T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURANON C30 VE ELAJİK ASİT C11'İN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BİYOFİLMİNİN ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN TOBRAMİSİNİN ETKİSİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZGE AKSU

DANIŞMAN

PROF. DR. FATMA KÖKSAL ÇAKIRLAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Özge AKSU

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana deneyimleri ile her zaman yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimini ve mesleki tecrübesini benden esirgemeyen manevi desteğini ve güvenini her zaman hissettiğim Saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince deneyimlerinden yararlandığım, üzerimde emeği bulunan Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri, Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK, Prof. Dr. ARİF KAYGUSUZ, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç.Dr. ERDAL POLAT, PhD. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya, teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde beni yüreklendiren, güvenlerini, maddi ve manevi desteklerini her an bana hissettiren annem Nevin AKSU, babam Musa AKSU ve ablam Gamze ERDİNÇ'e teşekkür ederim.

Zorlu geçen dönemlerimde beni yalnız bırakmayan manevi desteklerini ve güleryüzlerini benden esirgemeyen kuzenim Gülden KOÇ ve Gizem Nur KOÇ ve sevgili arkadaşlarım Nigar MİRALİZADE, Selma YALÇIN ve Metin YALÇIN' a teşekkür ederim.

Tez süresince bana her zaman yardım eden, destek olan ve yanımda olduğunu hissettiren sevgili Dr. Noor Abdullah HUSSAIN HUSSAIN'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33645

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 5
2.1.1. Tarihçe 5
Pseudomonadların sınıflandırılması, rRNA / DNA homolojisine ve ortak kültür özelliklerine dayanmaktadır. Pseuodomonas' lar I, II, II, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır. *P. aeruginosa* rRNA grup I 'e dahil olmuştur [29]. 5
2.1.2. Morfoloji ve İdentifikasyon 8
2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Epidemiyolojik Özellikleri 10
2.1.4. Patogenez 11
2.1.5. *P. aeruginosa'*nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları 12
2.1.5.1. *P. aeruginosa*'ya Bağlı Hastane Enfeksiyonu 12
2.1.5.2. Yanık Yara Enfeksiyonları 13
2.1.5.3. Bakteriyemi 13
2.1.5.4. Hastaneye Bağlı Pnömoni 13
2.1.5.5. Ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) 14
2.1.5.6. Kistik fibrozis (KF) 14
2.1.5.7. Primer Idrar Yolu Enfeksiyonu 15
2.1.5.8. Yabancı Cisim Enfeksiyonları 16
2.2. *P. aeruginosa* Hastalık Yapma Mekanizmaları 17
2.2.1. Virülans Faktörleri 17

2.2.1.1. Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virülans Faktörleri 18
2.2.1.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri 19
2.3. Laboratuvar Tanısı 22
2.4. Antibiyotik Direnci ve Tedavi 22
2.5. Pseudomonas ve Biyofilm 24
2.6. Biyofilm 26
2.6.1. Biyofilm Tarihçesi 26
2.6.2. Biyofilmin Yapısı.....27
2.6.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları 29
2.6.3.1. Yüzeye ilk temas / bağlanma 30
2.6.3.2. Mikrokoloni oluşumu.....31
2.6.3.3. Biyofilm mimarisinin olgunlaşması ve oluşumu 31
2.6.3.4. Biyofilmin ayrılması / dağıtılması 31
2.6.4. Biyofilm Oluşumunun Önemi.....32
2.6.4.1. Savunma: stres yanıtı olarak biyofilm oluşumu.....32
2.6.4.2. Adhezyon ve Kolonizasyon 32
2.6.4.3. Yaşanabilir çevre geliştirme.....33
2.6.4.4. Topluluk oluşturmak 33
2.6.5. Quorum Sensing Sistemi.....33
2.6.5.1. N-açilhomoserin lakton (AHL) sinyali: 35
2.6.6. Quorum Quenching (QQ) 35
2.6.6.1. Sinyal Sentezinin Engellenmesi; Patojenik faktörlerin ifadesinde bakteri iletişiminin önemi nedeniyle, sinyal sentezinin engellenmesi bakteriyel enfeksiyonu önlemek için potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir [97].....35
2.6.6.1. Sinyal Molekülleri ile Etkileşim; 35
2.6.6.2. Sinyal Moleküllerinin İnaktivasyonu;.....36
2.6.6.3. AHL Bozulması için İmmobilize Enzim; 36
2.6.7. Pseudomonas ve Quorum sensing.....36
2.6.8. Biyofilm Direnci 38
2.6.9. Tıbbi İnfeksiyonlar ve Biyofilm İlişkisi.....40
2.6.10. Biyofilm Tanı Yöntemleri.....43
2.6.11. Biyofilm Tedavi 48

2.6.12. Biyofilm Kontrol Stratejileri (Biyofilm inhibisyon ve eradikasyon çalışmaları) 50
2.7. Meropenem 54
2.8. Siprofloksasin 55
2.9. Tobramisin 56
2.10. Elajik Asit 57
2.11. Furanon 58
3. GEREÇ VE YÖNTEM 62
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler 62
3.1.1. Kimyasal Maddeler 62
3.1.2. Antibiyotikler 63
3.1.3. Çalışmada kullanılan doğal bileşikler 63
3.1.4. Besiyerleri 63
3.1.5. Mikroorganizma 63
3.1.6. Çözeltiler 63
3.1.7. Çalışmada Kullanılan Bakteri 63
3.1.8. Bakteri Suşunun Toplanması ve Saklanması 63
3.1.9. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması 63
3.1.10. Besiyerlerinin Hazırlanması 64
3.1.11. Kristal Viyole Hazırlanması 64
3.1.12. Stok Çözeltilerin Hazırlanması 64
3.2. YÖNTEM 65
3.2.1. Biyofilm Oluşumunun Tespiti 65
3.2.2. *P. aeruginosa* Biyofilm Oluşturması Üzerine Furanon, Elajik Asit ve Antibiyotiklerin Etkisinin Tespiti 66
3.2.3. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBEK).67
3.2.4. Hücre Canlılık Testinin Yapılışı (MTT Testi) 68
3.2.5. İstatistiksel analiz 69
4. BULGULAR 70
4.1. Biyofilm Oluşumunun Tespiti 70
4.2. Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBİK) 71
4.2.1. İnhibisyon plak kuyucuklarından TSA yapılan ekimler 72
4.3. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBEK) 81

4.4. İstatistiksel analiz.....87
5.TARTIŞMA.....89
KAYNAKLAR.....96
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....117
ÖZGEÇMİŞ.....118

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Klinik olarak önemli *Pseudomonas*'ların gruplandırılması [29]. 7
Tablo 2-2. *P. aeruginosa* virülans faktörleri [37] 18
Tablo 2-3. Antibiyofilm stratejileri [131]. 49
Tablo 3-1. Antibiyotik sulandırım tablosu [168] 65
Tablo 3-2. *P. aeruginosa'* ya ait Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) Değerleri (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2020/Pseudomonas_aeruginosa_v_7.0_January_2020.pdf) 67
Tablo 3-3. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi I. Deney Sonuçları 75
Tablo 3-4. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi II. Deney Sonuçları 75
Tablo 3-5. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi III. Deney Sonuçları 76
Tablo 3-6. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi Üç Deney Ortalama Sonuçları 76
Tablo 3-7. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) I. Deney Sonuçları 78
Tablo 3-8. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) II. Deney Sonuçları 79
Tablo 3-9. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) III. Deney Sonuçları 79
Tablo 3-10. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) Üç Deney Ortalama Sonuçları 80
Tablo 3-11. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi I. Deney Sonuçları 82

Tablo 3-12. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi II. Deney Sonuçları 82
Tablo 3-13. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi III. Deney Sonuçları..... 83
Tablo 3-14. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi Üç Deney Ortalama Sonuçları 83
Tablo 3-15. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) I. Deney Sonuçları 85
Tablo 3-16. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) II. Deney Sonuçları 85
Tablo 3-17. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) III. Deney Sonuçları 86
Tablo 3-18. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin P. aeruginosa Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) Üç Deney Ortalama Sonuçları 86
Tablo 3-19. En Yüksek 4 Doz (Tob, Mem, Cip-64, 32, 16, 8) (F, Ea- 512, 256, 128, 64) OD Karşılaştırması 87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. *P. aeruginosa*'nın Gram boyaması sonrası mikroskop görüntüsü [29] 9
Şekil 2-2. Tryptic soya agarda *P.aeruginosa* kolonileri (Çalışmamızdan) 9
Şekil 2-3. *P.aeruginosa* kayma hareketi (https://en.wikipedia.org/wiki/Swarming_motility sitesinden alınmıştır) 20
Şekil 2-4. *P.aeruginosa* yüzme hareketi [58] 21
Şekil 2-5. *P. aeruginosa* titreme hareketi (https://aem.asm.org/content/aem/) 21
Şekil 2-6. *P. aeruginosa* biyofilmi (https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/pseudomonas-aeruginosa-biofilm.html) 28
Şekil 2-7. Biyofilm oluşum basamaklarının şematik görüntüsü (https://aqua-tech.ca/2016/01/biofilm-in-spas/) 30
Şekil 2-8. Tüp yöntemiyle biyofilm oluşumunun saptanması (Çalışmamızdan) 45
Şekil 2-9. Kongo kırmızı agarda biyofilm oluşumunun gözlenmesi 46
Şekil 2-10. Kristal viyole yöntemi ile mikroplaklarda biyofilm oluşumunun saptanması (Çalışmamızdan). 47
Şekil 2-11. Elajik asitin kimyasal yapısı 58
Şekil 3-1. *P. aeruginosa* biyofilminde kristal viyole mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespiti 70
Şekil 3-2. *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun kristal viyole doğrulanması ve ELISA reader'da OD ölçümü ile değerlendirilmesi 70
Şekil 3-3. *P. aeruginosa*' nın oluşturduğu biyofilm üzerine Tobramisin (TOB), Siprofloksasin (CIP), Meropenem (MEM) antibiyotiklerinin ve Furanon (F) ve Elajik Asit (EA) doğal bileşiklerinin karşılaştırmalı olarak inhibisyon etkisinin belirlenmesi 71
Şekil 3-4. *P. aeruginosa* biyofilminin antimikrobiyallerle muamele edildikten sonra kristal viyole yöntemi ile boyanması 71
Şekil 3-5. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın eğrileri 77
Şekil 3-6. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın diyagram olarak gösterilmesi 77
Şekil 3-7. *P. aeruginosa* oluşturduğu Biyofilm Üzerine Hücre Canlılık Testi (MTT) yöntemi ile Tobramisin, Siprofloksasin, Meropenem antibiyotikleri ile Furanone, Elajik Asit doğal bileşiklerinin İnhibisyon Etkisinin Karşılaştırmalı Olarak Tespiti 78

Şekil 3-8. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın Hücre Canlılık Testi (MTT) eğrileri 80
Şekil 3-9. Eradikasyon plağının inkübasyon sonrasında görünümü 81
Şekil 3-10. *P. aeruginosa* biyofilminin antibiyotikler ve doğal bileşikler ile muamele edildikten sonra eradikasyon plağının Kristal viyole yöntemi ile boyanması 81
Şekil 3-11. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın eğrileri 84
Şekil 3-12. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın diyagram olarak gösterilmesi 84
Şekil 4-13. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin P. aeruginosa Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın Hücre Canlılık Testi (MTT) eğrileri 87

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAC :Asetiltransferaz

AHL : Açil Homoserin Lakton

AI : Otoindüktör

ANT : Nükleotidiltransferaz

AMP : Antimikrobiyal Peptidler

ATCC : American Type Culture Collection

APH : Aminoglikosit Fosfotransferaz

BHI : Beyin kalp infüzyonu

CIP : Siprofloksasin

CLSI : Klinik Laboratuvar ve Standartlar Enstitüsü

CLSM : Konfokal Lazer Tarama Mikroskopi

CRA : Kongo Kırmızı Agar yöntemi

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EA : Elajik Asit

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EUCAST: Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi

EPS: Hücre Dışı Polimerik Madde

ETT : Endotrakeal Tüpler

Exo A : Ekzoenzim A

Exo S : Ekzoenzim S

Exo T : Ekzoenzim T

Exo Y : Ekzoenzim Y

F : Furanon

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

HSL : Homoserin Lakton

İYE : İdrar Yolu Enfeksiyonu

KAE : Kan Akımı Enfeksiyonu

KF : Kistik Fibrozis

kob: Koloni Oluşturan Birim

KV : Kristal Viyole

LPS : Lipopolisakkarit

MBEK : Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu

MBİK : Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu

MEM : Meropenem

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MTT : Metiltiazol Difenil Tetrazolyum Testi

Mg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

mg : Miligram

mL : Mililitre

NIH : Ulusal Sağlık Enstitüleri

OD : Optik Dansite

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PQS : Pseudomonas kinolon sinyali

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribo Nükleik Asit

SEM : Taramalı Elektron Mikroskopi

TCP : Doku Kültürü Plakası

TEM : Transmisyon Elektron Mikroskopi

TM : Tüp yöntemi

TOB : Tobramisin

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

VİP: Ventilatörle İlişkili Pnömoni

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

^{o}C : Santigrat Derece

QS : Quorum Sensing

QSI : Quorum Sensing İnhibitörleri

QQ : Quorum Quenching

ÖZET

AKSU, Ö. (2020). **'**Furanon C30 Ve Elajik Asit C11'in *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilminin Üzerine İnhibitör Etkisinin Tobramisinin Etkisi İle Karşılaştırılması'. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Pseudomonas aeruginosa, sağlıkla ilişkili enfeksiyonlarin önemli bir nedenidir. Doğada yaygın olarak bulunması, çok çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları kullanması, biyofilm oluşturma yeteneği gibi özelliklerini tedavisini zorlaştırmaktadır. Antimikrobiyal direncin artması, yeni antibiyotiklerin azlığı düşünüldüğünde, dirençli bakterilerle savaşmak için yeni antimikrobiyal tedaviler gereklidir. Bu sebeple çalışmamızda *P. aeruginosa* biyofilmini kontrol etmek için gereken optimum tedavi stratejisinin bulunması amaçlanmıştır.

P. aeruginosa ile 96 kuyucuklu plaklarda in vitro biyofilmler oluşturuldu. Biyofilmlerde elajik asit C11 (EA), furanon C30 (F) ve tobramisin (TOB), siprofloksasin (CIP) ve meropenemin (MEM) inhibisyon ve eradikasyon etkilerine bakıldı. Kristal viyole yöntemi ile canlı/ölü mikrobiyal hücreler belirlendi. Hücre canlılık testi (MTT) kullanılarak biyofilm tabakasındaki canlı mikrobiyal hücreler belirlendi.

Çalışmamız sonucunda verilerin istatiksel analizinde kullanılan her bir antibiyotiğin ve doğal bileşiklerin en yüksek 4 dozlarındaki OD karşılaştırıldığında; CIP etkisi anlamlı bir farkla MEM'den daha yüksek ($p=0.01$) saptanmıştır. TOB, MEM, CIP ve F etkileri EA'dan anlamlı bir farkla daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.001$). F ise diğer antibiyotiklerle kıyaslandığında etkinlik yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır. Negatif kontrole göre değerlendirildiğinde özellikle eradikasyon deneylerinde F'nin TOB, CIP, MEM ve EA'den daha etkili, EA'in ise TOB, CIP, MEM ve F'den daha düşük etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Fakat istatistiksel analizde bu fark anlamlı bulunmamıştır.

Bu sonuçlar bize, özellikle yüksek doz antibiyotik gereksimini duyan dirençli bakterilerde antibiyotiklerin toksik etkilerinden korunmak için furanon biyofilme karşı savaşmak için umut veren yeni bir doğal alternatif tedavi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi desteklemek için daha geniş çaplı araştırmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, Elajik asit, Furanon, Antibiyotikler, Biyofilm inhibisyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33645

ABSTRACT

Aksu, O. (2020). 'The Comparison With Effect of Tobramycin of The Inhibitory Effect Of Furanon C30 And Elagic Acid C11 On *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm'. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Microbiology Department. Master Thesis. İstanbul.

Pseudomonas aeruginosa is a major cause of health-related infections. Its widespread presence in nature, its use of various antibiotic resistance mechanisms, its ability to form biofilms make it difficult to treat. We aimed to find the optimum treatment strategy required to control *P. aeruginosa* biofilm.

In vitro biofilms were formed with *P. aeruginosa* in 96-well plates. Inhibition and eradication effects of elagic acid C11 (EA), furanone C30 (F) and tobramycin (TOB), ciprofloxacin (CIP), meropenem (MEM) were evaluated in biofilms. Living/dead microbial cells were determined using the crystal violet method. Living microbial cells in the biofilm layer were determined using the cell viability test (MTT).

As a result, when the OD in the highest 4 doses of each antibiotic and natural compounds used in the statistical analysis of the data were compared; CIP effect was found higher than MEM with a significant difference ($p = 0.01$). TOB, MEM, CIP and F effects were significantly higher than EA ($p = 0.01$, $p = 0.01$, $p = 0.01$, $p = 0.001$, respectively. F is compared with other antibiotics, no significant difference was found. According to negative control, it has been determined that F is more effective than TOB, CIP, MEM and EA, and EA has less effect than TOB, CIP, MEM and F especially in eradication experiments. However, this difference was not found significant in statistical analysis.

These results suggest that it can be used as a promising new natural alternative therapy to fight furanone biofilm to avoid the toxic effects of antibiotics in resistant bacteria that need high doses of antibiotics. More extensive research is needed to support this hypothesis.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Ellagic Acid, Furanone, Tobramycin, Biofilm inhibition

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No.: TYL-2019-33645

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonadaceae familyasına ait hareketli, çubuk şeklinde, aerobik, sporsuz, fırsatçı patojenik bir Gram negatif bakteridir [1].

Hastane enfeksiyonlarına neden olan, en sık karşılaşılan ve aynı zamanda birçok antibiyotiğin etkisinden kaçabilen altı bakteriyel patojeni (Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* and *Enterobacter* spp.,) ilk kez Rice bir grup altında toplayarak "ESKAPE" terimi ile simgeleştirmiştir. *P. aeruginosa*' da bu grupta yer almaktadır. Çalışmalar göstermektedir ki ESKAPE kökenleri özellikle yoğun bakım ünitesindeki hastaların %40'ından fazlasının enfekte olmasına neden olmaktadır [2] [3] [4], [5] [6].

P. aeruginosa, immün sistemi baskılanmış hastalarda kistik fibroz, yanık yarası ve HIV ile maksimum morbidite ve mortaliteye sebep olan ikincil enfeksiyonların ana sebebi olarak bilinmektedir. Totalde nozokomiyal enfeksiyonların % 57' sinden sorumlu, klinik olarak da oldukça önemli bir patojendir [7].

P. aeruginosa, çeşitli antibiyotik sınıflarına doğal olarak dirençli olduğu için terapötik seçenekleri de sınırlandırmaktadır. Ayrıca edinilmiş veya mutasyonel direnç sebebiyle de daha da sorunlu bir patojen haline gelmektedir [8]. Bunlara ek olarak *P. aeruginosa*' nın patogenezinde flagella (kirpik), pili (fimbriya), lipopolisakkarit (LPS) ve aljinat gibi virülans faktörleri yapışmayı kolaylaştırır, konakçı hücre yollarını modüle eder veya bozar ve hücre dışı matrisi hedef alır [9].

Antibiyotikler her zaman 20. yüzyılın harika keşiflerinden biri olarak görülmüştür. Bu doğru, ancak asıl sorun, onların hastanelerde, topluluklarda ve çevrede kullanımları ile birlikte dirençlerinin artmasıdır. İnsanların aşırı antibiyotik kullanımı, hem klinik, hem tarımsal veya başka bir şekilde uygulamaya sokulan her antibiyotiğe karşı mikroplar olağanüstü genetik kapasiteleri sayesinde, birden fazla direnç mekanizması geliştirmek için çeşitli gen aktarım mekanizmasından yararlanmaktadır. Bu şekilde dirençli bakterilerin hızla ortaya çıkması, tıbbı dönüştüren ve milyonlarca hayatı kurtaran antibiyotiklerin etkinliğini tehlikeye atmaktadır. Antibiyotiklerin terapötik uygulamalarının tam olarak eski haline döndürülmesini sağlamak için,

antibiyotik direncinin artmasında çevresel mikrobiyomların rolü hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. Özellikle, yeni antibiyotiklerin keşfi ya da farklı alternatifler geliştirilmesi ve bunların tedaviye hızlandırılmış ve kontrollü girişine yönelik yaratıcı yaklaşımlar zorunlu hale gelmiştir [10].

