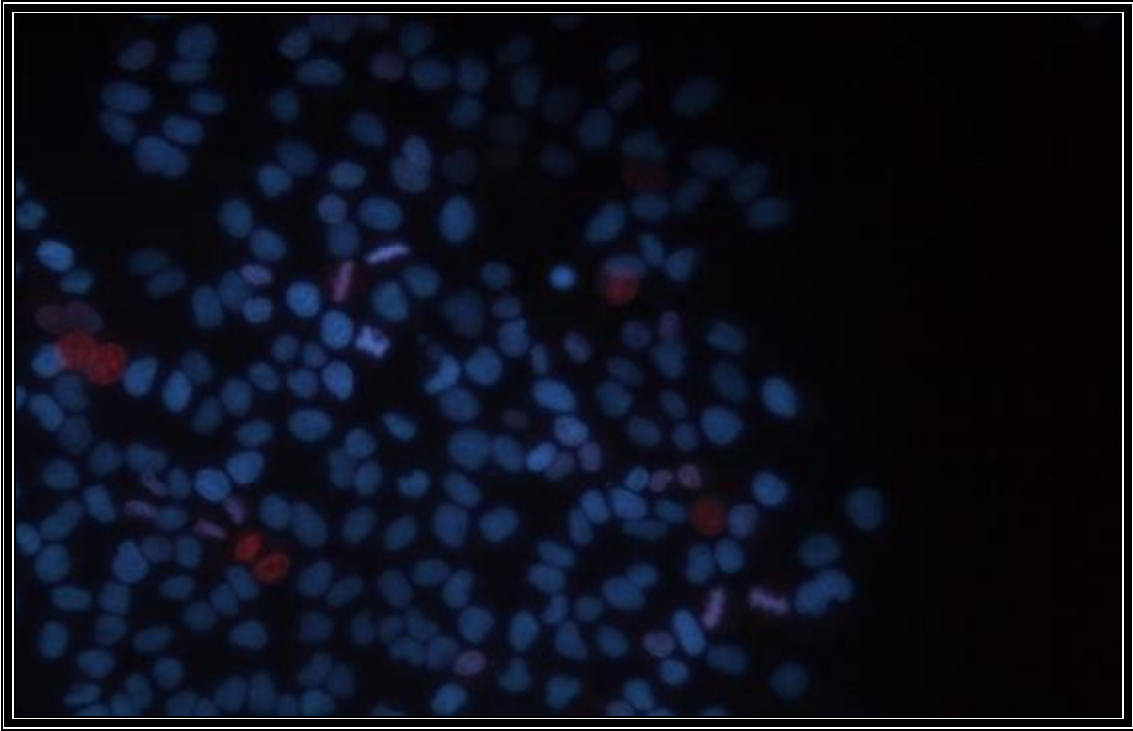
Şekil 7: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerine ertapenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



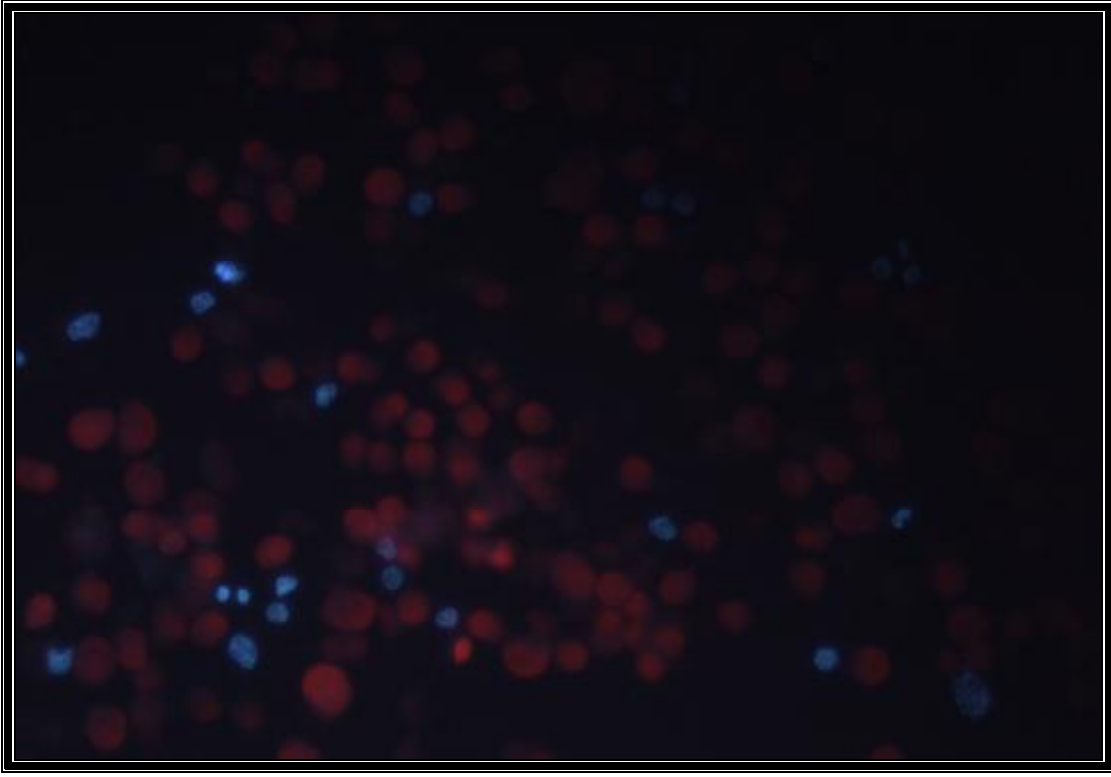
Şekil 8: Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



Şekil 9: Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde ertapenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