P. aeruginosa enfeksiyonu için kullanılan antibiyotik tedavisi, tekli β-laktam antibiyotik veya tobramisin ya da seftazidim ile kolistinin kombinasyon terapisini içermektedir. Aynı zamanda, β-laktamlara karşı oluşan yüksek düzeyde alerji oluşumu ve dirençli bakterilerin ortaya çıkması gibi sorunlar, bu antibiyotiklerin *P. aeruginosa* enfeksiyonları için kullanımını sınırlandırmaktadır [7].

Günümüzde çoklu antibiyotik direncine sahip olan patojen bakterilere çok sık rastlanmaktadır, bu yüzden bakterilerin direnç geliştiremeyeceği yeni stratejilerin belirlenmesine yönelik araştırmalar hız kazanmaya başlamıştır. Bu stratejilerin en önemlilerinden biri de bakteriler arası iletişim (quorum sensing) mekanizmasının engellenmesi olarak bilinmektedir [11].

Uzun yıllar ökaryotik organizmalardan farklı olarak bakterilerin kendi kendine yeten bireyler gibi davrandıklarına ve kesinlikle tek hücreli bir yaşam tarzı sürdürdüklerine inanılmaktaydı. Son yıllarda, birçok bakterinin, bakteri hücrelerinin küçük yayılabilir sinyal molekülleri ürettiği, algıladığı ve bunlara yanıt verdiği quorum sensing adı verilen bir mekanizma aracılığıyla çeşitli fizyolojik süreçleri ve grup faaliyetlerini düzenlediği bulunmuştur [12]. Bu konuda giderek artan incelemeler, bunun bakteriyel sosyal aktiviteler, biyofilm oluşumu ve bulaşıcı hastalıklardaki rollerini vurgulamaktadır [12].

Bakterileri antibiyotik kullanarak doğrudan öldürmek yerine aralarındaki haberleşme sistemini inhibe ederek etkisiz hale getirmenin patojenlerin tedavisinde oldukça etkili olacağı düşünülmektedir. [13]

P. aeruginosa, sadece antibiyotik direnç oranları nedeniyle değil, aynı zamanda biyofilm oluşumu ve çoklu virülans faktörlerinin üretimi nedeniyle de oldukça patojen bir bakteridir [14]. Kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi, esas olarak *P. aeruginosa*'nın enfeksiyon süreci sırasında kendi kendine üretilen bir polimerik matriks içinde kaplanmış yapılandırılmış bakteri toplulukları olan biyofilmler oluşturma kapasitesinden kaynaklanmaktadır [15].

Çünkü biyofilmler bakterilere antimikrobiyal ajanlardan kaçmanın başka bir yolunu sağlayarak ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır [16].

Biyofilmler, oldukça inatçı enfeksiyonlara sebep olan ve daha uzun hastanede kalış sürelerine, tekrarlayan enfeksiyonlara ayrıca ölümlerin artmasına yol açabilen karmaşık, üç boyutlu bakteri topluluklarıdır [17].

P. aeruginosa' nın biyofilm oluşturma eğilimi, onu antibiyotiklerden ve konakçı bağışıklık sisteminden korumakta, çok sayıda antibiyotiğe doğal dirençli olması ve diğerlerine de zamanla direnç kazanması nedeniyle tedaviyi de oldukça zor bir hale getirmektedir. *P. aeruginosa*, bulaşıcı süreç sırasında da güçlü bir enflamatuar tepkiye neden olmaktadır [9].

Bütün bu sorunlardan dolayı *P.aeruginosa* enfeksiyonunu daha etkili bir şekilde iyileştirebilmek amacıyla QS inhibitör ajanların kullanılması gibi alternatif stratejilere odaklanılmıştır [7].

Biyofilm inhibitörleri, mikroorganizmaya antibiyotik erişimini daha kolay bir hale getirerek antibiyotik adjuvanları olarak da kullanılabilir ve böylece tedavinin etkinliği arttırabilir [17].

Bakteriyel büyümeyi etkilemeden QS kontrollü patojenisitenin seçici inhibisyonu, *P. aeruginosa*'nın iyi bilinen ve yaygın ilaç direncinin üstesinden gelmek için umut verici bir stratejiyi temsil edebiliceği düşünülmektedir [18].

Bitki kaynaklı bileşikler, mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek için uzun süredir kullanılmaktadır ve insan tüketimi için güvenli oldukları varsayılmaktadır. Bitkilerden türetilen bu bileşiklerin, QS sistemine müdahale ederek bakteriyel patogenezi zayıflatan ve patojenik bakterilerin canlılıklarını etkilemeden virülan olmayan hale getiren bileşiklerin keşfini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir [7]. Son gözlemler, birçok doğal bitki fenolik ürününün biyofilm oluşumunu inhibe edebileceğini ve anti-biofouling potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir [19]. Çeşitli meyveler, narlar ve kurutulmuş meyvelerde yüksek miktarda bulunan Elajik asit (EA)'in [20] Rh1R ve LasR sinyal sistemlerini bozduğu ve aynı zamanda virülans faktörlerinin üretimini azalttığı gözlenmiştir [21].

Deniz yosunu Delisea pulchra tarafından salgılanan bromlu furanonlara bugüne kadar dirençli hiçbir bakteri tespit edilmemiştir. Ayrıca sentetik furanon C-30'un, fare

pulmoner enfeksiyon modelinde QS sinyalini ve *P. aeruginosa* virülansını azalttığı gösterilmiştir [22].

Yapılan çalışmalarda, geleneksel antibiyotiklerin, düşük konsantrasyonlarda, bakterilerde fenotip değişikliğine ve böylece de biyofilm oluşumuna sebep olabileceği gösterilmiştir. Antimikrobiyallerin biyofilm oluşumu üzerinde oluşturduğu klinik etkilerin anlaşılması, biyofilm enfeksiyonlarında uygun olmayan tedavilerin kullanımından kaçınmak için oldukça önemlidir [23].

Bütün bu bilgiler ışığında çalışmamızda *P.aeruginosa* biyofilmini tedavi etmek için doğal bileşikler olan Furanon ve Elajik asit kullanılmıştır. Çevresel streslerden kaynaklanan patojenlerin biyofilm aracılı koruması, dünya çapındaki en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir. Antimikrobiyal direncin artması ve yeni antibiyotiklerin azlığı göz önüne alındığında, dirençli bakterilerle savaşmak için yeni antimikrobiyal tedaviler gerekmektedir. Bu da araştırmacıları diğer alternatif yaklaşımları aramaya teşvik etmektedir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* biyofilmini kontrol edebilmek için gereken optimum tedavi stratejisinin bulunması amaçlanmıştır.

Bu nedenle, bu çalışmada in vitro modelde *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine furanon C30, elajik asit C11 ve antimikrobiyallerin inhibisyon ve eradikasyon potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır ve aynı zamanda biyofilmlerdeki bakteriyel populasyon dinamiklerini kontrol etmede antimikrobiyallerle karşılaştırılmalı olarak birlikte elajik asit C11 ve furanon C30 rolü kapsamlı bir şekilde gözden geçirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Tarihçe

1850'de Fransız askeri cerrah olan Sédillot, yaralı askerlerin yaralarında mavi irin oluşumunu gözlemlemiştir ve bu oluşumu ilk kez 1882 yılında *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırılmıştır. *P. aeruginosa,* 1882 yılında Gessard tarafından ilk kez mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır [24]. 1900 yılında, Yunanca'da "pseudos" yalancı ve "monas" birim anlamına gelen kelimelerin bir araya gelmesi ile *Pseudomonas* olarak adlandırılmış ve bu şekilde benimsenmiştir [25] [26].

P. aeruginosa, Pseudomonad olarak da bilinen Pseudomonas türüdür. Pseudomonas, büyük ve önemli bir Gram negatif organizmalar grubudur. Sporsuz, aerobik, düz veya hafif kavisli çubuklar şeklinde, 0.5-0.8 μm, 1.5-3.0 μm ölçülerinde ve oksidaz pozitiftirler. Ribozomal RNA homolojisine dayanarak, Pseudomonas türleri beş gruba ayrılmaktadır ve bu sınıflandırmaya göre *P. aeruginosa* rRNA grup I'de yer almaktadır [27]. (Tablo 2-1)

P. aeruginosa genellikle nemli ortamlarda bulunmaktadır ve su ve toprakta olduğu kadar meyveler, sebzeler ve çiçeklerde de bulunabilir [28]. Doğada yaygın olarak bulunan ve özellikle hastanelerde nemli ortamlarda sık sık rastlanan bir mikroorganizmadır [29]. Sağlıklı bireylerde nadiren hastalığa neden olsa da, özellikle kanser ve yanıklar gibi altta yatan ciddi hastalıkları olan hastalar ile hastanede yatan hastalar için büyük bir tehdit unsuru olduğu bilinmektedir. Bu enfeksiyonlarla ilişkili olan yüksek mortalite, zayıf konakçı savunmalarının, antibiyotiklere karşı, hücre dışı bakteriyel enzimlerin ve toksinlerin üretimi gibi nedenlerle meydana gelen bakteri direnci ile baş edememesinden kaynaklanmaktadır [30].

P. aeruginosa, insanlarda geniş bir enfeksiyon spektrumu ile ilişkili çok yönlü bir patojendir. Sağlık bakım ortamlarında bakteri, yanık veya nötropenisi olanlar veya yoğun bakım alanları da dahil olmak üzere savunmasız bireylerde önemli bir enfeksiyon nedeni olarak bilinmmektedir. Bu gruplarda *P. aeruginosa* enfeksiyonuna bağlı morbidite ve mortalite yüksek olabilmektedir [8].

Aynı zamanda *P. aeruginosa*, kistik fibrozis, yanık yarası ve HIV ile bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda maksimum morbidite ve mortaliteye neden olan ikincil enfeksiyonların ana nedeni olarak bilinmektedir. Toplam nozokomiyal enfeksiyonların % 57' sinden sorumlu tutulmaktadır. Klinik olarak oldukça önemli fırsatçı bir patojendir [7].

Bununla birlikte *P. aeruginosa* birçok antimikrobiyal maddeye doğal olarak direnç gösterdiği için enfeksiyonların yönetimi de oldukça zordur [8]. Bu doğal direnç, doğal Gram negatif hücre duvarı yapısından ve transplantasyonda kullanılan medikal cihazların metalik yüzeyleri üzerinde koruyucu biyofilmler oluşturma eğiliminden kaynaklanmaktadır [27].

Tablo 2-1. Klinik olarak önemli *Pseudomonas*'ların gruplandırılması [29].

	rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu	Cins ve Tür
I	Floresan Grubu	*P. aeruginosa* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*
	Non Floresan Grubu	*Pseudomonas stutzeri* *Pseudomonas mendocina*
II		*Burkholderia pseudomallei* *Burkholderia mallei* *Burkholderia cepacia* *Cupriavidus* *Delftia* *Pandoraea* *Ralstonia picketti*
III		*Comamonas* türleri *Acidovorax* türleri
IV		*Brevundimonas* türleri
V		*Stenotrophomonas maltophilia* *Xanthomonas* türleri

Pseudomonadların sınıflandırılması, rRNA / DNA homolojisine ve ortak kültür özelliklerine dayanmaktadır. Pseuodomonas' lar I, II, II, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır. *P. aeruginosa* rRNA grup I 'e dahil olmuştur [29].

2.1.2. Morfoloji ve İdentifikasyon

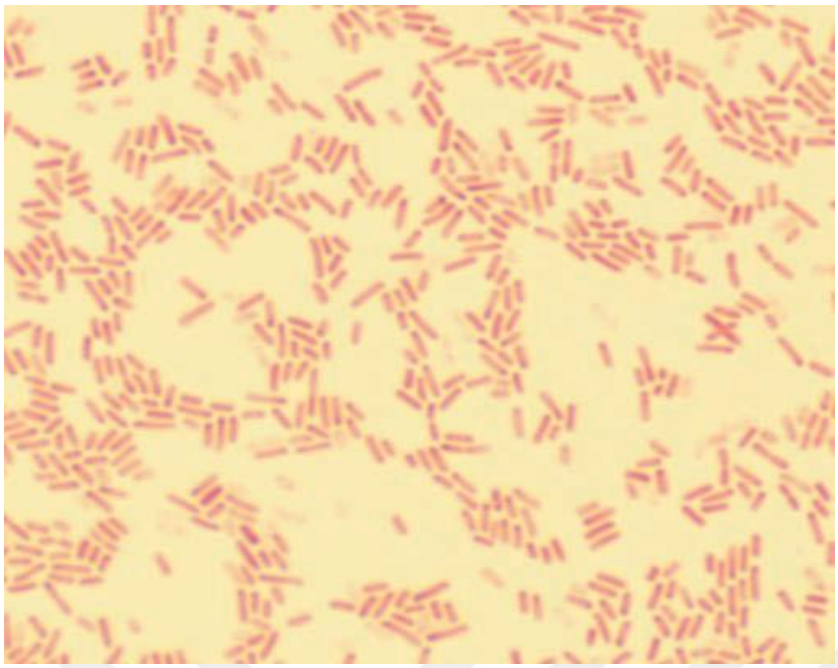
P. aeruginosa, yaklaşık, 0.5-0.8 µm, 1.5-3.0 µm ölçülerinde hareketli,sporsuz,kapsülsüz ve çubuk şeklinde bir bakteridir [29].

Gram negatiftir ve tekli bakteriler halinde, çiftler halinde bazen de kısa zincirler halinde ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda *P. aeruginosa*, birçok kültür ortamında kolayca üreyebilen zorunlu aerob bir bakteridir [29]. Anaerobik büyüme sadece nitrat veya arjinin gibi alternatif bir terminal elektron alıcısının varlığında mümkün olabilmektedir [25].

Sedefli bir görünüme ve üzüm benzeri bir kokuya sahiptir. *P. aeruginosa* , en iyi 25^{o} C ile 37^{o} C arasında üremektedirler ve 42^{o} C de üreme yeteneği onu floresan grubundaki diğer birçok Pseudomonas türünden ayırmaya yardımcı olmaktadır [31].

P. aeruginosa, floresan yeşilimsi renkte pürüzsüz yuvarlak koloniler oluşturur. Genellikle agar içine difüze olan floresan olmayan mavimsi pigment piyosiyanin üretir. Diğer Pseudomonas türleri ise piyosiyanin üretmez. Birçok *P. aeruginosa* suşu agara yeşilimsi bir renk veren floresan pigment pyoverdin üretir. Bazı suşlar koyu kırmızı pigment pyorubin veya siyah pigment piomelanin üretir. Bir kültürde *P. aeruginosa* çoklu koloni tipleri üreyebilir. Farklı koloni tiplerinden *P. aeruginosa* farklı biyokimyasal ve enzimatik aktivitelere ve farklı antimikrobiyal duyarlılık modellerine sahip olabilir. Karbonhidratları fermente etmez, ancak birçok suş glikozu oksitler [29]. İndofenol oksidaz testinde pozitiftir ve Simmon'un sitrat testi pozitif, L-arginin dehidrolaz pozitif, L-lizin dekarboksilaz negatif ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir [28].

Tanımlama genellikle koloni morfolojisi , oksidaz pozitifliği, karakteristik pigmentlerin varlığı ve 42 ° C'de büyümeye dayanmaktadır [29].



Şekil 2-1. *P. aeruginosa*'nın Gram boyaması sonrası mikroskop görüntüsü [29]



Şekil 2-2. Tryptic soya agarda *P.aeruginosa* kolonileri (Çalışmamızdan)

2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Epidemiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa, ilk olarak 1882'de Gessard tarafından yeşil cerahatten izole edilmiştir. *P. aeruginosa*' nın her yerde var olabilen yaşam tarzı, bu bakterinin insanlarda sık sık enfeksiyonlara sebep olmasına katkıda bulunmaktadır. Toprağın birincil yaşam alanı olduğu, oldukça uyumlu bir bakteridir; aynı zamanda *P. aeruginosa* su ortamlarında da hayatta kalabilmektedir. Birçok yaygın antimikrobiyal ajana karşı içsel ve edinilmiş direncinden dolayı *P. aeruginosa,* el kremleri, lavabolar ve bazı temizleme çözeltilerinden izole edilebilir [32]**.** *P. aeruginosa* nemli ortamlarda geliştiği için, lavabolara, su banyolarına, duşlara ve diğer ıslak alanlara da özellikle dikkat edilmelidir [29].

P. aeruginosa marul, domates ve tütün bitkilerini etkileyen önemli bir bitki patojenidir. Tatlı su ortamlarında (akarsular, göller ve nehirler) ve solunum ekipmanlarında da bulunabilmektedir. İnsanlar *P. aeruginosa'*yı bu tür kaynaklardan alabilir; ancak yapısı bozulmamış epitelyuma iyi yapışmaz. Yani normal bağırsak florasının bir parçası olarak vücudumuzda bulunabilir. Sağlıklı bir bağışıklık sistemi ile biraraya geldiğinde enfeksiyona sebep olmadığı bilinmektedir [32]. *P. aeruginosa* bazı sağlıklı kişilerin derisinde bulunmaktadır. *P. aeruginosa* hastane içinde çok sayıda rezervuarda (dezenfektanlar, solunum ekipmanı, yiyecekler, lavabolar, musluklar ve paspaslar,…) bulunur. Yayılma hastadan hastaya hastane personelinin ellerinden, kontamine rezervuarlarla doğrudan hasta teması ve kontamine yiyeceklerin yenilmesi ve kontamine suyun içilmesi ile meydana gelmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar için serolojik, faj, piyosin ve DNA parmak izi gibi birkaç farklı tipleme sistemi mevcuttur [30].

Piyosin sisteminde, test suşu tarafından üretilen piyosinler (bakteriyosinler veya aeruginokinler) bir dizi indikatör suşuna karşı bakterisidal aktivite açısından deneye tabi tutulmaktadır. Bir dizi farklı serolojik tipleme sistemi kullanılmaktadır. Bazıları ısıya dayanıklı ve ısıya dayanıksız antijen kombinasyonları kullanırken, diğerleri sadece ısıya dayanıklı antijenleri kullanmaktadır. Hiçbir sistem evrensel olarak kabul edilmemektedir. Son zamanlarda, DNA parmak izi, *P. aeruginosa* suşlarının yazılmasında faydalı probları tanımlamıştı [30].

Altta yatan hastalıklar nedeniyle bağışıklık sistemi zayıf olan veya hastane ortamına maruz kalan hastalar, *P. aeruginosa* enfeksiyonuna yatkındır. Yatkınlığı olan

hastalarda *P. aeruginosa* ile kolonizasyon sıklıkla invaziv enfeksiyondan önce gelmektedir [27].

P. aeruginosa' nın etken olduğu enfeksiyonların çoğu hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonlardır. *P. aeruginosa*'nın bazı bulaşıcı suşları hastane ortamlarına endemik olarak görülmektedir [27].

2.1.4. Patogenez

Bakteriyel enfeksiyonun patogenezi, bulaşıcı sürecin başlaması ve hastalığın belirti ve semptomlarının gelişmesine yol açan mekanizmaları içermektedir. Patojen bakteriler bulaşabilirlik, konakçı hücrelere yapışma, kalıcılık, konakçı hücrelerin ve dokuların istilası, toksijenisite ve konakçının bağışıklık sisteminden kaçma veya hayatta kalma kabiliyetlerine sahiptirler. Antimikrobiyallere ve dezenfektanlara direnç, virülansa veya bir organizmanın hastalığa neden olma kapasitesine de katkıda bulunabilmektedirler [33].

Patojenik mikroorganizma; virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoa vb. olabilir ve insanları veya hayvanları doğrudan veya dolaylı yollarla enfekte eder. Patojenite, mikroorganizmanın konakçı organizmada hastalık yapabilme yeteneğidir. Mikroorganizmalar, patojenite derecesini ifade eden bir terim olan virülansları aracılığıyla ifade etmektedirler. Bu nedenle, bir patojenin virülansının belirleyicileri, bir konakçıda hastalık oluşturmasını sağlayan genetik, biyokimyasal veya yapısal özelliklerinden biridir [34].

P. aeruginosa enfeksiyonu, bakteriyel bağlanma, kolonizasyon, invazyon ve yaygın sistemik hastalık olmak üzere birkaç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamaların her birinin birden fazla sonuçları olabilmektedir [35].

P. aeruginosa'nın patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynamaktadır. İnfeksiyonların ilk basamağı kolonizasyondur, konak savunmasının bozulduğu ve bağışıklık yanıtın yeterli olmadığı zamanlarda bu kolonizasyon çoğunlukla enfeksiyona sebep olmaktadır [36]. Giriş genellikle solunum sistemine inhalasyon yolu ile olmaktadır [37].

P. aeruginosa mukoza zarlarına veya cilde yapışarak kolonize olur, bu bölgeleri lokal olarak işgal eder ve sistemik hastalık üretir. Bu süreç, pili, enzimler ve toksinler tarafından desteklenmektedir. Lipopolisakkarit ateş, şok, lökositoz ve lökopeni, yaygın

intravasküler pıhtılaşma ve yetişkin solunum sıkıntısı sendromuna neden olmada doğrudan rol oynamaktadır. *P. aeruginosa* ve diğer Psedoumonaslar birçok antimikrobiyal maddeye karşı dirençlidir ve bu nedenle normal mikrobiyotanın daha hassas bakterileri bastırıldığında baskın ve önemli hale gelmektedir [29].

2.1.5. *P. aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları

P. aeruginosa, çok çeşitli akut ve kronik enfeksiyonlara neden olabilen önemli nozokomiyal patojenlerden biridir [14]. *P. aeruginosa* enfeksiyonu ile ilişkili bir dizi klinik hastalık vardır. Bununla birlikte, *P. aeruginosa* yanık, kistik fibroz, lösemi, nakil, nötropeni, uzun süreli idrar sondası kullanımı olan ve ayrıca diyabetik hastalarını enfekte eden fırsatçı bir organizmadır [9].

P. aeruginosa akut ve kronik infeksiyon boyunca farklı virülans faktörleri üretmektedir [38]. *P aeruginosa*, pnömoni (hastane ve ventilatörle ilişkili), idrar yolu enfeksiyonları (İYE), kan dolaşımı enfeksiyonları ve yanıkla ilişkili deri enfeksiyonları dahil olmak üzere tüm nozokomiyal enfeksiyonların % 11.0 ila % 13.8'ini oluşturmaktadır [39].

P. aeruginosa, tipik olarak sağlıklı bir konakçıda enfeksiyona neden olmamasına rağmen, vücudun hemen hemen her yerinde enfeksiyona neden olabilir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına en duyarlı olan kişiler, mukoza zarları veya cildi tehlikeye girmiş olan kişilerdir [37].

Pseudomonas enfeksiyonları endokardit, solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyemi ve septisemi, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, dış otitis dahil kulak enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar ve cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, yara enfeksiyonları, piyoderma ve dermatite yol açabilmektedir [27].

2.1.5.1. *P. aeruginosa*'ya Bağlı Hastane Enfeksiyonu

P. aeruginosa, yoğun bakım hastaları arasında nozokomiyal pnömoninin ikinci en yaygın nedeni, idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) dördüncü en yaygın nedeni ve kan akımı enfeksiyonlarının (KAE) altıncı en yaygın nedeni olarak bilinmektedir [9].

2.1.5.2. Yanık Yara Enfeksiyonları

P. aeruginosa yanık hastalarında invaziv enfeksiyonların önde gelen nedenidir [9]. Yanık yüzeyinin nemli oluşu ve yaraya nötrofil girişinin yetersiz oluşu hastaların bu enfeksiyona yakalanmasına sebep olmaktadır[1]. Şiddetli yanık hastalarındaki tüm ölümlerin % 75'i invaziv yanık yara enfeksiyonundan sepsis ile bağlantılı olduğu bilinmektedir [9].

2.1.5.3. Bakteriyemi

1890' da bildirilen ilk *P. aeruginosa* enfeksiyonu vakasından bu yana, organizma bakteriyemi ile giderek daha fazla ilişkilendirilmektedir [30]. *P. aeruginosa* bakteriyemisi ile ilişkili yayınlanan toplam mortalite oranları % 20 ile % 50 arasındadır ve bu hastalar arasında karbapeneme dirençli *P. aeruginosa*'ya ait ölüm oranları % 8 ile % 18 arasındadır [40].

P. aeruginosa, nozokomiyal bakteriyeminin önde gelen beş nedeni arasındadır ve sıklıkla sepsise yol açmaktadır [9]. *P. aeruginosa* bakteriyemisinin mortalitesinin yüksek olma nedenleri, Pseuodomonas virülansı ve mikroorganizmanın bağışıklığı baskılanmış hastaları tutmasıdır [1].

Kardiyovasküler hastalık, kanser veya diyabetli hastalar, hastanede yatan hastalar ve özellikle mekanik respiratör kullanan hastalar *P. aeruginosa*'ya bağlı olarak pnömoni veya bakteriyemi için risk altındadır [37].

2.1.5.4. Hastaneye Bağlı Pnömoni

Yoğun bakım ünitelerindeki hastalar, kısmen invaziv cihazların varlığı ve kısmen de altta yatan hastalık ve komorbiditeler nedeniyle *P.aeruginosa* enfeksiyonu riski ile karşı karşıya kalmaktadır [8].

İnsan solunum yolu,özellikle *P. aeruginosa'*ya iyi adapte olabileceği uygun bir ortam sunmaktadır. *P. aeruginosa*, kistik fibrozis hastalarının akciğerinde ve akut nozokomiyal pnömonide kronik enfeksiyona sebep olabilecek bir yeteneğe sahiptir [9]. Solunum yollarının tutulumu, özellikle kontamine solunum cihazlarından, nekrotizan pnömoniye neden olmaktadır [29].

Bağışıklık sistemi bozuk olan hastaları , geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması sonucunda koruyucu bakteri topluluğunun ortadan kalkması ve

mikroorganizmayı alt solunum yoluna sunan mekanik cihazların kullanımı da enfeksiyona yatkın hale getirmektedir [1].

2.1.5.5. Ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP)

P. aeruginosa'nın yaygın olarak VİP'e neden olan birinci veya ikinci ana patojen olduğu bulunmuştur [41]. Bu hastalıkta en sık görülen çok ilaca dirençli olan etkendir ve *P. aeruginosa*'nın iyileşme hızı, mekanik ventilasyon süresi arttıkça artmaktadır [9].

2.1.5.6. Kistik fibrozis (KF)

P. aeruginosa, kistik fibrozis (KF) hastalarının akciğerlerini kolonize etmekte ve bu hastalarda kronik ilerleyen akciğer hastalığına ve yüksek mortaliteye neden olmaktadır [27]. Aynı zamanda solunum fonksiyonunun hızlı bir şekilde düşüşüne sebep olan fırsatçı bir patojendir. Kistik fibrozun (KF), Kafkas popülasyonunda oldukça yaygın ve hayatı kısaltan genetik hastalıklardan biri olduğu bilinmektedir. KF hastalığı, vücuttaki çoklu epitel yüzeylerde ozmotik dengeyi koruyan bir klorür ve bikarbonat iyonu taşıma kanalı olan kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisini (KFTİ) kodlayan bir gendeki mutasyondan kaynaklanmaktadır. KF uzun vadede diyabet, depresyon ve anksiyete gibi komplikasyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca akciğer yetmezliğinin hemen hemen tüm KF hastaları için kaçınılmaz bir son olmaya devam ettiği bilinmektedir [42].

KF hastaları tipik olarak hava yollarında baskın patojen olan *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kalıcı ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarına maruz kalmaktadır ve geç ergenlik döneminde KF hastalarının % 80'inin kronik olarak enfekte olduğu bilinmektedir [43].

Solunum örneklerinin kültürünü *P. aeruginosa* enfeksiyonu için serolojik taramayla birleştiren uzunlamasına bir çalışmada, KF hastalarının% 97,5' inin 3 yaşına kadar *P. aeruginosa* ile enfekte olduğu bulunmuştur [44].

Solunum kültürü *P. aeruginosa* için pozitif olan pediyatrik KF hastaları, *P. aeruginosa* kaynaklı olmayanlara göre daha yüksek mortalite, hastaneye yatış sıklığında artış ve azalmış akciğer fonksiyonu ve daha düşük ağırlık yaşar. Sınırlı sayıda çalışma, biyofilmlerin in vivo KF akciğerinde oluştuğu hipotezini desteklemektedir. *P. aeruginosa* ve diğer bakteriler tarafından in vitro hücreden hücreye iletişim için kullanılan çekirdek algılayıcı moleküllerin KF balgamındaki varlığı, KF hastaların

akciğerindeki *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturduğunun kanıtı olarak gösterilmiştir [43].

Aynı zamanda KF hastaları arasında *P. aeruginosa* ile çapraz enfeksiyon riski bildirilmiş ve bu kolonileşmemiş hastalar hastanelerde, KF merkezlerinde veya tatil kamplarında kronik enfekte hastalarla temas ettiğinde riskin en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir [26].

Akciğer transplantasyonundan sonrasında, *P. aeruginosa*, sinüslerin sıklıkla tekrarlayan akciğer enfeksiyonu için rezervuar görevi gördüğü KF hastaları için önemini korumaktadır [44].

Ayrıca kistik fibroz gibi altta yatan akciğer hastalığı, *P. aeruginosa* solunum yolu enfeksiyonları için predispozan bir faktördür [8].

2.1.5.7. Primer Idrar Yolu Enfeksiyonu

P. aeruginosa nedeniyle toplumda edinilen primer idrar yolu enfeksiyonu (İYE), anatomik anormallikleri ve omurilik yaralanmaları olan hastalar dışında nadir görülmektedir. İdrar yolu enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu nozokomiyal kökenlidir ve çoğu zaman uzun süreli kateterizasyonun sonucudur [26].

Bu organizma, tüm primer idrar yolu enfeksiyonlarının % 12'sini oluşturan, hastane kaynaklı İYE 'nin üçüncü önde gelen nedenidir [27].

P. aeruginosa, özellikle yüzeyle ilişkili biyofilmler oluşturmada uzman olan fırsatçı bir insan patojenidir ve *P. aeruginosa*, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur. Hastaneden edinilen diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi, kateter ilişkili İYE'ler tedavilere diğer İYE'lere göre daha dirençli olma eğilimindedir. Bunun nedeni, klinik olarak mevcut birçok antibiyotiğin biyofilmlere nüfuz edememesi, antimikrobiyal direnç sergileyen kalıcı enfeksiyonlara neden olarak tedavileri etkisiz hale getirmesidir. P. aeruginosa, üç hücre dışı polisakkaridi, PEL, PSL ve aljinatı kodlar ve in vitro biyofilmler oluşturmak için PEL ve PSL polisakkaritlerini kullanır; bununla birlikte, in vivo enfeksiyonlar sırasında bu polisakkaritlerin gerekliliği tam olarak anlaşılmamıştır. Bu enfeksiyonların büyük bir kısmı, sağlık bakım ortamlarında bulunan son seçenek ilaçlara direnç geliştirir. Tedavi edilemezse, İYE'ler ölümcül olabilen daha ciddi bir sistemik enfeksiyona - ürosepsis - yol açabilir. Ürosepsis vakalarının % 20-

30'unun idrar yolu enfeksiyonlarından geliştiği ve dünya genelinde ölüm oranının % 20-42 olduğu bulunmuştur [45].

2.1.5.8. Yabancı Cisim Enfeksiyonları

P. aeruginosa, implante edilmiş tıbbi cihazların yüzeylerinde biyofilm oluşturabilmektedir. Bu durumdan dolayı da antibiyotiklerle ve vücut savunma mekanizmalarıyla temastan kaçınmakta ve kolonizasyon, kronik veya tekrarlanan enfeksiyonlar ve tedavi girişimlerinin başarısız olması için fırsatlar yaratmaktadır [46].

P. aeruginosa tıbbi cihazlarda birden fazla kolonizasyona sebep olarak; ikincil nozokomiyal enfeksiyonları kolaylaştırmaktadır. Santral venöz kateterler ve endotrakeal tüpler (ETT'ler) üzerindeki biyofilmler, sırasıyla şiddetli kan kaynaklı enfeksiyonlara ve ventilatörle ilişkili pnömoniye (VİP) neden olmaktadır [47].

Biyofilm enfeksiyonlarının bulunabileceği kalıcı cihazlar intravenöz kateterler, vasküler protezler, protez kalp kapakları, idrar kateterleri, eklem protezleri ve ortopedik fiksasyon cihazları, periton diyaliz kateterleri ve rahim içi cihazları içermektedir [48].Ortopedik cihazlar da dahil olmak üzere yabancı cisim enfeksiyonlarının antimikrobiyal tedavisi, bakteriyel biyofilmlerin varlığından dolayı oldukça zordur. Biyofilm bakterilerinde rastlanan antibiyotik toleransı da antibiyotik tedavisini sınırlandırmaktadır. Gram negatif basiller, ortopedik cihazla ilişkili enfeksiyonların bilinen ikinci en yaygın nedenidir ve son yıllarda da insidansı artmıştır. *P. aeruginosa,* bu tür enfeksiyonlarda rol oynayan yaygın bir patojendir [49] ve sıklıkla kateterleri ve diğer tıbbi cihazları kolonize etmektedir [50].

Protezler, üriner / venöz kateter ve protez kalp kapakçıkları gibi yabancı cisimler biyofilm oluşumuna yatkın yüzeylerdir. Biyofilm oluşturulduktan sonra, antimikrobiyallerin kullanımı ve bağışıklık tepkisi enfeksiyonu ortadan kaldırmak için yeterli olmamaktadır. Bu durumlarda, tedavi için bakteri yoğunluğunu azaltmak ve kombine antibiyotik tedavisinin etkili olmasını sağlamak için tıbbi cihazın çıkarılması veya değiştirilmesi tavsiye edilmektedir [48].

Yoğun bakım ünitesindeki (YBÜ) hastalar diğer hastalardan daha fazla invaziv tıbbi prosedürlere ve cihazlara maruz kalmaktadırlar. Bu durum da dirençli *P. aeruginosa*'nın deri veya mukoza zarlarından girmesi ve tıbbi cihazların yüzeylerinde biyofilm oluşturması için bir fırsat yaratmaktadır [46].

Bunlara ek olarak hastane ortamında *P.aeruginosa'nın* uzun süre hayatta kalması, virülansını artırır ve hastane içinde enfeksiyonun yatay yayılmasını destekler. *P.aeruginosa'nın* neden olduğu enfeksiyonların tedavisi ve kontrolü zordur, bu da hastanede kalış süresinin uzamasına, ölüm oranının artmasına ve daha yüksek maliyetlere yol açmaktadır [46].

2.2. *P. aeruginosa* Hastalık Yapma Mekanizmaları

Virülans, bir organizmanın patojenliğinin ölçüsü olarak adlandırılmaktadır. Virülans derecesi, doğrudan organizmanın konakçı direnç mekanizmalarına rağmen hastalığa neden olma yeteneği ile ilgilidir; enfekte olan bakteri sayısı, vücuda giriş yolu, spesifik ve spesifik olmayan konak savunma mekanizmaları ve bakterinin virülans faktörleri gibi çok sayıda değişkenden etkilenmektedir [51].

2.2.1. Virülans Faktörleri

Virülans faktörleri, bakterilerin konağı istila etmesine, hastalığa neden olmasına ve konak savunmasından kaçmasına yardımcı olmaktadır [51].

P. aeruginosa son yıllarda artan insidansı, virülans faktörlerinin çeşitliliği ve artan antibiyotik direnciyle sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç infeksiyonların etkeni olarak görülmektedir [36].

P. aeruginosa virulanstan sorumlu birçok yapısal bileşen, toksin ve enzimlere sahiptir. Başlıca virulans faktörleri pilus, flagella, lipopolisakkarit, ekstrasellüler polisakkaridler, proteazlar, ekzotoksin A, enterotoksin, sitotoksin, ekzoenzimler, piyosiyanin, hemolizin, nöraminidazdır [26].

Hücre yüzeyinde yapısal bileşenlerden olup konak hücreye yapışmada önemli olanlar flagella (kirpik), pili (fimbriya), lipopolisakkarit (LPS) ve aljinattır. Bunlar *P. aeruginosa*' nın kolonizasyonunda etkilidir. Hücre dışına salgılananlar ise elastaz, alkalin proteaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A, ekzoenzim S ve T, piyosiyanin, piyoverdin gibi toksin ve enzimler olarak bilinmektedir [26].

Tablo 2-2. *P. aeruginosa* virülans faktörleri [37]

Virülans Faktörü	Fonksiyonu
Fimbria	Konak hücreye bağlanma ve proinflamatuvar gen ekspresyonunun aktivasyonu
Polar flagella	Hareket edebilme yeteneği, konak hücreye bağlanma, IL-8 aktivasyonu
Piyoverdin	Demiri bağlama
Elastaz, proteazlar hemolizinler ve lökosidin	Doku invazyonunda yardım ve konakçı hücrelerin lize edilmesi
Ekzotoksin A	Konakçı hücrelerde protein sentezini engeller ve organizmanın yayılmasına yardımcı olur
Tip III salgılama sistemi	Toksinleri (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) konakçı hücrelere enjekte eder
Lipopolisakkarit	Endotoksin
Aljinat	Serbest radikal tutucusu, fagositozu, nötrofil kemotaksisini ve kompleman aktivasyonunu inhibe eder.
QS molekülleri	Diğer psödomonal hücreler arasında genlerin ifadesini koordine eder ve biyofilm oluşumunu destekler.
ExoS	Tümör nekroz faktörü üretimini uyarır
ExoT	GTPaz active edilmesi
ExoU	Sitotoksin
ExoY	Adenylate siklaz aktivasyonu

2.2.1.1. Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virülans Faktörleri

Pili (fimbriae) hücre yüzeyinden uzanarak konak epitel hücrelerine bağlanmayı desteklemektedir [29].

Lipopolisakkarit bakteri duvarının dış membranının dış yüzeyinde bulunmaktadır. Lipid A ve buna bağlı olan kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşmaktadır [36]. Çoklu immünotiplerde bulunan lipopolisakkarit (LPS), organizmanın endotoksik özelliklerinin çoğundan sorumludur. *P. aeruginosa*, lipopolisakkarit immünotipi ve piyosin (bakteriyosin) duyarlılığı ile tiplendirilebilmektedir [29].

Flagella *P. aeruginosa*'nın yüzme hareketinden sorumlu olan yapıya verilen ad olarak tanımlanmaktadır [36].

Aljinat bakteri yüzeyinde kapsülde yer almaktadır ve mukoid ekzopolisakkarit yapıdadır. Organizmayı fagositoz ve antibiyotik etkisinden korumaktadır [1]. *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu solunum yolu infeksiyonlarında aljinat üretiminin çok önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [36].

2.2.1.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

Elastaz solunum yolu mukozasında epiteller arasındaki sıkı bağlantıları parçalayarak geçirgenlik artışını sağlar ve enfeksiyon bölgesinde nötrofillerin çoğalmasına sebep olur. Elastaz, fibronektini yıkar ve böylece mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak siliyer aktiviteyi engeller [52].

Alkali proteaz fibrin eritici etkiye sahiptir. *P. aeruginosa*'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. 49 kDa ağırlığında apr geni tarafından kodlanmaktadır. Akut akciğer hasarında erken dönemde alkali proteazın enfeksiyonun ilerlemesine etkili olduğu bildirilmiştir [36].

Piyosiyanin *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir. Yapılan çalışmalarda piyosiyaninin hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer solunum yolu epitelinin fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, toksik serbest radikallerin salgılanmasına neden olduğu saptanmıştır [36].

Piyoverdin bir siderofordur. *P. aeruginosa* metabolizması için çevreden demir bağlamayı sağlayan küçük bir moleküldür [53].

Proteaz IV patogenezde rol oynamaktadır. Özellikle *P. aeruginosa* keratinin patogenezine katıldığı bilinmektedir. Sürfaktan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı ile akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de rol oynadığı bildirilmiştir [36].

Fosfolipaz C ise hemolitik ve hemolitik olmayan olarak iki tipe ayrılır. *P. aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patogenezinde rol alır. Patojenik etkisinin bir kısmı sürfaktan inaktivasyonundan kaynaklanmaktadır [53].

Birçok *P. aeruginosa* suşu, doku nekrozuna neden olan ve saflaştırılmış biçimde enjekte edildiğinde hayvanlar için öldürücü olan ekzotoksin A üretir. Toksin, difteri toksinininkine benzer bir etki mekanizması ile protein sentezini engellemektedir [29].

Ramnolipit bir glikolipid biyosürfaktandır. Hemolitik etkilidir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki göstermektedir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirir. Böylece Fosfolipaz C'nin etki etmesine katkıda bulunur [53].

P. aeruginosa bir epitel hücresine bağlandığında, tip III sekresyon sistemi aktive olmaktadır. Bu temasa bağlı sistem, *P. aeruginosa*'nın belirli efektör proteinleri

doğrudan epitel hücresine enjekte etmesini sağlamakta, bu da değişmiş bağışıklık tepkileri, hücre hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır [44]. Tip III Sekresyon sistemi ile *P. aeruginosa* hedef hücre üzerinde porlar açmaktadır. Pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturulup ve bu köprü ile efektör proteinleri ökaryot hücre stoplazmasına iletilmektedir. Effektör proteinler aktin hücre iskeletini ve protein sentezini inhibe etmektedir. Tip III sistemi ile salınan toksinler; ekzoenzim S (exoS), ekzoenzim T (exoT), ekzoenzim Y (exoY) ve ekzoenzim U (exoU)'dur. [36] Bu ekzoenzimler arasında, en büyük virülanstan ExoU sorumlu olduğu düşünülmektedir. *P. aeruginosa*'da tip III sekresyon sisteminin ekspresyonu, pnömoni, sepsis ve solunum yetmezliği olan hastalarda artmış mortalite ile VİP'de daha şiddetli hastalık ile ilişkilendirilmektedir [44].