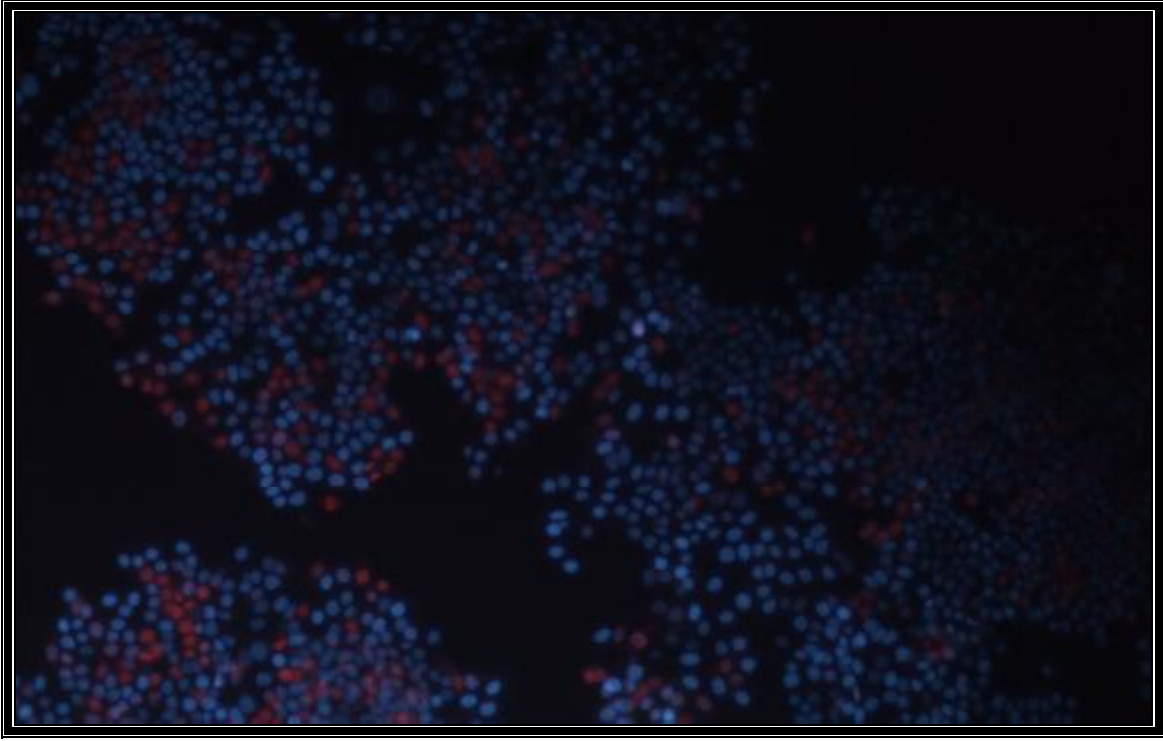
Şekil 10: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



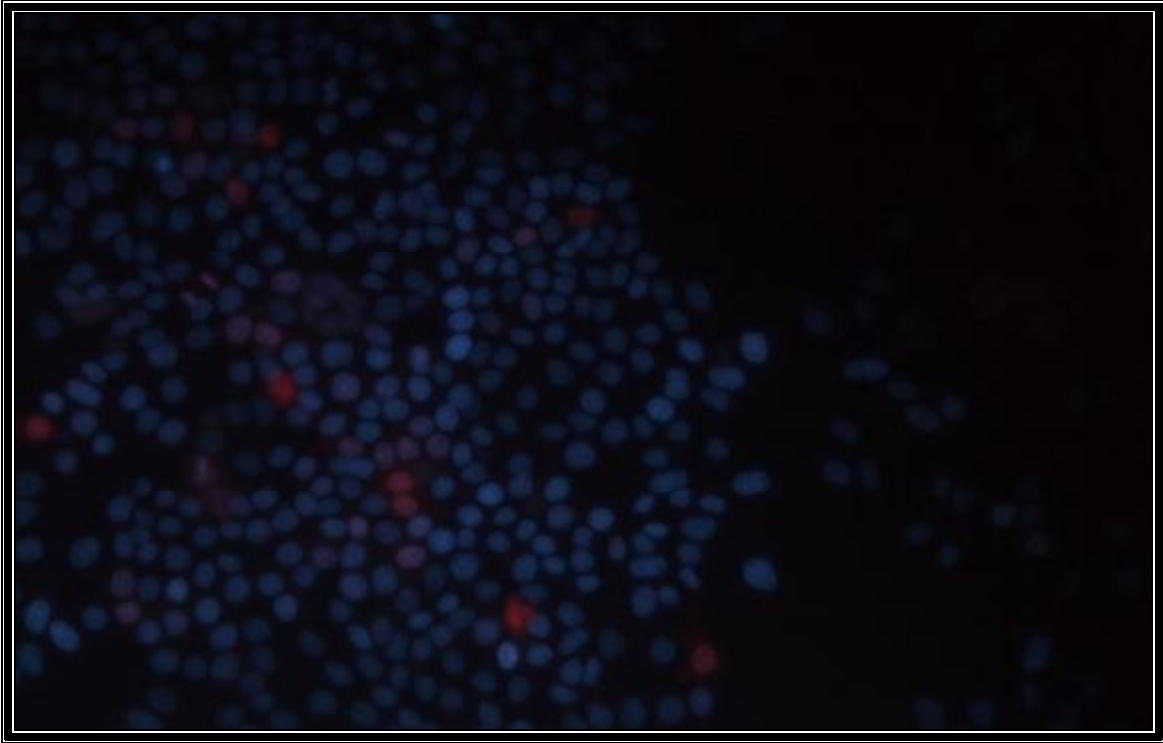
Şekil 11: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi



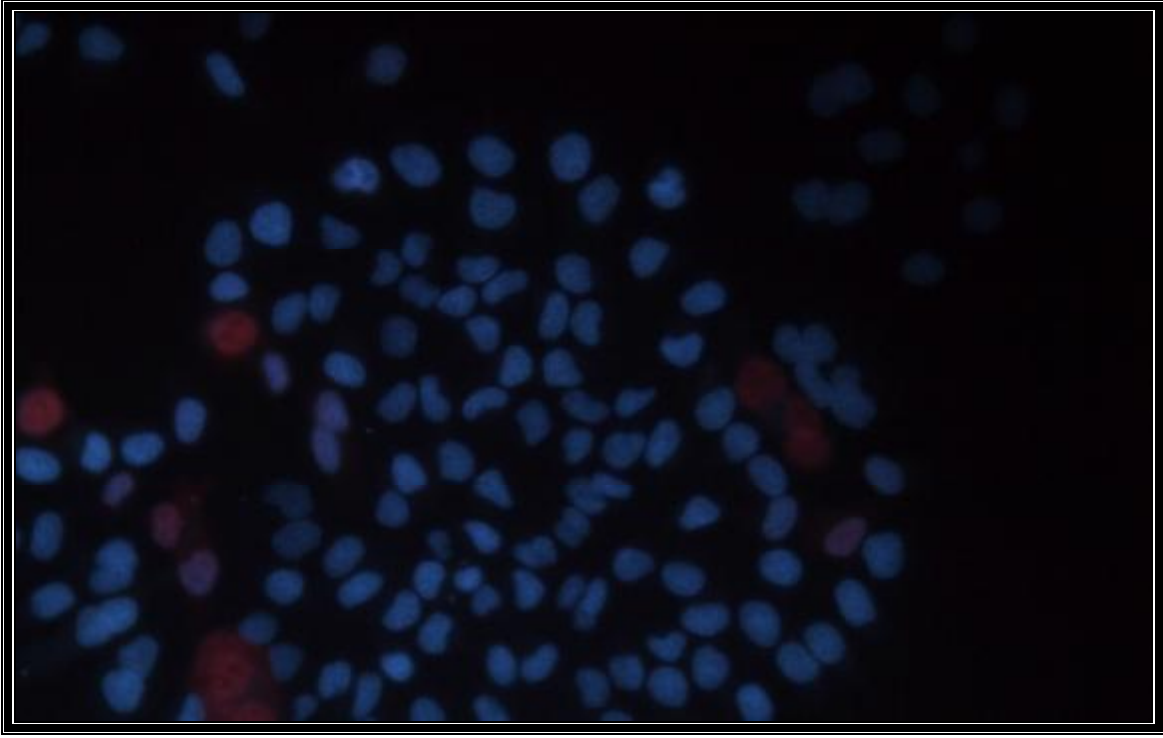
Şekil 12: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücresinde imipenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirmesi



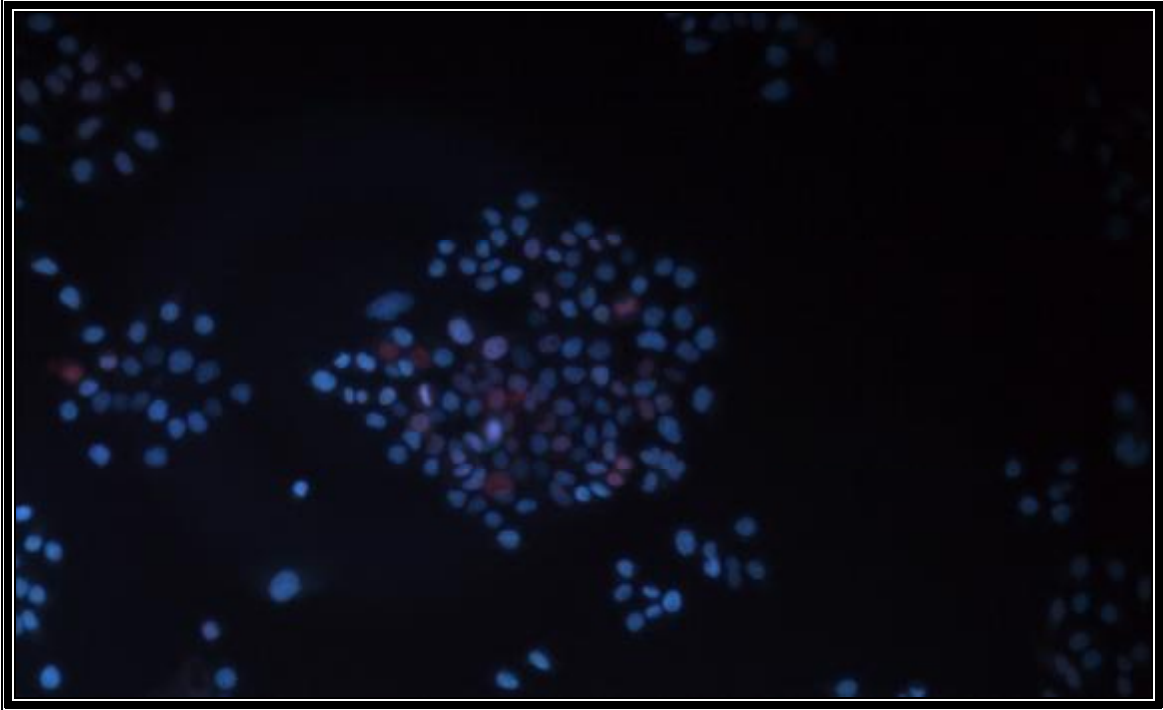
Şekil 13: Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