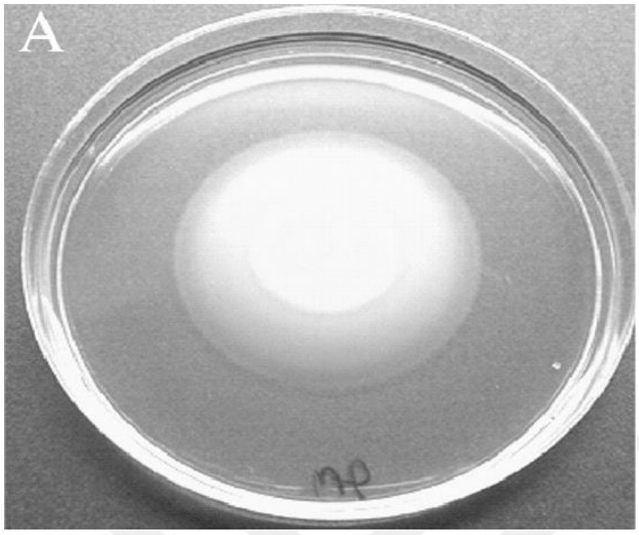
Hareket, *P.aeruginosa* gibi birçok bakteride hem çevre için hem de in vivo olarak yeni nişler aramanın ve hızla kolonileşmenin bir yolu olarak kritik bir davranış olarak bilinmektedir. Hareket birçok farklı biçim almaktadır ve hem makroskopik hem de mikroskobik seviyelerde gözlemlenebilmektedir [54].

P.aeruginosa polar monotrichous flagellum veya tip IV pili (TFP) aracılığıyla üç farklı hareket kabiliyetine sahiptir [55]. *P. aeruginosa*, yüzerek (swimming), kayarak (swarming) ve titreme (twitching) hareketleriyle hareket edebilmektedir. Kayma hareketi, yarı katı agar yüzeyler gibi viskoz ortamlarda gözlenebilen flagellaya bağımlı bir hareket şeklidir. Kayma hareketi oluşturmak için hücreler, morfolojik olarak hücre uzaması ve hiperflagellasyon ile karakterize edilen özel bir duruma farklılaşmaktadır [56].



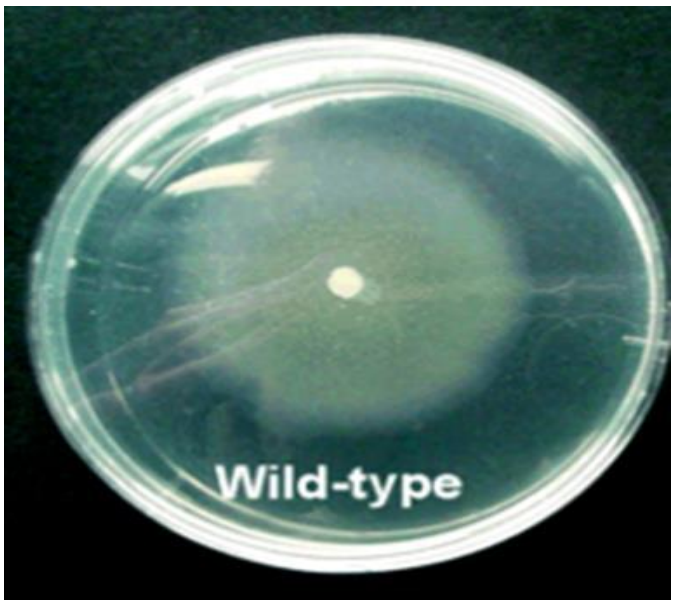
Şekil 2-3. *P.aeruginosa* kayma hareketi (https://en.wikipedia.org/wiki/Swarming_motility sitesinden alınmıştır)

Yüzme hareketi *P. aeruginosa*'da gözlenen flagellaya bağlı bir hareket şeklidir. Yüzme motilitesi, sıvı veya düşük viskoziteli koşullardaki (% 0,3 agar konsantrasyonuna kadar) hareket olarak tanımlanmaktadır [57]**.**



Şekil 2-4. *P.aeruginosa* yüzme hareketi [58]

Titreme hareketi (Twitching), yüzeylerde veya bir agar tabakası ile bir Petri kabı arasındaki gibi arayüzlerde meydana gelmektedir. Tip IV pilusun uzatılması ve geri çekilmesi, hücrenin kendisini yavaşça ileri doğru çekmesine izin vermektedir [54].



Şekil 2-5. *P. aeruginosa* titreme hareketi (https://aem.asm.org/content/aem/)

2.3. Laboratuvar Tanısı

Deri lezyonları, irin, idrar, kan, omurilik sıvısı, balgam ve diğer materyallerden elde edilen örnekler enfeksiyon bölgesine göre alınmalıdır [29]. Pseudomonaslar üreyebilmek için basit besin maddelerine gereksinim duymaktadır. Bu sebeple rutinde kullanılan besiyerlerinden kanlı agar ve MacConkey agarda kolaylıkla üretilebilmektedirler [1]. Ayrıca *P. aeruginosa* laktozu fermente etmez ve laktoz fermente eden bakterilerden kolayca ayrılır. Kültür, *P. aeruginosa* enfeksiyonunun tanısı için spesifik bir testtir [29].

P. aeruginosa'nın teşhisi, izolasyonuna ve laboratuvar tanımlamasına bağlıdır. Gram morfolojisi, laktozu fermente edememe, oksidaz pozitif reaksiyonu, meyveli kokusu ve 42 ° C'de büyüme kabiliyeti gibi spesifik özelliklerinin temelinde tanımlabilmektedir [30].

P.aeruginosa kültürde hızlı ürer, düz ve yaygın kenarlara sahip koloniler oluşturur. Piyosiyanin ile yeşil pigment , pyoverdin ile yeşil- sarı pigment oluşturmaktadır. β-hemoliz yapmaktadır. Tatlı ve üzümsü bir kokuya sahiptir. Koloni morfolojileri ve biyokimyasal test sonuçları ilk identifikasyonda bu mikroorganizmalar için yeterlidir [1].

Bu özelliklerine göre laboratuvar ortamında tanısı koyulabilmektedir.

2.4. Antibiyotik Direnci ve Tedavi

P. aeruginosa, birkaç antibiyotik sınıfına kendinden dirençli olduğu için terapötik seçenekleri sınırlandırmaktadır. Çok az sayıda yeni antibiyotiğin geliştirilmekte olduğu düşünüldüğünde de, çoklu ilaç direnci, sağlık hizmetleri sistemi için önemli bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır [59]. Ayrıca antimikrobiyal tedavi edinilmiş veya mutasyonel direnç nedeniyle daha da sorunlu hale gelmektedir [8]. Antibiyotik direnci, intrinsik, kazanılmış ve adaptif direnç dahil olmak üzere bir çok farklı yolla ortaya çıkabilmektedir [59].

Antibiyotiklere karşı dört ana direnç türü gelişir;

1. Doğal (İçsel) direnç

2. Edinilmiş direnç

3. Çapraz direnç

4. Çoklu ilaç direnci ve pan-direnci [60].

Doğal (Intrensik, Yapısal) direnç: Bu direnç bakterilerin yapısal özelliklerinden kaynaklanmaktadır ve antibiyotik kullanımıyla ilişkili değildir. Kalıtsal özelliği yoktur. Doğal direnç veya hedef antibiyotiğin yapısını içermeyen mikroorganizmalar veya özelliklerinden dolayı hedefine ulaşmayan antibiyotikler sonucu gelişmektedir [60].

Kazanılmış direnç: Bakterinin genetik özelliklerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda daha önce yanıt verdiği antibiyotiklerden etkilenmemesi nedeniyle kazanılmış bir direnç oluşmaktadır. Bu tür bir direnç, esas olarak kromozomal veya ekstrakromozomal (plazmid, transpozon, vb.) yapılar nedeniyle oluşmaktadır [60].

Çapraz direnç: Belirli bir ilaca dirençli, aynı veya benzer mekanizma ile hareket eden ve diğer ilaçlara da dirençli bazı mikroorganizmalardır [60].

Çoklu ilaç direnci ve pan direnci: Çoklu ilaca dirençli organizmalar genellikle onları tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklere dirençli hale gelen bakterilerdir. Bu, belirli bir ilacın artık bakterileri öldüremeyeceği veya kontrol edemeyeceği anlamına gelmektedir [60].

P. aeruginosa'da bulunan çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları;

1. İntrinsik direnç sağlayan düşük hücre duvarı geçirgenliği,

2. Hücre dışı kromozomal ve plazmid aracılı β-laktamazlar, aminoglikozidazlar ve sefalosporinazların üretimi,

3. Antibiyotik bağlayıcı protein bölgelerindeki değişiklik,

4. Hücreden antibiyotiği dışarı pompalayan aktif bir effluks mekanizması [26].

P. aeruginosa ile ilişkili ciddi enfeksiyonlar tek ilaç tedavisi ile tedavi edilememiştir, bunun sebebi ise bu tedavi yöntemi ile başarı oranının düşük olması ve ilaçların tek başına kullanıldığında bakterilerın hızlı bir şekilde direnç geliştirebilmesidir [29]. Çok ilaca direnç, kromozomal β-laktamazlar, geniş spektrumlu β-laktamazlar, porin kanalı mutasyonları ve effluks pompalarının edinilmesi nedeniyle *P. aeruginosa* ile oluşan hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun haline gelmiştir [29]. Bu yüzden ciddi enfeksiyonlarda etkin antibiyotiklerin kombine tedavisi gerekmektedir [1].

Türlere karşı oldukça etkili aktivite gösteren birçok bileşik vardır. Bunlar arasında yarı sentetik penisilinler (örn. Tikarsilin), üreidopenisiller (piperasilin), karboksipenisilinler (karbenisilin), üçüncü kuşak sefalosporinler (seftazidim), karbapenemler (imipenem ve meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozitler (gentamisin ve amikasin), florokinolonlar (siprofloksasin) ve polimiksinler (polimiksin B ve kolistin) bulunur [26].

Beta-laktam antibiyotikler, çok sayıda klinik endikasyona sahip en sık reçete edilen ilaç sınıflarından biridir [61]. Beta-laktam antibiyotiklerle tedaviden kaynaklanan direnç, *P. aeruginosa'*nın penisilin bağlayıcı proteinlerinin modifikasyonundan da kaynaklanabilmektedir [26].

Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarının biyosentezini hedefler ve çoğaltma aşamasında etkilidir. Pseudomonas enfeksiyonlarının tedavisinde, beta-laktamlar tek başına veya endokardit, kulak enfeksiyonları, kardiyovasküler ve solunum yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için aminoglikozid gibi başka bir antibiyotik ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Beyin ve omuriliğe nüfuz etme kabiliyetleri nedeniyle merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde de tercih edilmektedirler [27].

Aminoglikozitler, ribozomların 30S bölgesine bağlanarak büyümeyi engellemektedir ve böylece bakteri proteinlerinin biyosentezini hedeflemektedir. Vertebral osteomiyelit ve malign dış otitis için kemik ve cilt enfeksiyonlarını ve idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadırlar [27].

Aminoglikozitler, çeşitli enfeksiyonların, özellikle kistik fibroz (KF) hastalarında pulmoner enfeksiyonların tedavisinde yer alan antipseudomonal kemoterapinin hayati bir bileşenidir. Bu ajanlar bakterisittir ve diğer antimikrobiyallerle, özellikle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için sıklıkla uygulandıkları β-laktamlarla sinerji göstermektedirler [62].

2.5. Pseudomonas ve Biyofilm

Bakteriyel biyofilmler, çoklu tolerans mekanizmaları sebebiyle antibiyotik tedavilerine karşı oldukça dirençlidir [23]. Özellikle Gram-negatif bakteriyel biyofilmler, diğer biyofilmlerle karşılaştırıldığında daha kalıcı hücreler göstermektedir.

Bu durum Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının antibiyotiklerin hücrelere nüfuz etmemesini arttıran LPS içermesinden kaynaklanmaktadır [63].

P. aeruginosa oldukça sık biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olan Gram negatif bir nozokomiyal patojendir [18].

P. aeruginosa, biyofilmlerin incelenmesi için örnek bir mikroorganizmadır. Biyofilm içerisinde büyüyen bakteri hücreleri, antimikrobiyallere karşı arttırılmış direnç gibi planktonik hücrelerden farklı birçok özellik taşımaktadır ve ayrıca konakçının bağışıklık sistemine karşı da hareket edebilmektedir [64].

P. aeruginosa, biyofilm formunda ve planktonik formda bulunabilmektedir [65]. Planktonik duruma, sıvı bir süspansiyonda serbestçe geliştiğinde rastlanırken, doğal veya sentetik yüzeylerde yapışkan ve koruyucu bir matrisin salgılanması ile yapışkan kümeler oluşturabilmektedir [66]. *P. aeruginosa,* birçok bakteri tarafından kullanılan ve hücreden hücreye iletişim mekanizması olan Quorum Sensing (QS) tarafından biyofilm üretimi de dahil olmak üzere çok sayıda virülans faktörünün ekspresyonunu düzenlemektedir [18].

Ek olarak, QS sistemini kullanmayan *P. aeruginosa* suşlarının, akut pnömoni ve yanık yarası enfeksiyonunun fare modellerinde daha az virülan olduğu gösterilmiştir, bu da QS'in akut enfeksiyonun önemli bir belirleyicisi olduğunu düşündürmektedir [44].

P. aeruginosa biyofilmleri hücre dışı polimerik (EPS) matriks kaplı hücreleri içermektedir ve hücre dışı bir matrikste kaplanmış hücresel agregatlar olan biyofilmler oluşturmaktadır. Bu matriks, biyofilm içindeki hücrelerin yapışmasına yardımcı olan ve yapı sağlayan polisakkaritler, lipitler, proteinler, nükleik asitler (hücre dışı DNA veya eDNA ve RNA) ve biyo-yüzey aktif maddeler içermektedir. *P. aeruginosa* hücreleri, biyofilm gelişiminin sonraki aşamalarında hücreler yüksek derecede otoaggregasyon gösterdiğinde matriks üretmektedir [65]. Biyofilm oluşumu sürecinde, *P. aeruginosa* kolonileri, ekzopolisakkaritleri salgılayarak su kanalları ile ayrılan karmaşık bir bakteri mikrokolonisi mimarisi ile karakterize edilen bir matrisin üretilmesine yol açmaktadır [44].

P. aeruginosa, bakterilerin kendi ürettiği hücre dışı matrikse kaplanmış kümelerde bulunan ve antibiyotik tedavisi ile ortadan kaldırılması oldukça zor bazen de imkansız olan, biyofilm oluşturma kabiliyeti nedeniyle kronik enfeksiyonların önemli

bir nedeni olarak kabul edilmektedir [6]. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma kabiliyeti, bakterinin boru ve musluk gibi çevresel nişlerde kalabilmesi için önemlidir. Bir yüzeye bağlı olan karmaşık bir hücre kütlesi olarak büyürken, *P. aeruginosa* hücreleri biyositlere planktonik durumda olduklarından çok daha dirençli olabilmektedirler [8].

Biyofilmler konakçının içinde de ortaya çıkabilir ve kistik fibroz ve bronşektazi hastalarında kronik akciğer enfeksiyonlarının patogenezi ve ayrıca kalıcı cihazlar ve diğer protez materyallerle ilişkili enfeksiyonlarla ilişkilidir [8]. Aynı zamanda biyofilmler antimikrobiyal ajanlardan kaçmanın başka bir yolunu sağlamakta ve ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır [16]. *P. aeruginosa*'nın biyofilm ile ilişkili çok çeşitli enfeksiyonlarda yer alması da tedavide oldukça sık rastlanan başarısızlıklara yol açmaktadır [23]. *P. aeruginosa* biyofilmleri, özellikle kistik fibroz (KF) hastalarında ölümcüldür. Ayrıca kronik yaraları olan hastaların klinik sonuçları üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir [23].

P. aeruginosa'da biyofilm oluşumu, bir yüzeye (biyotik veya abiyotik) bağlanma, çoğalma, mikrokoloni oluşumu ve yapılandırılmış ve dirençli bir mikrobiyal topluluğa olgunlaşma diye tanımlanan dört ana adımdan oluşmaktadır [67].

2.6. Biyofilm

2.6.1. Biyofilm Tarihçesi

Biyofilm, ilk kez 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi diş yüzeyinden kazıdığı plakları mikroskop altında incelemesinin sonucunda gördüğü mikrobiyal kümelerin varlığı ile ortaya çıkan bir kavramdır. Biyofilm kavramı ile ilgili ortaya atılan teoriler 1978 yılından sonra artmaya başlamıştır [68]. Biyofilmler Van Leeuwenhoek 17. yüzyılda kendi dişlerinde oluşan plaklardaki varlıkları incelediğinden beri birçok sistemde tanımlanmıştır, ancak biyofilm tanımının genel teorisi 1978'e kadar ilan edilmemiştir. Bu teori, bakterilerin çoğunun, tüm besin-yeterli su ekosistemlerindeki yüzeylere yapışan matris içindeki biyofilmlerde büyüdüğünü ve bu sesil bakteriyel hücrelerin planktonik muadillerinden çok farklı olduğunu belirtmektedir [69]. Bakteriyel biyofilmler ilk kez 1978'de bir yüzeye yapışan ve hücre dışı bir polisakkarit matriks üreten yapılandırılmış mikroorganizmalar topluluğu olarak tanımlanmıştır [23].

Biyofilmler, tıbbi, endüstriyel ve doğal ortamlarda bulunabilen yüzeylere bağlı mikroorganizma topluluklarıdır [70]. Matriks olarak adlandırılan hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile kaplanmış mikropların çok hücreli agregatlarıdır [71]. Biyofilm mikroorganizmaları tipik olarak yapı ve koruma sağlayan hücre dışı bir matris ile çevrilidir. Bir biyofilmde büyüyen mikroorganizmalar genellikle sıvı dolu kanallarla çevrelenmiş makro kolonilerden oluşan karakteristik bir mimariye sahiptir. Biyofilm içerisinde büyüyen mikroorganizmalar ayrıca klinik olarak ilgili antibiyotikler de dahil olmak üzere bir dizi antimikrobiyal maddeye karşı gösterdikleri dirençle bilinmektedir [70].

Patojenik bakteriler tarafından kullanılan hayatta kalma stratejisi biyofilm oluşturmaktır. Şekilsiz ve dinamik olan bu yapı sadece antimikrobiyal bileşiğe karşı direnç sağlamakla kalmayıp aynı zamanda konakçı direnç klerensinden de korumaktadır [72].

Son birkaç yıl içinde, ESKAPE (*Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, P. aeruginosa ve Enterobacter spp.*) adı verilen ve yüksek mortaliteye neden olan bir grup klinik olarak önemli bakteri tarafından biyofilm oluşumu konusundaki ilgi yoğunlaşmıştır [73].

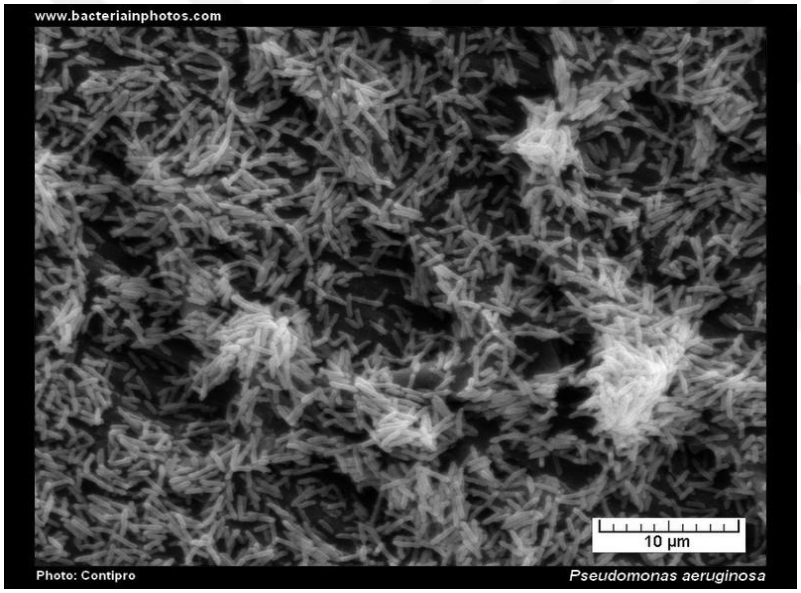
2.6.2. Biyofilmin Yapısı

Biyofilmler, biyotik ve abiyotik yüzeylerle ilişkili olduğu bulunan mikroorganizma gruplarını içermektedir ve tek veya çok katmanlı olabilmektedirler. Biyofilmler, biyofilmin oluşturucu popülasyonu tarafından salgılanan hücre dışı polimerik maddelerden oluşan matrikste kalan homojen veya heterojen bakteri popülasyonlarını içerir [74].

Biyofilmler mikrobiyal hücreler ve hücre dışı polimerik maddeler "ekzopolisakarit ya da ekzopolimer" (EPS)'den oluşur. Biyofilmin yapısındaki ekstrasellüler polisakkarit matrisin yaklaşık %95'i sudan oluşmaktadır [75]. Biyofilm oluşumunun en önemli basamağı hücre dışı matrisin sentezlenmesidir. Bu matris bakteri hücreleri dışındaki tüm elementleri bünyesinde barındırmaktadır. Toplam organik maddenin % 90'ı oluşturan matris, bakteriyel biyofilmin ana yapısal bileşenidir ve esas olarak ekzopolisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve minerallerden oluşmaktadır [23].

EPS, biyofilmin üç boyutlu mimarisi için iskeleyi oluşturmaktadır ve yüzeylere yapışmasından ve biyofilmdeki kohezyondan sorumludur [71]. Biyofilm matriksinin temel bileşenleri polisakkaritlerdir, biyofilmin genel mimarisine katkıda bulunurlar ve bakteri popülasyonunu antibakteriyellere karşı dirençli hale getirirler [76].

Biyofilmlerin EPS matriksinin yapısı, hücre dışı polisakkaritler, DNA ve proteinlerin bir ya da daha fazlasından oluşmaktadır [73]. Genellikle EPS matrisinin kalınlığı 0.2-1.0 µm'dir, ancak biyofilmin boyutu 10-30 nm'yi geçmez [77]. Ekzopolisakkaritler hücre dışı veya hücre içi olarak sentezlenir ve dış ortama salgılanır. Biyofilmdeki kanallar su, hava ve besin maddelerinin yapının tüm kısımlarına ulaşmasına izin vermektedir [73].



Şekil 2-6. *P. aeruginosa* biyofilmi (https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/pseudomonas-aeruginosa-biofilm.html)

EPS oluşumu, biyofilmin yüzeye bağlanma aşamasında meydana gelmektedir [77]. EPS kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklik gösterebilir, ancak öncelik olarak polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkaritlerin bazıları, Gram-negatif bakterilerin EPS' inde olduğu gibi nötr veya polianyoniktir. Üronik asitlerin (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asitler gibi) veya ketal-bağlı piruvatların varlığı anyonik özelliği sağlar. Ayrıca EPS hidrofobik olabilir, ancak çoğu EPS türü hem hidrofilik hem de hidrofobiktir [75].

Hücre dışı polimerik maddelerde farklı tipte bileşenler bulunmaktadır: protein çoğunluğu (>% 2); polisakkaritler (% 1 - 2) gibi diğer bileşenler; DNA molekülleri (<% 1), RNA (<% 1); iyonlar (bağlı ve serbest) ve son olarak suyun % 97'si gibi bileşenleri barındırmaktadır [77].

Hücre dışı proteinler diğer bir önemli EPS matriks bileşenidir. Bazı proteinler biyofilm oluşumu ve stabilizasyonuna yardımcı olmak için hücre yüzeylerine ve polisakkaritlere bağlanmaktadır [73].

P. aeruginosa biyofilmleri ile ilişkili üç ekzopolisakkarit vardır. Bunlar Pel , Psl ve aljinattır. Aljinat ve LPS dışında, Psl ve Pel de iki büyük biyofilm matriks ekzopolisakkarittir. Pel ve Psl, olgun *P. aeruginosa* biyofilmlerinde önemli materyallerdir [73].

2.6.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumunun genellikle dört ana aşamada meydana geldiği düşünülmektedir: (1) bir yüzeye bakteriyel tutunma, (2) mikrokoloni oluşumu, (3) biyofilm olgunlaşması ve (4) daha sonra yeni alanları kolonize edebilen bakterilerin ayrılması (dağılma olarak da adlandırılır). Biyofilmlerde bakteriler çevresel streslere, özellikle antibiyotiklere karşı oldukça güçlü bir direnç göstermektedir [78]. Tutunma adımı geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma olmak üzere iki aşamalı bir süreç olarak kategorize edilebilir [73].

Geri dönüşümlü tutunma, bakterilerin yüzeylere ilk yapışmasına karşılık gelmektedir ve bu yapışma ikinci aşamada geri döndürülemez hale gelmektedir [79].

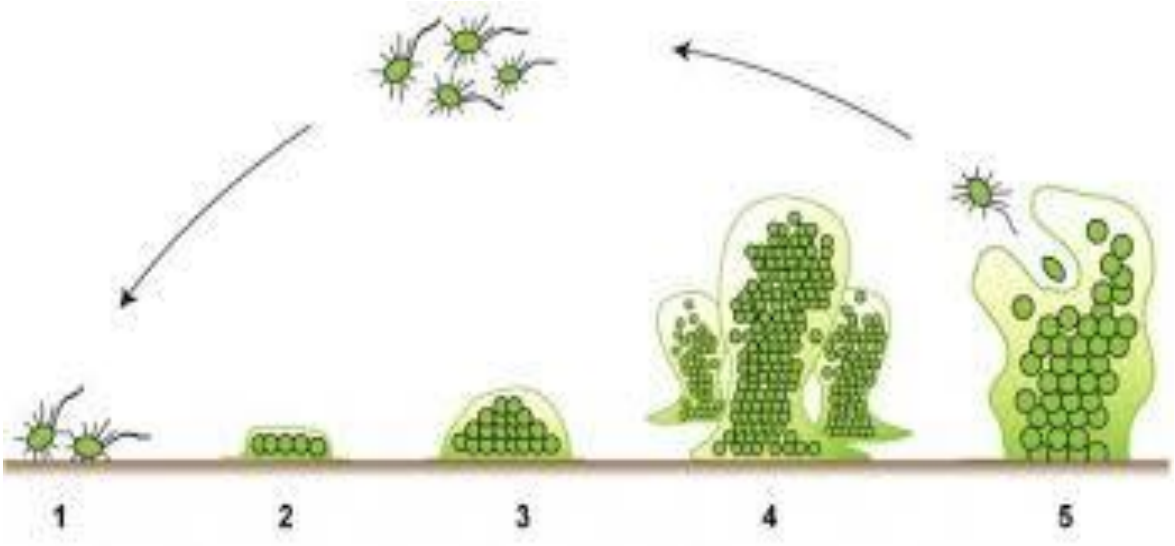
Biyofilm oluşumu oldukça karmaşıktır, ancak dört ana aşamada sınırlandırılabilir.

1)Yüzeye ilk temas / bağlanma,

2)Mikro koloni oluşumu,

3) Biyofilm mimarisinin olgunlaşması ve oluşumu

4) Biyofilmin ayrılması / dağıtılması [77].



Şekil 2-7. Biyofilm oluşum basamaklarının şematik görüntüsü (https://aqua-tech.ca/2016/01/biofilm-in-spas/)

Oluşum, "planktonik hücrelerin geri dönüştürülebilir bir şekilde bağlanması ve ardından yüzeye yapışma ile başlar (1). Bakteriler daha sonra tek katmanlı bir tabaka oluşturur ve hücre dışı bir matriks üreterek geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlanır (2). Daha sonra, çoklu tabakaların göründüğü yerde bir mikrokoloni oluşur (3). Daha sonraki aşamalarda, biyofilm olgunlaşır ve polisakkaritler nedeniyle karakteristik "mantar" yapıları oluşturur (4). Son aşamada bazı hücreler ayrılmaya başlar ve biyofilm dağılması gerçekleşir (5)" [80].

2.6.3.1. Yüzeye ilk temas / bağlanma

Bağlanma basamağı geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma şeklinde ikiye ayrılmaktadır [73]. Planktonik yapıdaki mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlandığı evre biyofilm oluşumunun ilk evresi olarak tanımlanmaktadır [81]. Bu tutunma genelikle kendiliğinden meydana gelmektedir. Bu süreçte Brown hareketi, yerçekimsel ve hidrostatik güçler önemli ölçüde etkin rol oynamaktadır [82]. Biyofilm oluşumunun bu aşamasında, mikrobiyal hücreler yüzeye pilli ve flagella gibi uzantıları yoluyla yapışmaktadır. Adhezyon - mikrobiyal hücrelerin bir yüzeye bağlanması ve kohezyon - hücreler içindeki etkileşim / bağlanma, biyofilm oluşumunda meydana gelmektedir. Fimbria, pili ve flagella, bakteriler ve bağlanma yüzeyi arasındaki etkileşime katkı sağlamaktadır [77]. Yüzey ile temasın gerçekleşmesinin ardından hücre dışına salgılanan polisakkaritler, nukleik asitler,

proteinler ve adhezinler gibi yardımcı elemanlar ile geri dönüşümsüz tutunma aşaması gerçekleştirilmektedir [82].

2.6.3.2. Mikrokoloni oluşumu

Yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturmaktadır [81]. Mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik bir yüzeye bağlanması ve bu bağlanma sabit hale geldikten sonra, EPS içindeki özel kimyasal sinyallerle mikrobiyal hücrelerin çoğaltılması ve bölünmesi süreci başlamaktadır. Bu işlem daha sonra mikrokolonilerin oluşumuna yol açmaktadır [77].

2.6.3.3. Biyofilm mimarisinin olgunlaşması ve oluşumu

Çoğalma dönemi sayesinde, mikrokoloniler hücre dışı matris üretimi ile birlikte inşa edilir, artırılmış hücre dışı matriks üretimi ile üç boyutlu toplulukların büyümesinin gözlendiği biyofilm yapılandırması ve organizasyonunun dördüncü aşamasına yol açmaktadır [79]. Biyofilm oluşumunun bu aşamasında mikrobiyal hücreler, otoindükleyici sinyaller yoluyla birbirleriyle iletişim kurarlar [77]. Hücre-hücre iletişimi, gerekli mikrobiyal hücre yoğunluğunun elde edildiği önemli bir işlemdir. Bu, oto indükleyiciler olarak bilinen sinyal moleküllerinin salgılanmasına yol açmakta ve bu durum da QS'i kolaylaştırmaktadır [83]. Biyofilm topluluklarındaki bakteriler birbirleriyle haberleşerek özel işlevler üstlenmektedirler. Biyofilm olgunlaştıkça, yakalanan bakteriler tarafından biyofilm içine proteinler, DNA, polisakkaritler vb. gibi daha fazla biyofilm iskelesi salınmaktadır [73]. Olgunlaşmanın bu aşamasında EPS oluşumu için önemli olduğu düşünülen bazı gen ürünleri ifade edilir [77]. Bu evre biyofilm fenotipinin ortaya çıkmaya başladığı evre olduğu için mikroorganizmanın dirençli bir yapıya kavuşmasıyla da sonuçlanabilmektedir [81].

2.6.3.4. Biyofilmin ayrılması / dağıtılması

Biyofilm olgunlaşmasından sonraki aşamayı biyofilm yaşam döngüsü için de kritik olan dağılma adımı takip etmektedir [73]. Dağılma aşaması ortam etkileri ile pasif bir şekilde meydana gelebilen ancak normalde biyofilmi oluşturan hücrelerin yönettiği aktif bir süreç olarak bilinmektedir. Bu süreçte bakteriler, çevresel değişimleri algılar ve biyofilm formu ile planktonik form arasında bir tercih yaparlar. Bakteriler avantajlı olan formlarını bu süreçte seçmektedirler [82].

Bu aşamada, biyofilm içindeki mikrobiyal hücreler, sesil formdan hareketli forma dönüşmek için hızlı çoğalma ve dağılma gerçekleştirmektedir. Daha sonra ayrılma doğal bir düzende meydana gelmektedir [77]. Bu aşamada mikrobiyal hücreler, bakterilerin yeni bir bölgeye taşınmasına izin vermek için flagella oluşumu ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir [77]. Biyofilmler, besin eksikliği, yoğun rekabet, aşırı nüfus gibi sayısız faktör nedeniyle dağılmaktadır. Dağılma biyofilmin tamamında veya sadece bir kısmında meydana gelebilir. Planktonik bakterilerin salınması, diğer bölgelerde yeni biyofilmlerin başlatılmasını teşvik etmektedir [73].

2.6.4. Biyofilm Oluşumunun Önemi

Biyofilmler, canlı dokular, kalıcı tıbbi cihazlar, endüstriyel veya içilebilir su sistemi boruları veya doğal su sistemleri dahil olmak üzere çok çeşitli yüzeylerde oluşabilmektedirler. Biyofilmler, bazı bulaşıcı hastalıklardaki rolleri ve cihazlarla ilişkili çeşitli enfeksiyonlardaki katkısı nedeniyle halk sağlığı için büyük öneme sahiptir [75].

Bakterinin biyofilm oluşturmasını gerektiren bazı durumlar vardır.

2.6.4.1. Savunma: stres yanıtı olarak biyofilm oluşumu

Biyofilmler, kan akışı ve tükürüğün yıkama etkisi gibi fiziksel kuvvetlere karşı dayanıklıdır. Biyofilmlerdeki organizmaların, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç planktonik organizmalardan daha iyi olabilmektedir. Biyofilmler ayrıca fagositoza da dirençlidir ve biyofilm üzerine saldırmaya çalışan fagositler aslında çevre dokulara biyofilmden daha fazla zarar verebilir. Biyofilm direncini güçlendiren önemli bir özellik, DNA ve diğer polimerleri içerebilen, ancak genel olarak baskın olarak ekzopolisakkaritlerden oluşan yapışkan matrikstir [84].

EPS bulunduğu bakteriyi güç alanlarından uzak tutarak inflamatuar hücrelerin fagositozundan korumaktadır. Ayrıca antibiyotiğin etkisinden de bakteriyi korumaktadırlar. Çevreden aldığı sinyallerle tehlikede olduğunu farkeden bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır [85].

2.6.4.2. Adhezyon ve Kolonizasyon

Yaşamak için gerekli ortamda kalabilmenin bilinen en önemli yolu biyofilm oluşturmaktır [85]. Mikroorganizmalar sürekli olarak insanlar ve hayvanların

vücutlarında yaşamaya çalışmaktadırlar. Vücudun immün sistemi ile bakteri arasında, bakterinin vücuda nüfuz etmesine karşı hiç bitmeyen bir yarış vardır [84].

2.6.4.3. Yaşanabilir çevre geliştirme

Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının Pseudomonaslar, *V. cholerae, E. coli* ve Stafilokoklar'ın EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir [85].

2.6.4.4. Topluluk oluşturmak

Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da serbest hale geçebilmektedirler. Bu uyum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri kominal yaşamlarının en önemli göstergesidir [85].

2.6.5. Quorum Sensing Sistemi

Bakteriler kimyasal sinyal molekülleri kullanarak birbirleriyle iletişim kurarlar. Daha yüksek organizmalarda olduğu gibi, bu moleküller tarafından sağlanan bilgiler, büyük hücre gruplarının aktivitelerini senkronize etmek için önemlidir. Bakterilerde kimyasal iletişim, otomatik indükleyiciler olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerin üretilmesini, salınmasını, saptanmasını ve bunlara yanıt verilmesini içerir. QS olarak adlandırılan bu süreç, bakterilerin diğer bakteriler için çevreyi izlemesine ve bir toplulukta bulunan sayı veya türdeki değişikliklere yanıt olarak popülasyonun geniş çaptaki davranışını değiştirmesine olanak sağlamaktadır [86].

QS adı verilen bu hücreler arası iletişim süreci, ilk olarak deniz biyolüminesan bakteri *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır. *V. fischeri*, sağladığı ışığa karşılık, bulunduğu yerde besin açısından zengin bir ortam elde etmektedir. *V. fischeri*'de ışık üretiminden bir lusiferaz enzim kompleksinin sorumlu olduğu bulunmuştur. Biyolüminesans, yalnızca *V. fischeri*, QS tarafından kontrol edilen yüksek hücre yoğunluğunda olduğunda meydana gelir [12].

QS sistemi bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme olanağını sağlamaktadır. Bununla birlikte de davranışlarını düzenlenleyebilmesini de sağlar.

Böylece, konakta infeksiyon oluşturabilecek yeterli çoğunluğa ulaşıncaya kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakteri fark edilemez ve bu sayede başarılı bir infeksiyon süreci oluşturulması sağlanır [87], [88].

Birçok bakterinin kooperatif aktivitelerini ve fizyolojik süreçlerini, bakteri hücrelerinin birbirleriyle küçük difüzyon sinyal moleküllerini serbest bırakarak, algılayarak ve bunlara yanıt vererek birbirleriyle iletişim kurdukları çekirdek algılama (QS) adı verilen bir mekanizma ile düzenledikleri bilinmektedir. Bakterilerin çok hücreli bir organizma gibi sosyal etkileşimler için bir grup olarak iletişim kurma ve davranma yeteneği, konakçı kolonizasyonu, biyofilmlerin oluşumu, rakiplere karşı savunma ve değişen ortamlara adaptasyonda bakterilere önemli faydalar sağlamıştır. Önemli olarak, QS kontrollü birçok aktivite, bakterilerin virülansına ve patojenik potansiyeline dahil olmuştur [12].

QS 4 aşamaya ayrılabilir: (1) bakteriyel hücre tarafından küçük biyokimyasal sinyal moleküllerinin üretimi; (2) sinyal moleküllerinin, aktif veya pasif olarak, çevreye salınması; ve (3) eşik konsantrasyonunu aştığında sinyal moleküllerinin spesifik reseptörler tarafından tanınması, (4) gen düzenlemesinde değişikliğe yol açar. Çekirdek algılayıcı gen ekspresyonunun indüksiyonunu algılayan ortak bir sonuç, sinyal molekülü üretiminde yer alan proteinlerin sentezinin artmasıdır. Sinyal molekülünün artan sentezi, olumlu bir geri besleme döngüsü oluşturur, bu nedenle çekirdek sinyallerine yaygın olarak otomatik indüktörler denir [89]. Yetersayı algılayan bakteriler, otomatik indükleyiciler olarak adlandırılan kimyasal sinyal molekülleri üretir ve ortama bırakırlar. Bakteriler, bu otomatik indüktörlerin minimum eşik uyarıcı konsantrasyonunun birikmesini saptar ve gen ekspresyonunu değiştirir, dolayısıyla yanıt olarak da davranışı değiştirir. Bu sinyal-yanıt sistemlerini kullanarak, bakteriler popülasyondaki belirli davranışları senkronize eder ve böylece çok hücreli organizmalar olarak işlev görür [86].

İlk tanımlanan QS sistemi, biyoluminesans deniz bakterisi *Vibrio fischeri'*dir ve çoğu Gram negatif bakteride QS için paradigma olarak kabul edilmektedir [86].

QS biyofilm oluşumunun olgunlaşması aşamasındaki regülatör etkisi ile önemli bir rol oynamaktadır. Quorum sensing sisteminin biyofilm oluşumundaki rolü de ilk olarak 1998 yılında Greenberg ve arkadaşları tarafından *P. aeruginosa*'da gözlemlenmiştir [90].

2.6.5.1. N-açilhomoserin lakton (AHL) sinyali:

AHL ilk olarak 1960'larda ve 1970'lerde biyolüminesan deniz bakterisi *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır [91] Gram-negatif bakteriler tipik olarak, ilk defa biyolüminesan deniz simbiyotik bakteri Vibrio fischeri'de tanımlanan QS sistemine homolog LuxI / LuxR-tipi QS sistemlerini kullanır [92].

Lux tip QS sistemi, Gram negatif bakterilerde türe özgü iletişim için örnek teşkil eden ve önde gelen mekanizmadır [93]. İlk olarak Vibrio türlerinde tanımlanan Lux tip QS, AHL'lerin üretimi ve yanıtlarına dayanmaktadır. Genel olarak, Lux tip sistemler iki bileşenden oluşur: S-adenosil metiyoninden AHL'leri sentezleyen bir otomatik indüktör sentaz (örn. LuxI) ve bir transkripsiyonel regülatör (örn. LuxR). Popülasyon yoğunluğu arttıkça, hücre içi AHL, fonksiyonel olarak bağlı (aynı kökenli) LuxR benzeri reseptörü, diferansiyel gen ekspresyonunu indüklemek için sitoplazma içinde yeterli konsantrasyonda bağlamaktadır [89].

2.6.6. Quorum Quenching (QQ)

Quorum quenching, QS sürecinin engelleme mekanizması olarak tanımlanmaktadır. QQ otoindüktör bileşiğin enzimatik bozunması ve onları taklit edebilecek inhibitörler olarak tanımlanan bileşiklerin eklenmesi yoluyla otoindüktör üretiminin veya alımının engellenmesiyle sağlanabilmektedir [94].

Anti-QS ajanları ilk kez kırmızı deniz yosunu Delisea pulchra' da tanımlanmıştır [95].