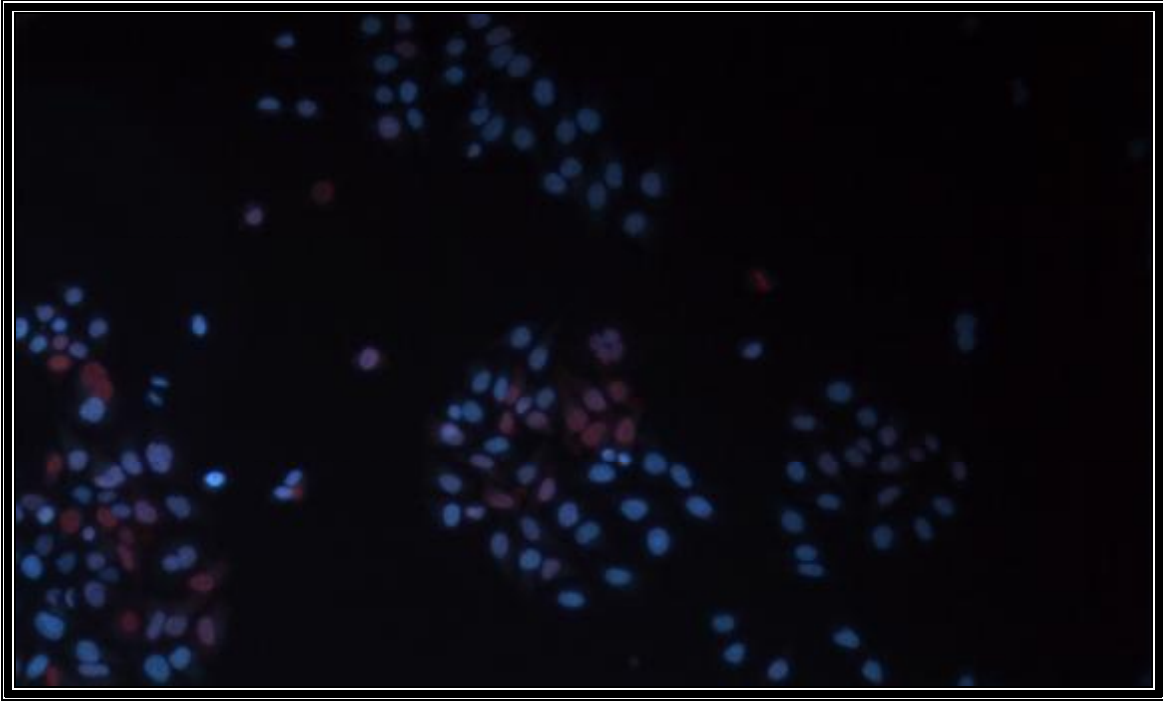
Şekil 14: Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde imipenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



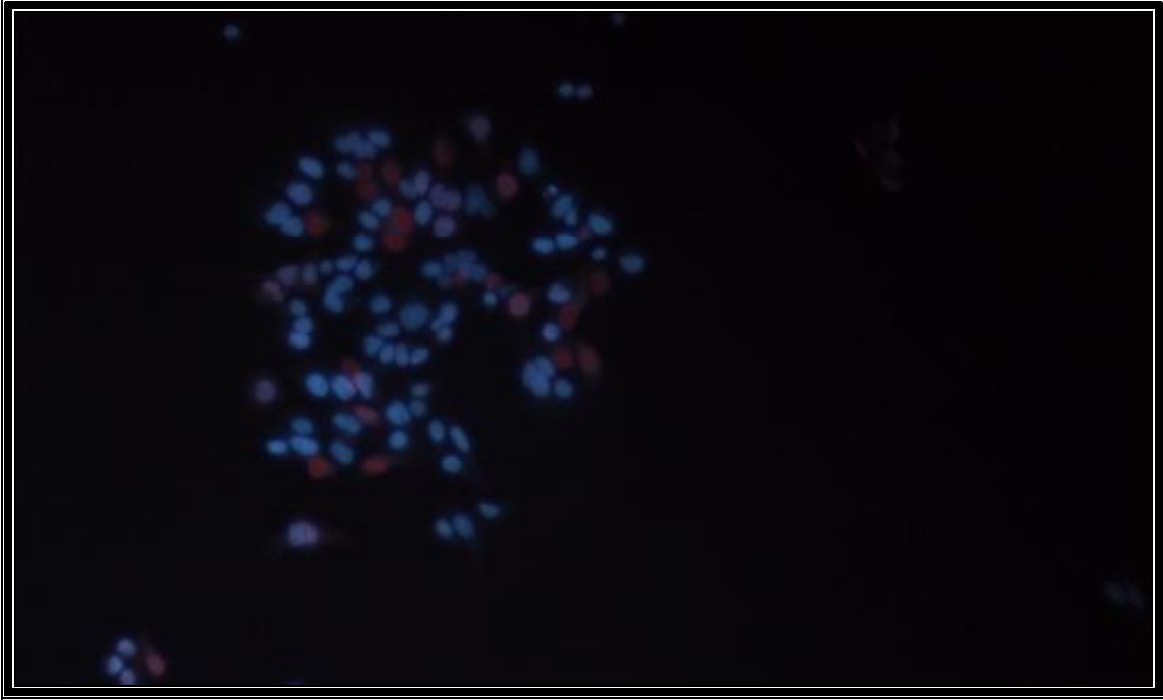
Şekil 15: : Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde imipenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



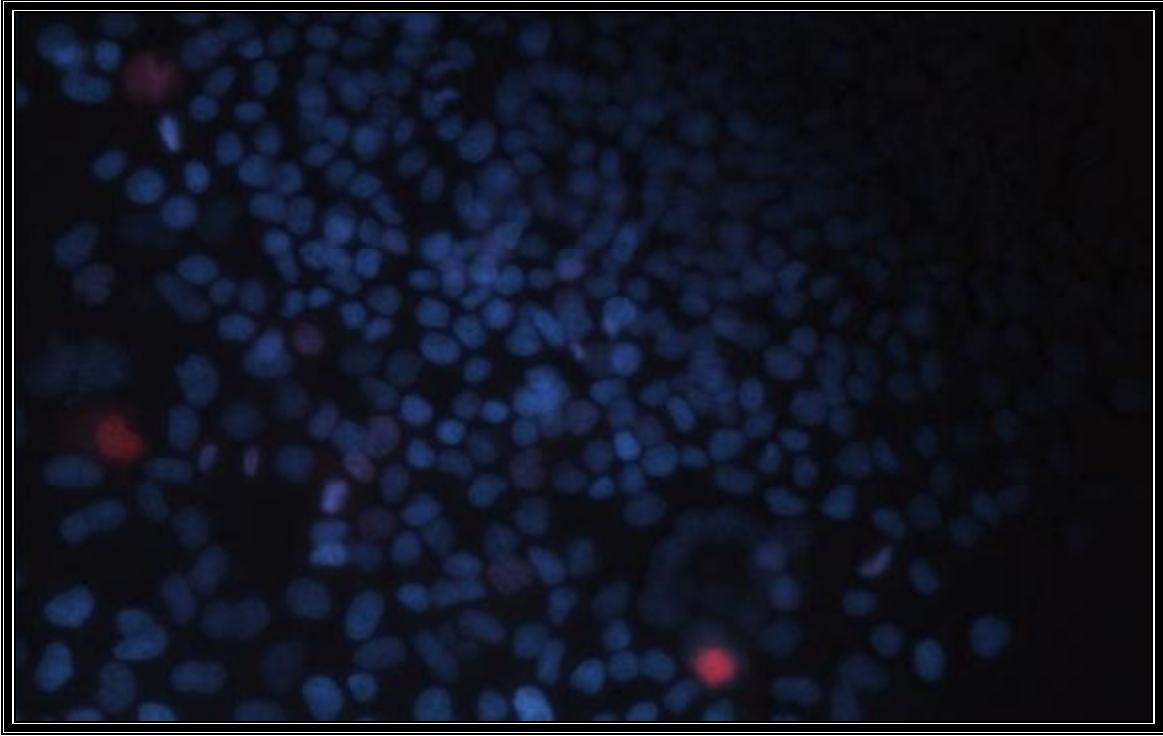
Şekil 16: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