Genellikle, QS sinyallerini etkisiz hale getiren enzimler QQ enzimleri olarak adlandırılırken, QS yollarını bozan kimyasallar da QS inhibitörleri (QSI'ler) olarak adlandırılmaktadır [96].

Birçok farklı QQ mekanizması vardır. Bu mekanizmaları 4 gruba ayırabiliriz;

2.6.6.1. Sinyal Sentezinin Engellenmesi; Patojenik faktörlerin ifadesinde bakteri iletişiminin önemi nedeniyle, sinyal sentezinin engellenmesi bakteriyel enfeksiyonu önlemek için potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir [97].

2.6.6.1. Sinyal Molekülleri ile Etkileşim;

QS sinyallerini engelleyebilen inhibitörlerin kullanımının yanı sıra, QS sistemini etkilemenin bir başka yolu, AHL'lere benzer bir yapıya sahip inhibitörleri kullanarak,

AHL reseptör proteinlerine bağlanmayı sağlamak ve gen ekspresyonunu inhibe ederek QS'i engellemektir [98].

2.6.6.2. Sinyal Moleküllerinin İnaktivasyonu;

AHL sinyal moleküllerinin etkilerinin inaktivasyonuna yol açan bozunmalarla elde edilmektedir. AHL inaktivasyonunun kimyasal bozunma ve enzimatik bozunma süreci olarak adlandırılan iki farklı yolu bulunmaktadır [94].

2.6.6.3. AHL Bozulması için İmmobilize Enzim;

Enzim immobilizasyonu, AHL bozunması için serbest enzim kullanımının dezavantajlarının üstesinden gelmek için bulunan yeni bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır [94].

Serbest enzimler genellikle toksik olma veya diğer yan reaksiyonlara dahil olma gibi risklere sahiptirler. Bu nedenle, hareketsizleştirilmiş enzim kullanımı, özellikle denatüre edici koşullar altında enzimin daha iyi stabilitesini sağlamaktadır. Bahsedilen tüm avantajların yanı sıra, bazı özgün enzimatik faaliyetler çoğunlukla hareketsizleştirme sırasında kaybedilebilmektedir [99].

Antibiyotikler, şiddetli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktaydı. Zaman geçtikçe ve aşırı antibiyotik kullanımıyla bakteriler, antibiyotiklere karşı bir direnç sistemi geliştirdiler. Bu sebeplerden dolayı QQ, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımının yerine kullanılmaya çalışılmıştır. QQ stratejisi kullanımının orijinalliği, daha hafif bir seçici baskı uygulayarak bakterileri öldürmeden bakteriyel virülansın inhibisyonunda etkili olmak üzere geliştirilmektedir [94].

QQ insanlarda bakteriyel enfeksiyonunun önlenebilmesi için oldukça önemli alternatiflerden biri olabilir.

2.6.7. Pseudomonas ve Quorum sensing

Gram-negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa,* QS ve biyofilm oluşumunu bağımsız bir şekilde inceleyebilmek için örnek bir mikroorganizma haline gelmiştir. 1998' deki bir araştırmada Davies ve arkadaşları QS ve biyofilm arasında bir ilişki keşfetmişler; olgunlaşmış, farklılaşmış *P.aeruginosa* biyofilmlerinin oluşması için QS 'in gerekli olduğunu bildirmişlerdir. O zamandan beri, QS'in biyofilm üretimini

düzenlediği mekanizmaları ortaya çıkarmak için kapsamlı bir çaba sarf edilmektedir [100].

P. aeruginosa, bakteriyel virülans genlerinin ekspresyonunu koordine etmek için las, pqs ve rhl düzenleyici elemanlardan oluşan hiyerarşik bir QS ağı kullanır [101].

Fırsatçı insan patojeni *P. aeruginosa*'da QS, biyofilm oluşumunu, virülansı, kümelenme hareketliliğini ve antibiyotik efluks pompalarını düzenlemektedir [102].

Pseudomonas spp., özellikle *P. aeruginosa*, yoğun bir quorum sensing reseptörleri ve regülatörleri ağı kullanır. Başlıca *P. aeruginosa* reseptörleri, sitoplazmada otoindüktör bağlanmasını takiben DNA bağlayıcı transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev gören LuxR tipi reseptörlerdir [103].

P. aeruginosa üç farklı QS sistemine sahiptir: virülans faktörlerinin ekspresyonunu kontrol etmek için seri olarak çalışan iki LuxI / LuxR tipi QS sistemi ve Pseudomonas kinolon sinyal (PQS) sistemi adı verilen üçüncü bir LuxI / LuxR tipi olmayan sistem [92].

P. aeruginosa virülansı özellikleri, sırasıyla elastaz ve ramnolipid üretimi üzerindeki etkilerinden sonra adlandırılan, las ve rhl olarak adlandırılan iki farklı Lux tip QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Las sistemi, rhl sistemini bir virülans regülatörünün bir parçası olarak düzenlemektedir. Bu hiyerarşik devre, ekzoproteaz ve toksin üretimi, motilite ve biyofilm oluşumu dahil olmak üzere elastaz ve ramnolipidin ötesinde çoklu virülans özelliklerini kontrol etmektedir [104].

Vahşi tip *P. aeruginosa*'da, gerekli olan ilave otoindükleyici genellikle Las sistemi tarafından sağlanır. Bununla birlikte, *P. aeruginosa*'nın kistik fibrozlu hastalardan elde edilen izolatları sıklıkla lasR'da mutasyonlara sahiptir [105].

Las ve rhl sistemlerine ek olarak, *P. aeruginosa*'da üçüncü bir AHL QS sistemi tanımlanmıştır [106]. Pseudomonas kinolon sinyali (PQS) olarak bilinen ve 2-heptil-3-hidroksi-4-kuinolon sinyal molekülünü kullanan üçüncü bir QS sistemi olarak *P. aeruginosa*'da bulunur [89].

P. aeruginosa'da şu anda iyi bilinen dört QS yolu vardır: LasR ve LasI ve RhlR ve RhlI adı verilen iki LuxR ve LuxI tipi sistem, PqsR kontrollü kinolon sistemi ve fosfat sınırlayıcı koşullar altında çalışabilen IQS sistemi [101].

RhlR, *P. aeruginosa*'da virülans genlerinin ekspresyonunu kontrol eden önemli bir quorum sensing bileşenidir [103].

2.6.8. Biyofilm Direnci

Biyofilm üretimi, bakterilere karşı antimikrobiyal tedaviyi geciktirir, çünkü biyofilm, tedavinin başarısız olmasına yol açan ilaç penetrasyonunu azaltan ve aynı zamanda mikroorganizmaların bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engelleyen bir bariyer geliştirmektedir [107]. Biyofilm yapısının doğası ve biyofilm organizmalarının fizyolojik özellikleri, antimikrobiyal ajanlara karşı doğal bir direnç sağlamaktadır.[69] Biyofilmlerde bulunan bakteriler, planktonik bakterilere kıyasla antimikrobiyal ajanlara ve konakçı immün yanıtına çok daha dirençlidir, bu da ortadan kaldırılması zor olan uzun süreli enfeksiyonlara veya kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır [108].

Artan antibiyotik direnci biyofilm bakterileri ile ilişkili genel bir özelliktir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara toleransında, planktonik bakterilere göre 10-1000 kat daha fazla artış olduğu bildirilmiştir [109].

Biyofilm bakterilerinin planktonik bakterilere göre artan antibiyotik direnci, kronik bakteriyel enfeksiyonların oluşumunu teşvik etmektedir. Direnç mekanizmaları arasında, glikokaliks tarafından antibiyotik difüzyonunun engellenmesi, bakterilerin fizyolojisi ve biyofilmin bulunduğu yerin çevre koşulları yer almaktadır [110].

Yapışık bakteri popülasyonları (biyofilmler), planktonik popülasyonlardaki aynı bakterilerde görülmeyen doğuştan gelen bir antibiyotik duyarlılığı eksikliğine sahiptir. İn vitro biyofilm modellerinde çalışılan duyarlılık testlerinde, minimal inhibitör konsantrasyonun yüzlerce ya da daha fazla konsantrasyonlarda bile antibiyotikle muamele edildikten sonra eradike edilemediği gösterilmiştir [111].

Bakteriyel biyofilmlerde antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları üç ana hipotez ile açıklanabilmektedir. İlk hipotez antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksi yoluyla gecikmiş penetrasyonu olarak açıklanabilir. Antimikrobiyal moleküller, kapalı hücreleri inaktive etmek için biyofilm matriksi boyunca yayılmalıdır. Bu matriksi oluşturan hücre dışı polimerik maddeler, molekülün biyofilm iç kısmına taşınması hızını veya antimikrobiyal materyalin matriks malzemesi ile reaksiyonunu etkileyerek bu moleküller için difüzyonel bir bariyer olarak işlev görmektedir [69].

Biyofilmlere in vitro antibiyotik penetrasyonu ölçümleri, bazı antibiyotiklerin bakteriyel biyofilmlere kolayca nüfuz ettiğini göstermiştir. Çoğunlukla su olan biyofilm matriksi yoluyla çözünen maddelerin büyüklüğünün dağılmasına karşı genel bir engel bulunmamaktadır. Ancak, antibiyotik biyofilmde devre dışı bırakılırsa, penetrasyon son derece geciktirilebilir [112].

İkinci hipotez biyofilm içindeki canlıların değişen büyüme oranına bağlıdır. Antimikrobiyal ajanlara biyofilm direnci için önerilen başka bir mekanizma, biyofilm ile ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden önemli ölçüde daha yavaş büyümesi ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanları daha yavaş almasıdır [69].

İkinci hipotez biyofilm içindeki değiştirilmiş bir kimyasal mikro-çevreye bağlıdır. Besin konsantrasyonlarındaki mikro ölçekli gradyanlar biyofilmlerin iyi bilinen bir özelliğidir. Minyatür elektrotlarla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, bir biyofilmin yüzey katmanlarında oksijenin tamamen tüketilebildiğini ve biyofilmin derin katmanlarında anaerobik nişlere yol açtığını göstermiştir. Aminoglikozid antibiyotikler, aynı mikroorganizmaya karşı anaerobikte aerobik koşullardan daha az etkilidir. Bir biyofilm içindeki ozmotik ortam değiştirilebilir ve bir ozmotik stres tepkisinin indüklenmesine yol açar. Böyle bir yanıt, gözeneklerin nispi oranlarını antibiyotiklere hücre zarfı geçirgenliğini azaltacak şekilde değiştirerek antibiyotik direncine katkıda bulunabilir [112].

Üçüncü bir antibiyotik direnci mekanizması, bir biyofilmdeki mikroorganizmaların bir alt popülasyonunun, spor oluşumuna benzer bir hücre farklılaşması olan benzersiz ve yüksek derecede korunan fenotipik bir durum oluşturmasıdır. Bu hipotez, bir antimikrobiyal ajanın veya metabolik substratların penetrasyonuna engel teşkil etmeyecek kadar ince olmalarına rağmen, yeni oluşturulmuş biyofilmlerde direnç gösteren çalışmalardan elde edilen bulgularla desteklenmiştir. Bir biyofilmdeki bazı bakterilerin girdiği spor benzeri bir durumun hipotezi, biyofilmlerin geniş ölçüde farklı kimyaların antibiyotiklere ve dezenfektanlarına karşı duyarlılığının azaltılması için güçlü ve genel bir açıklama sağlar [112].

Yapılan çalışmalarda büyümeyen hücrelere karşı etkinliği olan antibiyotiklerin, hızlı büyümeye bağlı olmayan antibiyotiklere göre biyofilm bakterilerine karşı gelişmiş aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir [109].

2.6.9. Tıbbi İnfeksiyonlar ve Biyofilm İlişkisi

Biyofilm ile ilişkili mikroorganizmalar, hem büyüme oranları hem de konakçı savunma ve antimikrobiyal tedaviye direnme yetenekleri bakımından planktonik bakterilerden farklı davranmaktadırlar [113].

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar aşağıdaki özelliklere sahiptir;

(A) Çoğunlukla değişken sakin ve akut dönemler ile birlikte iddiasız patojenik paternleri vardır;

(B) Biyofilm içindeki bakteriler antimikrobiyallerden kısmen korunduğu için relapslar sık olsa da, antibiyotik tedavisine ilk yanıt olabilir;

(C) Biyofilm polimikrobiyal enfeksiyonlara sebep olabilir. Baskın bakteriler ya otoktonüs derinin ya da bağırsak florasının ortak üyeleri ya da çok yaygın çevresel organizmalardır.

(D) Bir biyomedikal cihaz yerleştirildiğinde bakterilerin bitişik sıvılardan ve dokulardan , cihaz çıkarıldığında da kurtarılması zor olabilir [113].

Biyofilm enfeksiyonları düşük derecede bağışıklık tepkisi gösterdiğinden hasta morbiditesine katkıda bulunmaktadır. Önemli sağlık maliyetleri; enfeksiyonların oldukça sık görülmeleri , antibiyotik tedavisine karşı dirençleri ve enfeksiyonu tedavi etmek için enfekte olmuş yabancı cismin çıkarılması gibi nedenlerden dolayı biyofilm enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır [114].

Aynı zamanda biyofilmler antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasına ve yayılmasına da katkıda bulunmaktadır. Daha geniş bir açıdan değerlendirildiğinde, biyofilm oluşumu insan konağının potansiyel patojenler tarafından kolonizasyonunun yanı sıra bu patojenlerin çevreye bulaşmasını ve kalıcılığını da desteklemektedir [114].

Geleneksel kültür yöntemleri genellikle enfeksiyöz ajanları güvenilir bir şekilde tespit edemediğinden, biyofilm enfeksiyonlarının teşhis edilmesi zordur, bu da yeterli tedavi stratejilerinin kullanılmasını önlemektedir [114].

Tüm bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık % 65'inin bakteriyel biyofilmlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bunlar hem cihazla ilişkili olan hem de cihazla ilişkili olmayan enfeksiyonları içermektedir [77].

Biyofilm koruması altında olan mikrobiyal hücreler, antibiyotiklere ve bağışıklık tepkilerine karşı toleranslı hale gelmektedir ve bu da biyofilm enfeksiyonlarının klinik tedavisini oldukça zor bir hale getirmektedir. Klinik ve laboratuvar araştırmaları biyofilm enfeksiyonu ile tıbbi yabancı cisimler ve kalıcı cihazlar arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermiştir. Klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar, tek başına antibiyotik tedavisinin çoğu durumda biyofilm enfeksiyonlarını ortadan kaldırmak için yetersiz olduğunu açıkça göstermektedir [115].

Biyofilm ile ilişkili mikroorganizmalar, gelişmiş ülkelerde endokardit, osteomiyelit, sinüzit, idrar yolu enfeksiyonları, kronik prostatit, periodontitis, kistik fibroz hastalarında kronik akciğer enfeksiyonu, orta kulak enfeksiyonları ve özellikle bilinen tüm yerleşik cihazlarla ilgili olan çeşitli hastane enfeksiyonları dahil çok sayıda enfeksiyona neden olur. Biyofilm enfeksiyonları üç ana türe ayrılabilir: cihazla ilişkili biyofilm enfeksiyonu, cihazla ilişkili olmayan kronik biyofilm enfeksiyonu ve biyofilm ile ilgili cihaz arızası [113].

Kalıcı tıbbi cihazlardaki biyofilmler Gram pozitif , Gram negatif bakteri veya mayalardan oluşabilir. Bu cihazlardan yaygın olarak izole edilen bakteriler arasında Gram pozitif *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis ve Streptococcus viridans*; ve *Gram negatif Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis ve P. aeruginosa* bulunmaktadır. Biyofilmler, cihaza ve cihazın hastada kullanım süresine bağlı olarak tek bir tür veya birden fazla türden oluşabilir.[116] Kateterler, stentler, ortopedik implantlar, kontakt lensler ve implante edilebilir elektronik cihazlar gibi yapay cihazlarda biyofilm oluşumu sıklığı yüksektir [114].

İnsan vücuduna bir tıbbi cihaz yerleştirildiğinde, hayati organların normal işlevlerini kurtarmak için amaçlanan amacını yerine getirirken, hücrelerin ve mikropların ulaşmak için rekabet ettiği bir yer haline gelebilmektedir [113].

Kalp pili ve protez kalp kapakçıkları, vasküler protezler, elektrikli diyalizerler, protez eklemler, alloplastik ortopedik cihazlar, intravenöz kateterler, kalıcı idrar sondaları, üretral stentler, endotrakeal tüpler, beyin omurilik sıvısı şantları, yerleşik idrar sondaları, üretral stentler, endotrakeal tüpler, beyin omurilik sıvısı şantları, periton diyaliz kateterleri, bistil implantlar , intrauterin cihazlar, karın drenleri, nefrostomi

tüpleri, doku dolguları ve kontakt lensler hastalar için vazgeçilmez olduğu kanıtlanmış örneklerdir [113].

Üriner kateterler, yerleştirildiğinde iç veya dış yüzeylerde kolayca biyofilm elde edebilen tübüler lateks veya silikon cihazlardır. Bu cihazları yaygın olarak kontamine eden ve biyofilm oluşturan organizmalar *S. epidermidis, Enterococcus faecalis, E. coli, Proteus mirabilis, P. aeruginosa, K. pneumoniae* ve diğer Gram negatif mikroorganizmalardır [116].

Kontakt lenslere bağlanan mikroorganizmaların türü sıklıkla *E. coli, P. aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis,* Candida türleri, *Serratia* ve *Proteus* vb. gibi mikroorganizmalardır [77].

Kateter biyofilmlerinden en sık izole edilen organizmalar *Staphylococcus epidermidis, S. aureus,* Candida albicans, *P. aeruginosa, K. pneumoniae* ve *Enterococcus*'dur [116].

Cihazla ilişkili olmayan kronik biyofilm hastalığı; implante cihazlarla ilişkili olmayan biyofilm hastalığı, kistik fibrozlu hastalarda görülen kronik hava yolu enfeksiyonu, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları, tüberküloz, kronik yara enfeksiyonları, kronik otitis media, kronik sinüzit, endokardit, osteomiyelit, diş çürüğü, periodontitis, otitis media, safra yolu enfeksiyonları ve bakteriyel prostatit gibi hastalıkları içermektedir [113].

Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), bakteriyel biyofilmlerin mikrobiyal hastalıkların % 65'inde ve kronik enfeksiyonların % 80' inden fazlasında rol oynadığını gözlemlemiştir. Bunlar hem cihazla ilşkili olan hem de cihazla ilişkili olmayan enfeksiyonları içerir. Cihazla ilişkili enfeksiyonlara ilişkin veriler birkaç cihaz için şu şekilde tahmin edilmiştir, örneğin: meme implantları için% 2; eklem protezleri için% 2; % 4 mekanik kalp kapakçıkları için; ventriküler şantlar için % 10; % 4 kalp pili ve defibrilatör için ve ventriküler destekli cihazlar için yaklaşık % 40 [77].

Biyofilm oluşumu ile ilişkili ilk klinik enfeksiyonlardan biri tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonlardır.[74] Biyofilmler genellikle kontakt lensler, santral venöz kateterler, mekanik kalp kapakçıkları, periton diyaliz kateterleri, protez eklemler, kalp pilleri, idrar sondaları ve ses protezleri gibi yerleşik tıbbi cihazların içinde veya içinde meydana gelir [77].

Kistik fibroz, akciğerlerin normal işleyişini bozan genetik bir bozukluktur (otozomal resesif). Kistik fibrozda *P. aeruginosa* biyofilmlerinin varlığı akciğerleri kötü etkilemektedir ve biyofilmlerin varlığı, hastaların balgamındaki bakteriler tarafından salgılanan homoserin laktonun (HSL) saptanmasıyla test edilmektedir [74]. *P. aeruginosa* biyofilmleri özellikle kistik fibrozis (KF) hastalarında ölümcüldür. Ayrıca kronik yaraları olan hastaların klinik sonuçları üzerinde de önemli bir etkisi vardır [117].

2.6.10. Biyofilm Tanı Yöntemleri

Biyofilm üretimi çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilmektedir [118]. Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikroplak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunu tanımlamak için en sık kullanılan yöntemler arasında gösterilmektedir. Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitenin tanımlanmasına dayanan bazı kantitatif yöntemlerle floresan mikroskobisi, konfokal lazer tarama mikroskobisi ve elektron mikroskobisinin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur. Mikroplakların kullanıldığı yöntemler, biyofilm oluşumunu saptamak için araştırmalarda çeşitli modifikasyonlar yapılarak kullanılan ve sıkça tercih edilen yöntemlerdendir [119], [120].

Biyofilmlerin varlığının gösterilmesi için standart deney, polistiren ve diğer hidrofobik substrat üzerindeki hücrelere bağlı olan boyanın nicelleştirilmesi ile kristal viyole (CV) analizidir. Doku Kültürü Plakası (TCP) yöntemi de Kongo Kırmızı Agar yöntemi (CRA) ve Tüp yöntemi (TM) ile karşılaştırıldığında en yaygın uygulanan standart yöntem ve aynı zamanda daha güvenilir bir işlemdir. Biyofilm tespiti için diğer yöntemler arasında biyolüminesans analiz, piezoelektrik sensörler ve yüzde Transmisyon (% T) yöntemi bulunmaktadır. Biyofilm görüntüleme teknolojisindeki ilerlemelerin biyofilmlerin karmaşıklığını ve dinamiklerini anlamak için çok önemli olduğu kanıtlanmıştır [118].

Biyofilmlerin karmaşıklığı ve dinamiği, ışık mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ve konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) dahil olmak üzere biyofilm görüntüleme optik teknolojisi ile gözlemlenebilir. Bu teknikler 3D yapıyı görselleştirmek ve biyofilmin varlığını kontrol etmek için kullanılmaktadır [118].

Işık mikroskopisi, yüzeylere yapışan mikroorganizmaların morfolojisini kantitatif olarak gözlemlemek ve yüzeye bağlı mikroorganizma miktarını (var, yok, bol, nadir, vb.) nicel olarak tahmin etmek için kullanılan kolay, ucuz, basit, kullanışlı ve hızlı bir yöntemdir [121].

Transmisyon elektron mikroskobu, iç ve dış mikrobiyal yapışma yapılarının görüntülenmesi ve karakterizasyonu için önemli bir fayda sağlamaktadır. Bu yöntem altın-işaretli antikorlarla birleştirilerek, mikroorganizmanın içindeki ve dışındaki spesifik antijenik yapıları bulabilmektedir [121].

SEM uygulamasında hücre örneğinin 3D görüntülerini görselleştirmek için altın gibi ağır metallerle kaplama yapılmaktadır. Numunenin metal kaplamasından salınan elektronlar, görüntü üretimi için SEM tarafından yakalanır [122]. Bu yöntem, belirli bir yüzey alanı üzerindeki mikroorganizmaların sayısını sayarak nitel gözlemlerden nicel gözlemlere dönüştürülebilir. Prosedürün, başka herhangi bir yöntemle gözlemlenmesi mümkün olmayan opak veya yüksek dokulu yüzeylere tutunmuş organizma sayısının doğrudan sayımına izin vermesi gibi benzersiz bir avantajı bulunmaktadır [121].

Yüzeyi saydam olan akış hücrelerinde oluşan biyofilmler ise konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) ile gözlemlenebilir. Biyofilmlerin üç boyutlu (3D) morfolojisi ve fizyolojisi CLSM ile taranabilir. Biyofilmler ve biyofilm gömülü mikroorganizmalar gibi derinlikte lokalize olan mikroorganizmaların CLSM tarafından gözlemlenmesi gerekmektedir [123].

Floresan boyalar kullanılarak belirli mikroskopik elemanlar etiketlenebilir ve görselleştirebilir. Lazer tarama konfokal mikroskop, üç boyutlu görüntüler oluştururken şeffaf örneklerin arkasını görebildiğinden, karmaşık mikroorganizma-yüzey etkileşimlerinin mikrobiyal biyofilmlerin yapısı ve mikroorganizmanın ökaryotik hücrelerle etkileşimi gibi in situ morfolojisini anlamak için çok değerli bir yöntem olarak görülmektedir [121].

Biyofilmi üreten mikroorganizmanın saptanması için kalitatif bir deney olan tüp yöntemi (TM) Christensen ve arkadaşları tarafından açıklanmaktadır [124]. İzolatlar Tryptik soya broth içeren polistiren test tüpüne inoküle edilir ve 24 saat 37° C'de inkübe edilir. Planktonik hücreler, fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile iki kez yıkandıktan sonra polistiren test tüpünün duvarlarında oluşan biyofilmler 1 saat boyunca safranin ile boyanır. Daha sonra, safranin ile boyanmış polistiren test tüpü boyayı boşaltmak için

PBS ile iki kez yıkanır. Test tüpü işleminin havada kurutulmasından sonra, görünür biyofilm oluşumu duvarları kaplar ve tüpün tabanı biyofilm üretimini gösterir [124]. Görünür bir film tüpün duvarlarını kapladığında, biyofilm üretiminin meydana geldiğine karar verilmiştir. Sıvı-hava arayüzünde halka oluşumu, biyofilm üretiminin göstergesi olarak değerlendirilmemiştir [124].



Şekil 2-8. Tüp yöntemiyle biyofilm oluşumunun saptanması (Çalışmamızdan)

Kongo kırmızılı agar yönteminde, biyofilm oluşturma özelliği saptanacak bakteriler içerisinde sükroz, beyin kalp infüzyon buyyonu, Kongo kırmızısı ve agar kullanılarak hazırlanan besiyerinde 37º C de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında besiyerinde oluşan parlak siyah koloniler biyofilm pozitif olarak gözlemlenir [120].

Kongo kırmızı agar (CRA) ortamına inoküle edilen kolonilerin renk değişikliğinin bir sonucu olarak biyofilm üreticisi mikroorganizmanın saptanması için kalitatif bir analiz olan CRA yöntemi Freeman ve arkadaşları tarafından açıklanmaktadır. CRA ortamı, 0.8 g Kongo kırmızısı ve 36 g sükrozun 37 g / L Beyin kalp infüzyonu (BHI) agarına karıştırılmasıyla oluşturulur. 37°C 'de 24 saat inkübasyon süresinden sonra, farklı renklerde gözlemlenen kolonilerin morfolojisi biyofilm üreticisi olarak ayrılır veya ayrılmaz. Kuru kristal kıvamına sahip siyah koloniler biyofilm üreticilerini gösterirken, pembeyi koruyan koloniler biyofilm olmayan üreticiler olarak tanımlanır [125].

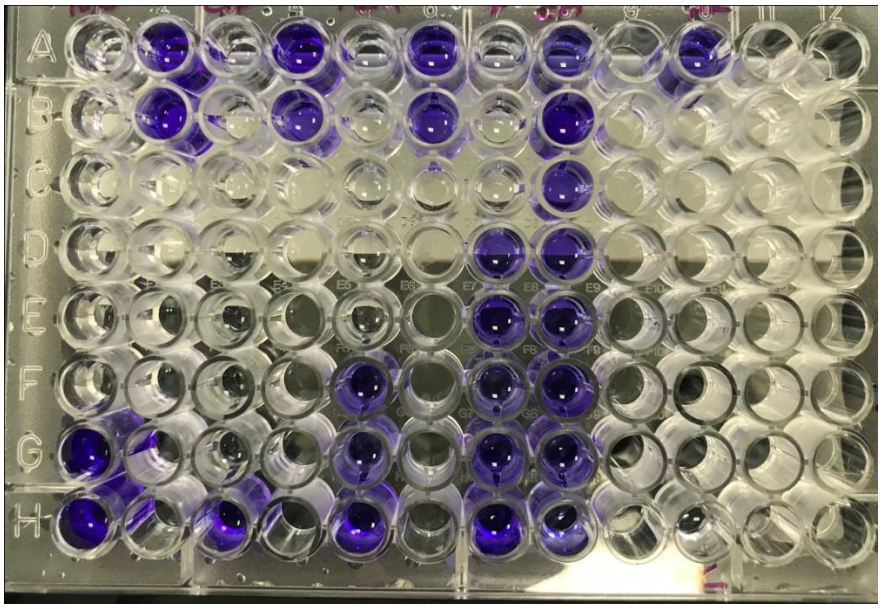


Şekil 2-9. Kongo kırmızı agarda biyofilm oluşumunun gözlenmesi

Biyofilm pozitif koloniler (sağda) , biyofilm negatif koloniler (solda) [126].

Spektrofotometrik mikroplak yöntemi, araştırmalarda biyofilm oluşumunun saptanmasında kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Mikroplak yönteminde uygun besiyerini içeren 96 kuyucuklu mikroplakların kuyucuklarına bakteri kültürü inoküle edilir ve mikrotitre plakları inkübasyona bırakılır. Hücreler mikrotitre plaklarında istenilen süre boyunca inkübe edilir ve daha sonra kuyucuklar, planktonik bakterileri uzaklaştırmak amacıyla yıkanır. Kuyucuklara yapışan hücreler daha sonra bağlanma paterninin görüntülenmesini sağlayan bir boya ile boyanır. Spektrofotometrede belirli bir dalga boyunda ölçüm işlemi yapılır. Spektrofotometre tarafından okunan değerler, kontrol kuyucuklarının değerleri ile karşılaştırılarak biyofilm oluşumu değerlendirilir [127].

Mikrotitre plaka biyofilm protokolünde, bakteriler önce planktonik olarak sabit faza büyütülür ve daha sonra test için taze ortama inoküle edilir. Yeni inoküle edilmiş örneklerin 100 µL'lik kısımları bir mikrotitre plakasına aktarılır ve inkübe edilir. İnkübasyon sıcaklığı genellikle 30 dakikadan 72 saate kadar değişen bir süre boyunca 37°C'dir. Deney ortamı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi, istenen deney parametrelerine göre değiştirilebilmektedir. İnkübasyondan sonra, mikrotitre plakası su ile durulanır. Su yapışkan olmayan bakterileri yıkar, ancak oluşan herhangi bir biyofilm mikrotitre plakasına bağlı kalacaktır. Kuyucuklara daha sonra 125 µl % 0.1 kristal viyole dağıtılır ve 10 dakika bekletilir. Kristal viyole biyofilmi boyayacak, ancak vinil mikrotitre plakasını boyamayacaktır [128].



Şekil 2-10. Kristal viyole yöntemi ile mikroplaklarda biyofilm oluşumunun saptanması (Çalışmamızdan).

PCR teknikleri, sadece türe özgü nükleik asit sekanslarını güçlendirerek patojenlerin tanımlanması için kullanılmaz. Aynı zamanda numunede bulunan kültürlenmemiş patojende bile biyofilm genleri gibi hedef virülans genlerini gene spesifik primerlerin kullanımı ile amplifiye ederek virülans faktörlerinin saptanması için kullanılabilmektedir [123].

Biyofilm ile ilişkili gen, biyofilm ile ilişkili genin mikroorganizmada olup olmadığını tespit etmek için kullanılan kalitatif gerçek zamanlı PCR, multipleks ve geleneksel PCR gibi PCR ile çoğaltılır. Niteliksel gerçek zamanlı PCR yerine biyofilm genini saptamak için geleneksel ve multipleks PCR protokolleri uygulanırsa, izole edilen PCR ürünü, amplifiye edilmiş genin varlığını doğrulamak için etidyum bromür gibi bir DNA ara katmanı boyası içeren bir agaroz jel üzerinde görselleştirilir. Sadece kalitatif gerçek zamanlı PCR'de amplikon, floresan boyası ile etiketlenmiş bir çift spesifik hibridizasyon probu kullanılarak floresan ile tespit edilir [123].

Rulo plaka yöntemi, kateterler ve vasküler greftler gibi silindirik malzemelerin dış yüzeyinde kalıcı cihazla ilişkili enfeksiyon geliştirme potansiyeline sahip olası mikrobiyal kolonizasyonun saptanması için uygulanır. Kateterin dış yüzeyi üzerindeki mikroorganizma kolonizasyonu, kateterin intraluminal bölgesinde mikroorganizma kolonizasyonu yerine rulo plaka yöntemi ile tespit edilmektedir. Malzemeye dokunulurak ortamın yüzeyine sarılmaktadır [121].

2.6.11. Biyofilm Tedavi

Mikroorganizmaların virülansı ve patojenitesi biyofilm içinde artmaktadır ve bu nedenle biyofilm oluşumunu ve gelişimini kontrol etmek için yeni stratejiler gerekmektedir.

Birçok patojenik mikroorganizma, biyofilmlerin içinde bulunmakta ve bu biyofilmler yeni antimikrobiyal ajanlar tasarlarken ek sorunlara neden olmaktadır [129].

Bu yüzden biyofilm içindeki mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadele etmek için alternatif iyileştirici ve profilaktik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut tedavilerin yetersiz kontrol tedariki, hastalık transferi potansiyeli ve uyum sorunu gibi sınırlamalar nedeniyle yeni stratejiler gerekmektedir [130]. Ayrıca sesil mikroorganizmaların inhibitörlere karşı yüksek direnci, biyofilmin ortadan kaldırılması için genellikle yüksek konsantrasyonda dezenfektan veya antibiyotik gerektirir, bu da ciddi çevresel hasarlara, çoklu direnç oluşumuna ve hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır [130].

Bazı antibiyotiklerin mikroorganizmayı öldürmek için hücre büyümesi gibi mutlak bir gereksinimi vardır. Penisilin ve ampisilin, hiç büyümeyen hücreleri öldürmez ve öldürme oranı bakteri üreme oranı ile orantılıdır. Daha gelişmiş β-laktamlardan, sefalosporinlerden, aminoglikozitlerden ve florokinolonlardan bazıları, büyümeyen hücreleri öldürebilir, ancak hızla bölünen hücreleri öldürürken belirgin şekilde daha etkilidirler. Yavaş büyüme faktörü öldürmeye karşı biyofilm direncine katkıda bulunmaktadır [113].

Kolistin, bir biyofilmin merkezinde yaşayan, bölünmeyen *P. aeruginosa* hücrelerine karşı aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, metabolik olarak aktif hücreler, dış zarlarındaki değişiklikler nedeniyle polimiksinlere ve diğer katyonik peptitlere hızla direnç kazanabilir [113].

Aminoglikozitler, kateterle ilişkili biyofilm enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu grup antimikrobiyallerin aktivitesi biyofilmlere karşı sınırlıdır [113].

Florokinolonlar, sadece Stafilokok biyofilmlerine karşı değil, aynı zamanda Gram negatif biyofilmlere karşı da büyük in vitro ve in vivo aktivite göstermiştir. Florokinolonlar, büyümeyen bakterilere karşı bakterisidal öldürme aktivitesi uygular ve

ayrıca ekzopolisakkaritlere nüfuz edebildikleri için olgun biyofilmlerde büyüyen belirli bakterilerin (*P. aeruginosa* gibi) sesil hücrelerine karşı belirli bir öldürücü etki gösterirler [113].

Tablo 2-3. Antibiyofilm stratejileri [131].

Tedavi / strateji	**Mekanizma**	**Örnekler**
Kimyasal (biyokimyasal)		
Önleme	Anti-adezyon	Yüzeylerin kaplanması: Klorheksidin-gümüş sülfadiazin, minosiklin-rifampin, organoselenium, triklosan, AMP'ler
		Eklentileri hedefleme: Mannositler, pilisitler, kıvrımlar
		Bağlanma moleküllerini nötralize eden antikorlar: *S. aureus* antijenlerine dayalı aşı, anti-Pseudomonas immünoglobulin Y
	Anti-matriks	Enzimler: DNAz, Dispepsin B, lizostafin
		Şelatlayıcı ajanlar: Sodyum sitrat, minosiklin-EDTA
		Matriks biyosentez inhibitörleri: Allisin
	Sinyal inhibitörleri	Halojenli furanonlar
	Karmaşık etki (sinyal interferans, yapışma önleme vb.)	Polisakkaritler: Pel, Psl, *P. aeruginosa*'dan
İnhibisyon / Eradikasyon	Antibakteriyel	Gümüş nanopartiküller
		AMP'ler: katelisidinler, kolistin, daptomisin
		Fenolik ve kuaterner amonyum katyon bileşikleri: ageloksim D, elajik asit, berberin
		Terpen tabanlı NP'ler
		Geleneksel antibiyotikler: linezolid, rifampisin, florokinolonlar
	Anti-matriks	Enzimler: DNAz, dispepsin B, aljinat liyaz
		Şelatlayıcı maddeler (kombinasyon halinde): Metaller, tetrasodyum-EDTA
	Anti-virülans	Nötralize edici antikorlar: β- laktamaz spesifik antikor
	Sinyal inhibitörleri	Dağıtıcı sinyalleri, çekirdek algılama ve c-di-GMP'yi (siklik diguanilat) etkileyen: Azitromisin, ajoen, D-amino asitler, norspermidin, furanonlar, RNA III inhibe edici peptid ve hamamelitannin
Fiziksel (biyofiziksel)		
Önleme	Non-invaziv sterilizasyon	Yüzeylerin ultraviyole C tedavisi
	Değiştirilmiş yüzey topografyası	Bağlantı engelleyici anodik nano gözenekli yüzeyler, "köpekbalığı" mikro modeli
	İlk bağlanmanın geri çekilmesi	Düşük enerjili yüzey akustik dalgaları
Eradikasyon	Fiziksel eksizyon	Cerrahi
	Mikro kabarcıklarla yıkım	Ultrason
	ortam elektrolizi / geliştirilmiş antibiyotik bağlama / artış matris geçirgenliği	Elektrik alanı: Alternatif, doğrudan akımlar ve üst üste binen potansiyeller
Biyolojik		
Önleme		Probiyotikler: Lactobacillus, Bifidobacteria
Eradikasyon		Kombinasyon tedavisinde bakteriyofajlar

2.6.12. Biyofilm Kontrol Stratejileri (Biyofilm inhibisyon ve eradikasyon çalışmaları)

Biyofilmler, yalnızca insanlardaki enfeksiyonların çoğuyla ilişkili oldukları için, aynı zamanda da bağışıklık tepkilerine ve antimikrobiyallere karşı doğal toleransa sahip olmalarından dolayı tedavi edilmeleri son derece zordur. Biyofilmleri inhibe eden veya dağıtan anti-biyofilm ajanlarının geliştirilmesi, önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Fakat bunların doğasında bulunan antimikrobiyal aktivite eksiklikleri, antibiyotiklerle birlikte kullanılmalarını gerektirmekte ve bu da onları klinik olarak güvenilir bağımsız bir çözüm sunmaktan alıkoymaktadır [132].

Biyofilm eradikasyon ajanlarının avantajı, diğer ilaçlarla takviye gerektirmemeleri ve özellikle biyofilm barındıran hücreleri hedef alacak şekilde tasarlanmış olmalarıdır. Birçok biyofilm eradikasyon ajanı, antimikrobiyal peptidler (AMP) ve nitroksit ile işlevselleştirilmiş antibiyotikler gibi hem anti-biyofilm hem de biyofilm yok etme aktiviteleri sergilemektedir [132].

LL-37, biyofilm eradikasyon potansiyeline sahip olduğu bildirilen ilk AMP' lerden biriydi. Cohen tarafından yapılan bir çalışmada, LL-37'nin 556 μM konsantrasyonda bir in vivo hayvan modelinde *P. aeruginosa* biyofilmlerini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [132].

Biyofilmlerle savaşmak için yeni hedeflerin belirlenmesi, birçoğu biyofilm aracılı olduğu bilinen bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmek için değerli bir araçtır. Biyofilm oluşumunu engelleme ve / veya yerleşmiş biyofilmleri ortadan kaldırma stratejileri, biyofilm bakterilerine karşı etkisiz olan antibiyotiklerin etkinliğini arttırarak insan üzerinde derin bir etki yaratma potansiyeline sahiptir [113].

Biyofilm kontrolü için kullanılan müdahale stratejileri arasında, cihaz kontaminasyonunun önlenmesi; cihaza ilk mikrobiyal hücre bağlanmasının en aza indirilmesi; biyofilm ile ilişkili hücrelerin öldürülmesi; veya cihazın (ve ilişkili biyofilminin) çıkarılması gibi yöntemler vardır [113].

Günümüzde bakteri infeksiyonlarına karşı mevcut antibiyotiklerle uygulanmaya devam edilen tedavi yöntemlerine alternatif olarak, yeni tedavi stratejilerinin etkinliklerini artırması için, biyofilm büyümesinin önlenmesi, biyofilm parçalanması ya da biyofilm eradikasyonuna yol açan faktörler araştırılmaktadır. Bu faktörler, sodyum

tuzları enzimler, kitosan türevleri, metal nanopartikülleri, antibiyotikler, asitler veya bitki özütlerini kapsamaktadır [133].

Alternatif bir yaklaşım, bakteriyel iletişim sistemini (çekirdek algılama, QS) hedeflemektir. QS, bakterilerin sinyal moleküllerini üretip tespit ettikleri ve böylece davranışlarını hücre yoğunluğuna bağlı bir şekilde koordine ettikleri bir süreç olarak tanımlanmaktadır. QS'in biyofilm oluşumu, sürdürülmesi ve dağılmasındaki rolü hakkında öğrenilecek çok fazla bilgi olmasına rağmen, QS inhibitörleri (QSI) umut verici antibiyofilm ajanları olarak önerilmiştir. QS inhibisyonu, sinyal sentezinin engellenmesi veya sinyalin doğrudan bozulması, sinyal molekülünün reseptöre bağlanmasının inhibisyonu ve / veya sinyal transdüksiyon kaskadının inhibisyonu ile elde edilebilir [134].