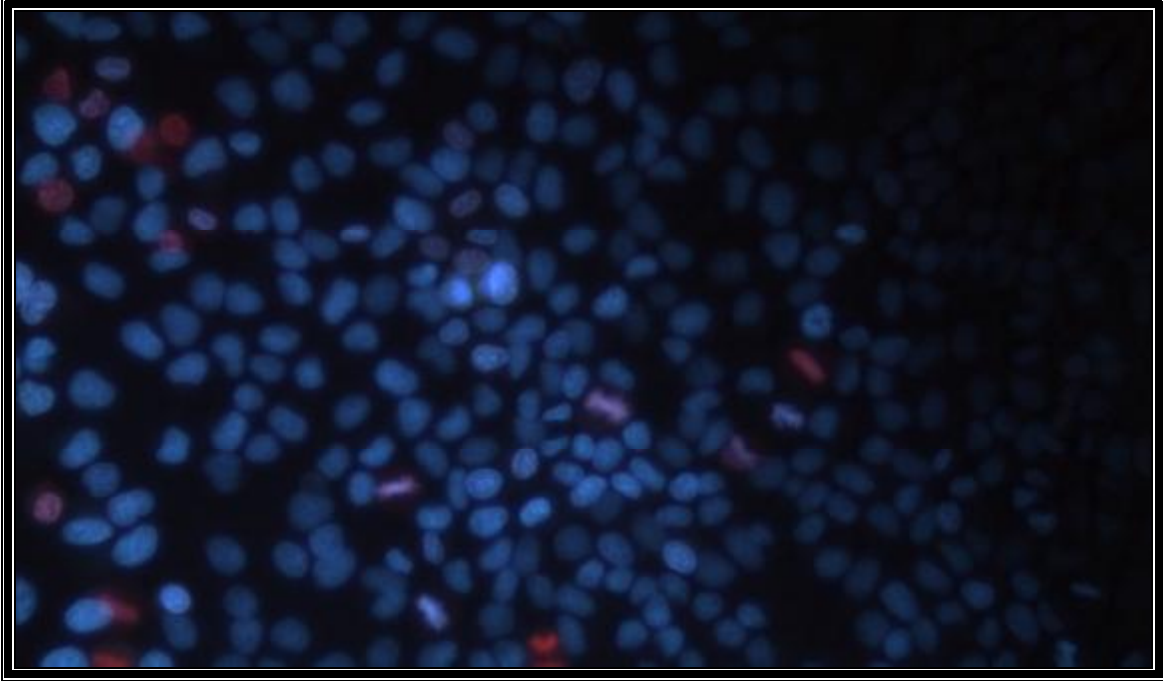
Şekil 17: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde meropenemin % 50 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



Şekil 18: Standart *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde meropenemin % 25 MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



Şekil 19: Las mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi



Şekil 20: Rhl mutant *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte HEp- 2 hücrelerinde meropenemin MİK konsantrasyonu etkisinde apoptoz- nekroz değerlendirilmesi

4. TARTIŞMA

Çoğunluğu algılama, lokal bakteri yoğunluğu ile gen sunumu düzenlenmesi arasında bağlantıyı sağlayan bakteri içi sinyal ileti sistemidir. Algılama, bir bakteri popülasyonunun gen sunumunu, beraber lokalize olan bakteri sayısına bağımlı olarak koordine etmesine olanak verir. Çoğunluğu algılama, en çok üzerinde çalışılan *P.aeruginosa* olmak üzere, virülans gen sunumunu koordine etmek için bazı patojenler kullanır. Böylece bakteri toplulukları, sadece kritik düzeyde bakteri kütlesi bulunduğu zaman virülans davranış benimserler (77- 78).

Biyofilm yapıları bakteri topluluklarının bir yüzeye tutunmasını sağlarlar ve kendi salgıladığı ekzopolisakkarid matrix ile çevrelenmişlerdir. Biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakteriler serbest yaşayan veya planktonik formlarda olmak üzere iki form olarak biyofilmin içinde bulunabildiği gösterilmiştir (79, 80).

Biyofilmler, antibiyotikleri de içeren çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı dirençlidirler. Biyofilm oluşturan önemli patojenler arasında *S.aureus*, koagülaz negatif *Staphylococci*, *P. aeruginosa* sayılabilmektedir. Biyofilmler, intravasküler kateterler, üriner kateterler, endotrakeal tüpler, ve prostetik kalp kapaklarının sebep olduğu infeksiyon ve bakteri kolonizasyonunda önemli rol alır (81).

Biyofilm içinde planktonik formda bulunan bakteriler *in vitro* ortamda duyarlı olarak belirlenmesine karşın, biyofilm içindeki bakteri, antibiyotiklere karşı dirençli oldukları gösterilmiştir. Antibiyotiklere karşı biyofilmin dirençli olmasının nedenleri arasında en çok biyofilm matriks içerisine antibiyotik penetrasyonunda azalma ve metabolik olarak inaktif dormant hücre bulunması gibi faktörler öne çıkmaktadır. Antibiyotiklere karşı biyofilm kaynaklı infeksiyonlardaki fonksiyonel direnç, infeksiyon bölgesinden infekte materyalin uzaklaştırılmasının önemini açıklamaktadır (15, 81).

P. aeruginosa' da biyofilm oluşumlarının hücreden hücreye sinyal iletim sistemi olan ÇA sistemleri ile kontrol edildiği belirlenmiştir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak etkinleşen ÇA sistemleri; ışınma, plazmid taşınımı ve farklı virülans etmenlerinin üretimi gibi bakterinin farklı metabolik etkinliklerini kontrol etmektedir(21, 23). ÇA sistemleri, kendi kendini uyarıcı

sentezinden sorumlu gen bölgesi (LasI ve Rhl I) ve transkripsiyonal düzenleyici (Las R ve Rhl R) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Fırsatçı patojen *P. aeruginosa*' da LasI / R; RhlI / R ve *Pseudomonas* kinolon sinyalleme (PQS: *Pseudomonas* Quinolone Signalling) olmak üzere üç ÇA sistemi vardır. Bunlardan ikisi; LasI/ R sistemi; "N-(3-oxododecanol)-L-AHL" (3OC₁₂- HSL) sinyal molekülü ile rhlI/R sistemi ise "N-butryl-L-AHL" (C₄- HSL) sinyal molekülü ile çalışmaktadır. Bakteri sayısına bağlı olarak üretilen bu sinyal molekülleri yeterli yoğunluğa ulaştığında bazı genlerin uyarımı gerçekleşmektedir (82, 83).

Çalışmamızda kullandığımızda imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde Las mutant *P. aeruginosa* suşunun rhl sistemi çalışırken las sisteminin çalışmadığı gösterilmiştir. rhl mutant *P. aeruginosa* suşunun ise imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde rhl sistemi çalışırken, las sisteminin çalışmadığı görülmüştür. İmipenem etkisinde standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun ÇA sistemlerinden las sisteminin sadece MİK değerinde çalışıp, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde çalışmadığı; rhl sisteminin ise sadece % 50 MİK ve %25 MİK değerlerinde çalıştığı gösterilmiştir. Meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve %25 MİK değerlerinde standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun her iki ÇA sisteminin de çalıştığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar; *P. aeruginosa*' nın kullandığı las ve rhl olmak üzere iki ÇA sisteminin çalışmasının, suşta her iki sistemin varlığında imipenemin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında baskılanabildiği veya uyarılabildiğini göstermektedir. Meropenem, ertapenem, imipenem sadece las veya sadece rhl sistemini kullanan suşların ÇA sistemleri üzerinde baskılayıcı ve / veya uyarıcı etkisinin olmadığını göstermiştir.

Kistik fibrosisli hastaların akciğer alveollerinde ve farklı konak dokularında oluşan *P. aeruginosa* enfeksiyonları için biyofilm oluşumları oldukça önemlidir. Biyofilm oluşum sürecinde bakteri üremesi devam eder ve farklı antibiyotiklere karşı ve /veya konak immun yanıtında bakteriyi koruyan bakteriyel ekzopolisakkarit olan glikokaliks tabakasını üretirler (84).

P. aeruginosa' nın meydana getirdiği biyofilm oluşumlarının, (i) yüzeye tutunmanın gerçekleştiği geri- dönüşümlü tutunma, (ii) bakterilerin hareketsiz olduğu geri- dönüşümsüz tutunma, (iii) bakteri kümelerinin oluştuğu olgunlaşma evresi, (iv) bakteri kümelerinde kanal ve porların oluştuğu, biyofilm oluşumundan ayrılmaların başladığı dağılma evresi olmak üzere dört evreden oluştuğu belirlenmiştir (83, 85, 86).

Geri- dönüşümsüz tutunma evresinde; bakteri kümelerinin gelişmesi ve bakterilerin tutunmasından sonra las regulonu etkinleşmektedir. Las B' nin etkin hale gelişinin, biyofilm hücrelerinin gelişimi ile eş zamanlı başladığı gösterilmiştir. Dış membran proteinleri, lipopolisakkarit (LPS), alginat, flagel ve tip IV pili tutunmada önemli olan adhezinlerdir. Bu geri-dönüşümsüz tutunma evresinde, bakteri hareketinin sona erdiği ve flagel kaybının olduğu gösterilmiştir. Olgunlaşma evresinde ise; ikinci ÇA sistemi olan rhl sistemi aktive olmaktadır. Hücre dışı matriks olan glikokaliks üretimi ile mikroçevrede oksijen seviyelerinin düşmesine bağlı olarak anaerobik solunum ile ilgili proteinlerin yapımı artar. Bu protein yapımının artması ile de biyofilm mimarisi şekillenir. Hareketin önemli olduğu dağılma evresinde ise; bakteri kümelerinden ayrılan bakterilerin hareketli olduğu, bakteri kümelerinin duvarında kalan bakterilerin hareketsiz oldukları gösterilmiştir. Ortam koşulları düzeldiğinde hareket özelliği kazanan bakteriler biyofilmden ayrılmaya başlamaktadır (83).

P. aeruginosa biyofilmleri; enfeksiyonun akut veya kronik oluşuna ve tutunduğu dokuya göre farklı mimaride olmaktadır. Schaber ve arkadaşları klinikten izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının polikarbonat membranda biyofilm oluşumunu sağlayarak, planktonik form ile biyofilm formunun; *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan imipenem (karbopenem β -laktam), gentamisin (aminoglikozid) ve piperasilin-tazobaktam (β -laktamaz inhibitörü) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını araştırmışlar ve biyofilm formunun planktonik forma göre yaklaşık 10 kat daha dirençli hale geldiğini göstermişlerdir (87). Çalışmalarımızda imipenem, meropenem ve ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında biyofilm oluşumları değerlendirilmiştir. Las mutant ve rhl mutant *P. aeruginosa* suşlarının imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluşturduğu gözlenirken, standart *P. aeruginosa* PAO1 suşunun imipenemin sadece % 25 MİK değerinde biyofilm oluşturup, MİK ve % 50 MİK değerinde oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu sonuca göre her iki ÇA sistemini kullanan suşta biyofilm oluşumunun, imipenemin MİK ve %50 MİK değerlerinde baskılandığı görülmektedir. Her üç *P. aruginosas* suşunun meropenemin % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluştururken, MİK değerinde oluşturmadığı belirlenmiştir. Kullandığı ÇA sistemi hangisi olursa olsun suşlarda biyofilm oluşumunun meropenemin MİK değerinde baskılandığı gösterilmiştir. Standart *P. aeruginosa* PAO1 ve rhl mutant *P. aeruginosa* suşlarının ertapenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK değerleri etkisinde iken biyofilm oluşturduğu görülürken, las mutant *P. aeruginosa*

ertapenemin % 50 MİK ve % 25 MİK değerlerinde biyofilm oluşturup, MİK de oluşturmadığı belirlenmiştir.

Biyofilmler bakterilerin hızlı ve yavaş veya değişen mikroçevre koşullarına göre üremelerini durdurmaları ile oluşmaktadır (88). Enfeksiyon bölgesinde bakteri hücreleri farklı fizyolojik mikroğevrelerde bulunabilirler. Biyofilm oluşumunda; yüzeye tutunma, yüzeyde çoğalma ve bakterinin bulunduğu üreme fazı önemlidir (89, 90). Farklı fizyolojik mikroğevrelerde, üremenin yavaşlaması bakterileri antibiyotiklerden korunmasını sağlamaktadır ve bu da biyofilm oluşumu ile meydana gelen direncin bakteri üremesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (91, 92).

5. SONUC VE ÖNERİLER

Hazırlanan deneysel model, antibiyotik uygulamalarının başarısını sorgulamak amacıyla geliştirilebilir. Bir bakteriyoloji laboratuvarında *in vitro* koşullarda bazı ölçütler değerlendirilerek, izole edilen bakterinin seçilen antibiyotiğe yanıtlarını değerlendirerek, sağaltımın başarısı – başarısızlığı, sağaltımın dönemlerinin yönlendirilmesi – değiştirilmesi - geliştirilmesi ile ilgili yorum yapılabilir. *Pseudomonos aeruginosa* enfeksiyonlarında; virulans etmenlerinin sunumu, direnç gelişimi, konağın davranışlarına kadar geniş bir alanı ilgilendiren ÇA sistemlerinin açıklanması ile yeni sağaltım yöntemleri geliştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J Clin Invest. 2003 Nov;112(10):1460–5
2. Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 30;103(22):8305–6).
3. Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? Expert Opin Ther Targets. 2002 Jun;6(3):257–74.
4. Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993; 34(9):2699–712
5. Delden CV and Iglewski B. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Emerging Infectious Diseases. 1998; Vol:4: 551- 60
6. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P ve ark. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Mol Microbiol. 1996 Sep;21(6):1137–46.
7. Costerton JW. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents. 1999 May;11(3-4):217-21.
8. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA ve ark. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. BMC Microbiol. 2007 Apr 18;7: 33.
9. Hu FZ, Ehrlich GD. Population-level virulence factors amongst pathogenic bacteria: relation to infection outcome. Future Microbiol. 2008 Feb;3(1):31 – 42
10. <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Normalflora.html> (Erişim Tarihi: 27.Kasım. 2007)
11. http://www.bilecen.org/?page_id=10 (Erişim Tarihi: 4 Mayıs 2011)
12. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. J Appl Microbiol. 2007 Nov;103(5):1828–37.
13. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends Microbiol. 2005 Jan;13(1):7- 10.

14. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(13):1213- 9.
15. Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2002;(31):163S-170S
16. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr.* 2007 Feb;19(1):83–8
17. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J.Bacteriol.* 2003 Mar;185(5):1485-91.
18. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002;95 Suppl 41: 22- 6
19. Hostacká A, Ciznár I, Slobodníková L, Kotulová D. Clinical *Pseudomonas aeruginosa*: potential factors of pathogenicity and resistance to antimicrobials. *Folia Microbiol (Praha).* 2006;51(6):633- 8.
20. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Sep;38(9):2125- 33.
21. Pappas KM, Weingart CL, Winans SC. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol.* 2004 Aug;53(3):755- 69.
22. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101.
23. Joint I, Allan Downie J, Williams P. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1115- 7.
24. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1119- 34.
25. Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell- to- cell signalling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005; 73: 3197.
26. <http://bacterianeurons.com/> (Erişim Tarihi: 4 Mayıs 2011)
27. Fugua C, Parsek RM, Greenberg PE. Regulation of gene expression by cell- to-cell communication: acyl – homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 439.
28. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW ve ark. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol* 2002;4(1):18 -28.

29. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Jan;387(2):409–14
30. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1620–5.
31. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N ve ark. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem Biol.* 2007 Oct;14(10):1119- 27.
32. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr.* 2007 Feb;19(1):83–8.
33. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK ve ark. Mucin- *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol.* 2006 Jan;59(1):142–51.
34. Baskın H: Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: “Quorum sensing” (Çoğunluğu algılama), *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2006;36(2):111- 5.
35. Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S ve ark. Autoinducer- 2 regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation. *J Bacteriol.* 2007 Nov 2.
36. Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR ve ark. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol.* 1999 Dec;34(5):1082– 93.
37. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* 2000 (14):1721–31.
38. Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE ve ark. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1997 Jun;179(12):3928- 35.
39. Davies DG, Parsek MR; Pearson JP, Iglewski BH ve ark. The involvement of the cell-to cell signals in the development of a biofilm, *Science* 1998;280 (5361):295- 298.
40. Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 2;104(40):15876- 81.
41. Köhler T, Dumas JL, Van Delden C. Ribosome Protection Prevents Azithromycin-Mediated Quorum-Sensing Modulation and Stationary-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Dec;51(12):4243- 8.
42. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):445–53.

43. Fulghesu L, Giallorenzo C, Savoia D. Evaluation of different compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa* J Chemother. 2007 Aug;19(4):388- 91.
44. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC ve ark. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3605– 13.
45. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z ve ark Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature. 2005 Aug 25;436(7054):1171– 5.
46. Kulasakara H, Lee V, Brenic A, Liberati N ve ark. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2839 -44.
47. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting. Curr Opin Microbiol 2000;3: 489-95.
48. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. Expert Opin Investig Drugs. 2002;11(4):529-44.
49. Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V, and study group. Imipenem/silastatin (1,5 g daily) versus Meropenem (3,0 g daily) in patients with intraabdominal infections: Results of prospective, randomized, multicentre trial. Scand J Infect Dis 1997;29:503-8.
50. Bimbaum J, Kahan FM, Kroop H. Carpapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. Am J Med 1985;78(Suppl 6A):3-21.
51. Nikaido H. Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. Pharmacol Ther 1985;27:197-231. Endtz HP, Dijk WC, Verbrugh HA and Mustin Study Group. Comparative in vitro activity of meropenem against selected pathogens from hospitalized patients in the Netherlands. J Antimicrob Chemother 1997;39:149-56.
52. Yang Y, Bhached N, Bush K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: Permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 1995;35:75-84.
53. Jackson JJ, Kroop H. Beta-lactam antibiotics induced release of free endotoxin: In vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP)2-specific imipenem and PBP3- specific ceftazidim. J Infect Dis 1992;165:1033-41
54. Gudmundsson S, Erlendsdttir H, Gattfrendsson M, Gudmundsson A: The postantibiotics effect induced by antimicrobial combinations. Scand J Infect Dis 1990; 74: 80-93.
55. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics. Pharmacol Ther 1985;27:197-231.

56. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 1995;36(Suppl A):1-17.
57. White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(4):904-8.
58. Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora* 1997;283:3-16.
59. Yang, Livermore DM. Interactions of meropenem with class C chromosomal betalactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989;24(Suppl A):187-96.
60. Kitzis MD, Acar JF, Gutmann L. Antibacterial activity of meropenem against gram-negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1989;24 (suppl A):125-32.
61. Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T. Comparison of two carbapenems, SM-7338 and imipenem: affinities for penicillin-binding proteins and its release from these proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* 1990;34(3):484-6.
62. Cunha BA. Ertapenem. A review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. *Drugs Today (Barc)* 2002; 38 (3): 195-213.
63. Pankuch GA, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antipneumococcal activity of ertapenem (MK-0826) compared to those of other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (1): 42- 46.
64. Livermore DM, Carter MW, Bagel S, et al. In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against recent clinical bacteria collected in Europe and Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (6): 1860-1867.
65. Goldstein EJ, Citron DM, Vreni MC, Warren Y, Tyrrell KL. Comparative In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (9): 2389-2394.
66. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from 11 North American medical centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (6): 1915- 1918.
67. Gill CJ, Jackson JJ, Gerckens LS, et al. In vivo activity and pharmacokinetic evaluation of a novel long-acting carbapenem antibiotic, MK-826 (L-749,345). *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42 (8): 1996-2001
68. Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M. Activity of ertapenem (MK-0826) versus Enterobacteriaceae with potent betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (10): 2831-2837.

69. Sundelof JG, Hajdu R, Gill CJ, et al. Pharmacokinetics of L-749,345, a long-acting carbapenem antibiotic, in primates. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (8): 1743-1748
70. Sader HS, Gales AC. Emerging strategies in infectious diseases: new carbapenem and trinem antibacterial agents. *Drugs* 2001; 61 (5): 553-564
71. CLSI. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış standart-Onaltıncı baskı.M100-S16. Ocak -2006; 26(3).
72. Baskın H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Int. J. Antimicrob Agents*, 2002; 19: 79 -82.
73. Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Görüntülenmesinde İki Yöntemin Karşılaştırılması. (Baskıda: *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2008. 38(2)).
74. Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Deneysel Mikroçevre Modelleme Çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*'nın farklı Hücre Dizilerinde Çoğunluğu Algılama ve Biyofilm Yanıtları. *Türkiye Klinikleri Dergisi*. 2009; 29: 3, 627- 42.
75. Monteiro HP, Silva EF, Stern A. Nitric oxide: a potential inducer of adhesion related apoptosis-anoikis. *Nitric Oxide*, 2004; 10: 1-10.
76. Baskın H, Ellermen-Eriksen S, Lourmand J, Mogensen SC. Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon- γ in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor- α . *Jof Gen Virolog*. 1997;78: 195–203.
77. Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thuruthyl SJ ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1897–903.
78. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Mar;30(2):274- 91
79. Middleton B, Rodgers HC, Cámara M, Knox AJ ve ark. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 22;207(1):1–7.
80. Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol*. 2006 Dec;8(12):1841- 9.
81. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167- 93.
82. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Nov;40(11):2517-22.

- 83.** Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4331- 4.
- 84.** Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21: 319- 46.
- 85.** Nick JA, Rodman DM. Manifestations of cystic fibrosis diagnosed in adulthood. *Curr Opin Pulm Med.* 2005 Nov;11(6):513- 8.
- 86.** Matsukawa M, Greenberg EP. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(14):4449- 56.
- 87.** Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1140–54.
- 88.** Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC ve ark. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2007 Jun;56(Pt 6):738- 48.
- 89.** Sufya N, Allison DG, Gilbert P. Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol.* 2003;95(6):1261- 7.
- 90.** Roberts ME. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology.* 2005 Jan;151(Pt 1):75- 80.
- 91.** Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jun;69(6):3327- 32.
- 92.** Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001 Dec;183(23):6746- 5.