QS sisteminde birçok potansiyel hedef bölgenin varlığının bulunduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa*'da *in vivo* olarak gerçekleştirilen kromozomal *lasI* ve *rhlI* genlerinde sağlanan mutasyonların, otoindükleyici sentezini ve virülans genlerinin ekspresyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği bilinmektedir [135].

Biyofilm matrisi DNA, proteinler ve hücre dışı polisakkaritlerden oluştuğu için, son çalışmalar biyofilm yapısının bozulmasının, bireysel biyofilm bileşiklerinin çeşitli enzimler tarafından bozunmasıyla sağlanabileceğini göstermiştir [133].

Filogenetik olarak farklı bakteriler tarafından kullanılan biyofilm dağılımının temel bir mekanizması, biyofilm matrisindeki yapışkan bileşenleri parçalayan hücre dışı enzimlerin üretilmesidir. Biyofilm matrisi biyofilm kolonisi içindeki bakteri hücrelerini kapsadığından, matrisin bozulması hücrelerin koloniden ayrılmasına ve çevreye salınmasına neden olur. Aktif biyofilm dispersiyonunda rol oynayan matris parçalayıcı enzimler arasında glikozidazlar, proteazlar ve deoksiribonükleazlar bulunur [136].

Sürfaktanlar genellikle gıda ile temas eden yüzeylerin temizlenmesi için kullanılan kimyasal ürünlerdir. Yüzeylerin fizikokimyasal özelliklerini bakteriyel etkileşimleri ve adhezyonu değiştirerek biyofilm yapısına etki edebilirler. Biyosurfaktanların antiadhesiv özellikleri, yüzeye, mikroorganizmanın bulunduğu sıcaklığa, tipine ve surfaktanın konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir [137].

Surfaktin; Bacillus subtilis tarafından üretilen bir biyo yüzey aktif maddenin *E. coli, Proteus mirabilis* ve *S. typhimurium*'da biyofilm dağılımını engellediği gösterilmiştir [138].

Bitki ekstreleri anti-QS, antiseptik ve antivirulans özelliklere sahiptir. Biyofilm oluşumunu kolayca engelleyebilir ve olgun biyofilm yapısını bozabilir. Bu nedenle, bitki ekstreleri, antibiyotikler veya fotodinamik inaktivasyon gibi diğer antimikrobiyal stratejilerle kombinasyon halinde, çeşitli bakteriyel ve maya enfeksiyonlarının tedavisi için etkili bir bakteri yok edici araç olarak fayda sağlayabilir [133].

Yapılan bir çalışmada, greyfurt suyundan elde edilen ve kanın pıhtılaşmasını önleyen furokumarin denen maddenin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*'da biyofilm oluşumunu engellediği rapor edilmiştir [139].

Allium sativum özütü yani taze sarımsak özütünün biyofilm oluşumuna karşı potansiyel bir inhibitör etkiye sahip olduğu ve, *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir [138].

Kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın üretmiş ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşiklerinin insan patojeni *P. aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens*'de quorum sensing moleküllerini inhibe ettiği gösterilmiştir [95].

Lipozomlar, biyo-uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen, sulu hidrofilik çekirdek ve lipofilik çift katlı lipid tabakalarından oluşan küresel şekilli veziküllerdir [140]. Lipozomların kullanımının, antibiyotiklerin etkinliğine katkıda bulunmak için uygun bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Lipozomlar, ilaç moleküllerinin taşıyıcısı olarak görev yaparlar, bu da yaşam sürelerini arttırır ve konakçıdaki toksisiteyi azaltır. Lipozomla kapsüllenmiş antimikrobiyal ajanlar, insanlarda ve hayvan modellerinde başarıyla test edilmiştir ve protozoa, mantar ve bakteriyel enfeksiyonları ortadan kaldırmaya yöneliktir. Lipozomlar, oluşan biyofilmin ortadan kaldırılmasında uygulanabilir, çünkü antibiyotik bir lipozom taşıyıcı içinde kapsüllendiğinde EPS ile etkileşime girmez, antibiyofilm etkisini arttırır ve biyofilm matrisinde ortaya çıkabilecek antibiyotik inaktive edici enzimler (β-laktamazlar gibi) tarafından bozulmaya karşı korunur [141].

Lipozomların yanı sıra, tasarlanmış nanoparçacıklar ilaç taşıyıcı araçlar olarak araştırılmıştır. Nanopartiküller, makromoleküler maddelerden yapılmış katı, kolloidal

partiküllerdir ve normal olarak 200 nm'den küçüktür. İlgilenilen bileşik, bir nanomatriks üzerine adsorbe edilir veya tutturulur veya onun tarafından tutulur veya kapsüllenir [142]. Bu parçacıklar bakteriyel hücrelere bağlanma ve nüfuz etme, bakteri zarını bozma ve kromozomal DNA ile etkileşme kapasitesine sahiptir [141].

Gümüş nanoparçacıkları gibi nanoparçacıklarla kaplama, antioksidan nanoparçacıklar da biyofilm oluşumunun önlenmesi için kullanılabilir. Bununla birlikte, kaplama stratejisi, yüzey hızlı bir şekilde aşındığından ve bu yüzden de biyofilm oluşumu için kullanılabilir hale geldiğinden zorluklarla karşılaşılmıştır [118].

Bakteriyofajlar bakterilerin doğal avcılarıdır. Özellikle bakterileri enfekte eden virüslerdir. Bunlar arasında, litik fajlar normal bakteriyel metabolizmayı bozabilir ve viral replikasyonu destekleyebilir. Biyofilmi kontrol etmelerine izin veren faj özellikleri, enfeksiyon bölgesinde replikasyon kapasitesi, biyofilm matrisinin EPS'sini bozan enzimlerin (depolimerazlar) üretimi ve biyofilm yoluyla yayılma kapasiteleridir [141].

Bakteriyofajlar, kimyasal ajanlardan ve antibiyotiklerden faydalıdır. Bakteriyofajın izolasyonu basit ve hızlıdır, ayrıca üretimi de ucuzdur ve bunlar bir konakçıya veya konakçı aralığına karşı çok farklıdır, bu nedenle normal florayı bozmaz [138].

Faj terapisi, çok ilaca dirençli bakteriler de dahil olmak üzere bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak için litik fajların kullanımına dayanır ve antibiyotiklerle karşılaştırılmış birçok avantaja sahiptir: konakçının doğal florasının tahribatını azaltan hedef bakterileri için çok spesifik ve etkilidir; insan için patojenik değildirler; ve sadece hedeflenen bakteri mevcut olduğu sürece devam ederler [143].

Biyofilmlerin konak savunmalarından sağladıkları doğal koruma nedeniyle ortadan kaldırılması zordur. Bu koruma yöntemi, biyofilmlerin humoral konak yanıtından kaçınma yetenekleri ile ilgilidir [117].

Antimikrobiyal ajanlar (antibiyotikler, oksidanlar ve biyositler), yüzey modifikasyonları ve elektro ilişkili yöntemler bakteriyel yapışmayı kontrol etmek için kullanılabilir [144].

Biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan antibiyotik ile tedavi yöntemi biyofilmlerin bakterileri antimikrobiyallere karşı koruyabilme yeteneği ve dirençli

mikroorganizmalar oluşturmasından dolayı günümüzde artık tek başına yetersiz bir tedavi yöntemi olmaya başlamıştır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde başarısız olan antibiyotikler, olası antibiyofilm ajanlarıyla kombine edilirse antibiyotiklerin etkisini de artıracağı düşünülmektedir. Bu durumda antibiyofilm ajanlarını biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir hale getirecektir [145].

Günümüzde yapılan çalışmalar, toksik olmayan antibiyofilm ajanlarının geliştirilmesine odaklanmaktadır.Bunun sebebi ise bu tür moleküllerin gelecekte ilaç direncine yol açmayacağına inanılmasından kaynaklanmaktadır [145].

İmidazol, fenoller, indol, triazol, sülfid, furanon, bromopirol, peptidler gibi kısımları içeren bu yeni antibiyofilm ajanları, bakteriyel biyofilmleri in vivo dağıtma potansiyeline sahiptir ve gelecekte insan tıbbını olumlu yönde etkileyebilir [145].

2.7. Meropenem

Meropenem, 1990'larda parenteral karbapenem olarak dünya çapında klinik kullanıma girmiştir. Fiziksel olarak, beyaz veya açık sarı kristal bir tozdur ve $C_{17}H_{25}N_3O_5S.\ 3H_2O$ moleküler formülü ile trihidrat formunda mevcuttur [146].

Meropenem güvenli ve iyi tolere edilen bir antibiyotiktir ve 25 yıldan uzun süredir piyasada bulunmaktadır. Karbapenem ailesinden olanlar dahil diğer antibiyotiklerle karşılaştırıldığında, benzer veya daha iyi bir terapötik etkiye ve güvenli bir profiline sahiptir. Meropenem, geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir ve hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı aktiftir. Etki mekanizmasının çalışması şu şekilde açıklanmaktadır; penisilin bağlayıcı proteinleri bağlayarak ve inaktive ederek bakteri hücre duvarı sentezini engeller [146].

Spektrumun genişliği kısmen üçüncü nesil sefalosporinleri hidrolize edenler de dahil olmak üzere tüm serin bazlı β-laktamazlara karşı kararlılığa bağlıdır. Meropenem, imipeneme benzer geniş ölçüde bir antibakteriyel spektruma sahiptir, ancak Stafilokok ve Enterokoklara karşı biraz daha az aktifken, *P. aeruginosa*'ya, tüm Enterobactenaceae ve *Haemophilus influenzae*'ya karşı daha aktiftir [147].

Yüksek aktivitesi, hücre lizizi ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere başlıca penisilin bağlayıcı proteinler için iyi afinite ve bakterilere giriş kolaylığı ile açıklanmaktadır [147].

Meropenem, bakteri hücrelerine dış zar porininden girer. Bakterisidal etkinliği zamana bağlıdır; bu nedenle, dozaj aralığı sırasında serbest ilaç konsantrasyonları minimum inhibe edici konsantrasyonun üzerinde olduğunda, ilaç inhibe edici etkiler daha etkilidir [146].

Meropenem çoğu vücut sıvısına ve dokusuna hızla nüfuz eder ve esas olarak vücuttan böbrekler yoluyla atılır; bu nedenle, böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalar için genellikle doz ayarlaması gereklidir. 6-trans hidroksietil grubu sayesinde penisilinazlar ve sefalosporinazlar gibi çeşitli hidrolize edici β-laktamazlara dirençlidir. Isı ve nem, antibakteriyel aktivitesi için gerekli olan antibiyotiğin temel unsuru olan β-laktam halkasının bozulmasına neden olur [146].

Meropenemin, karın içi, merkezi sinir sistemi, alt solunum yolu, deri ve yumuşak doku, idrar yolu ve ateşli nötropenik enfeksiyonları olan ciddi hastaları içeren klinik çalışmalarda mükemmel etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Diğer geniş spektrumlu ajanlara göre birçok olumlu niteliğe ve bazı potansiyel avantajlara sahip olmasına rağmen, klinik uygulamadaki optimal yerini tanımlamak için ek çalışmalar ve klinik deneyim gereklidir [148].

2.8. Siprofloksasin

Siprofloksasin 2. kuşak kinolon grubu antibakteriyel ajanların içinde yer almaktadır. Aynı zamanda florlanmış kinolonların, 4-kinolonlar, kinolon karboksilik asitler de denilen türevlerindendir. Kinolonlar DNA giraz (topoizomeraz II) enzimini inhibe ederek DNA replikasyonunu bozarlar. Kinolonlar 4 kuşak olarak sınıflandırılmaktadır ve siprofloksasin 2. Kuşak kinolonlar içerisinde yer almaktadır. Bakterisidal aktiviteye sahip, sentetik, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Geniş etki spektrumu, iyi doku geçişi, uzun yarı ömrü olması ve yan etkilerinin az olması nedeni ile öne çıkan bir antibiyotiktir. İkinci kuşak kinolonların (siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin) Gram negatif etkinliği daha iyi olmakla birlikte Gram pozitif etkinlikleri de bulunmaktadır. Anaerob etkinlikleri bulunmamaktadır ve siprofloksasin güçlü bir anti-pseudomonal etkiye de sahiptir [149].

Siprofloksasin (CIP), solunum yolu hastalıkları ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan florokinolon sınıfından bir antibiyotiktir. DNA replikasyonunu ve onarım süreçlerini bozarak bakteri üremesini durdurur. Bu ilacın etki şekli, prokaryotik DNA girazın engellenmesidir [150].

Florokinolonlar, insan ve veterinerlik tıbbında yaygın olarak kullanılan önemli bir antibiyotik grubudur. Bu grup içinde, siprofloksasin (CIP), Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş aktivite spektrumu ve iyi oral alım özellikleri nedeniyle en sık reçete edilen bileşiklerden biridir. Uygulamadan sonra, CIP vücutta tamamen metabolize olmaz ve büyük ölçüde farmakolojik olarak aktif formunda atılır. Ek olarak, CIP'nin UV ile görünür ışığa duyarlı olduğu gösterilmiştir [151].

Bununla birlikte, CIP hem prokaryotik hem de ökaryotik testte genotoksik etkilerle ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, CIP dahil olmak üzere belirli FQ'lar, zararlı çevresel etkileriyle bilinir. CIP, biyosferde halihazırda gösterilmiş seviyelerde bile ciddi çevresel riskler oluşturabilir [150].

2.9. Tobramisin

Tobramisin, aminoglikozitler olarak bilinen geniş spektrumlu antibiyotikler sınıfına aittir. Tobramisin dahil bu sınıftaki antibiyotiklerin çoğu bakterisidaldir. Aerobik Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarına nüfuz etmek için beta-laktamlarla sinerjik olarak çalışırlar [152].

Özellikle Gram negatif aerob basillere, Stafilokoklara ve Mikobakterilere karşı etkili antibiyotiklerdir. Anaerob bakterilere ve Gram pozitif basillerin çoğuna karşı etkileri yoktur. Tobramisin Pseudomonas enfeksiyonlarında öncelikli olarak tercih edilmekte olan bir antibiyotiktir [149].

Tobramisinin etki mekanizması şu şekildedir; bakteriyel 30s ribozomal biriminin 16s ribozomal RNA'sına bağlanır ve translasyonun başlama adımını inhibe eder. Aminoglikozitler daha sonra translasyonun başlama kompleksini bağlamak ve inaktive etmek için bakteriyel hücre membranı boyunca aktif olarak taşınır. Tobramisin, A bölgesine bağlanarak yanlış translasyona neden olur ve kodonun transfer RNA tarafından yanlış okunmasına neden olarak aminoasil birimlerinin yanlış iletilmesine neden olur. Yanlış sentezlenen proteinler hücre içinde birikerek hücre zarını ve çeşitli hücresel işlemleri bozarak tobramisini bakterisidal bir ajan olarak tanımlamaktadır. Tobramisin, yüzeysel enfeksiyonlardan derin enfeksiyonlara kadar çeşitli koşulları tedavi etmek için reçete edilmiştir. İnhale tobramisin, *P. aeruginosa* ile altı yaşında veya daha büyük bireylerde kistik fibrozun yönetimi için FDA onaylıdır [152].

Tobramisinin etkisini değiştiren ve azaltan üç enzim sınıfı arasında aminoglikosit fosfotransferazlar(APH'ler),nükleotidiltransferazlar (ANT'ler) ve asetiltransferazlar (AAC'ler) bulunur [152].

Biyofilm içeren bakteriler, aminoglikozitlere karşı daha büyük bir dirence sahiptir. Bazı *P. aeruginosa* suşları, enzim modifikasyonu ve ilaç için dış membran geçirgenliğini azaltarak aminoglikozid direnci geliştirmiştir [152].

2.10. Elajik Asit

Elajik asit (EA), çeşitli meyveler, narlar ve kurutulmuş meyvelerde yüksek miktarda bulunan güçlü antioksidan ve antikanser özelliklerine sahip doğal olarak oluşan bir polifenolik bileşiktir [20]. Bitkilerde çeşitli EA türevleri bulunmaktadır ve EA'in yapısında bulunan hidroksil gruplarının metilasyonu, glikosilasyonu ve metoksilasyonu yoluyla oluşmaktadır. Bu türevlerin kimyasal özellikleri bitkilerde veya hayvan türlerinde farklıdır. Serbest ve glikosile edilmiş formlarda veya ellagitanninler adı verilen bir şekerle esterleştirilmiş kompleks polimerler formunda bulunabilmektedir. EA, asidik yapısı nedeniyle bazik çözücülerde daha fazla çözünürlüğe sahiptir [153].

EA'in antimikrobiyal etkisinin, mikrobiyal adezinleri, enzimleri ve hücre zarfı taşıma proteinlerini inaktive etme kabiliyeti ile ilgili olduğu düşünülmektedir. EA'ın kısmi hidrofobikliği, bakterinin membran-su arayüzünde aktif olmasına ve membrana dahil olmasına izin vererek membranın bozulmasına veya kararsız hale gelmesine neden olmaktadır. Böyle bir etki mekanizması özellikle Gram negatif bakterileri inhibe etmek için önemlidir, çünkü dış lipopolisakkarit tabakası oldukça hidrofobiktir [153]. EA ayrıca Gram negatif bakterilerin zarındaki bazı önemli iyon kanallarını bozarak da bakterilere tuz toleransı sağlayabilmektedir [153].

EA'ın antitümör aktivitesi çoğunlukla doğrudan antiproliferatif ve apoptotik etkilere bağlanmıştır. Ayrıca EA, tümör hücre göçünü, hücre dışı matris invazyonunu ve anjiyogenezi, tümör infiltratif davranışı ve metastatik süreç için çok önemli olan tüm süreçleri inhibe edebilmektedir. EA, kemoterapi ve radyoterapiye tümör duyarlılığını da artırabilmektedir [20].

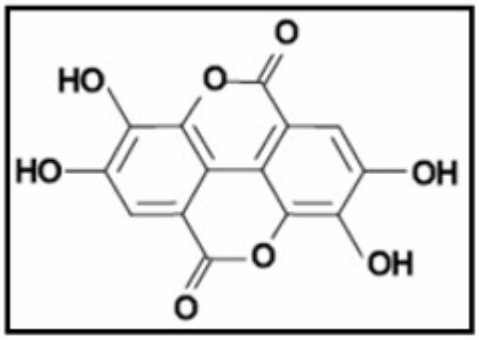
Terminalia chebula Retz. meyvesinden elde edilen elajik asit türevlerinin ve ayrıca Callistemon viminalis, Bucida buceras ve Conocarpus erectus'tan elde edilen sulu ekstrelerin *P. aeruginosa*'nın QS inhibisyonu için rapor edilmiştir [21].

Elajik asit türevleri Rh1R ve LasR'yi bozarken, aynı zamanda virülans faktörlerinin üretimini azalttığı ve *P. aeruginosa* biyofilminin PAO1 suşunun tobramisin tedavisine duyarlılığını artırdığı da gözlenmiştir [21].

Ayrıca çeşitli *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumu, polifenol ellagik asit ve glikosile türevler açısından zengin Rubus ulmifolius Schott., Rosaceae ekstraktları tarafından inhibe edildiği yapılan araştırmalarda gözlenmiştir. Elajik asidin tek başına da antibiyofilm özelliklerine sahip olduğu da gösterilmiştir [154].

Yapılan çalışmalarda EA'in kronik pankreatite karşı koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir [155]. Ayrıca EA'in Alzheimer hastalığı üzerinde de olumlu etkileri olduğu yapılan araştırmalarda gözlenmiştir [156].

Helicobacter pylori ile yapılan bir başka çalışma ise elajik asit tedavisi üzerine *H. pylori'*nin morfolojik değişiklikler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Elajik asit ile muamele edilen *H. pylori*, yaşama kabiliyetinin kaybı ile ilişkili olduğu bilinen kokoid formları gösterdiği gözlenmiştir [157].



Şekil 2-11. Elajik asitin kimyasal yapısı

2.11. Furanon

Avustralya kırmızı makroalgi Delisea pulchra (D. pulchra), antifouling ve antimikrobiyal özellikler sergileyen bir dizi halojenli furanon bileşiği üretmektedir. Bu tür ikincil metabolitler - furanonlar - deniz yosunu D. pulchra tarafından üretilmektedir [13]. Delisea cinsi, hem doğal hem de uygulamalı anlamda ve hem ekolojik hem de moleküler seviyelerde ilginç biyolojik aktivitelere sahip bir dizi benzersiz doğal ürün olan halojenli furanon veya "fimbrolid" üretir [158]. D. pulchra, özel veziküllerde depolanan en az 30 farklı halojenli furanon bileşiği türü üretir. Saha deneyleri, furanonların yüzey konsantrasyonunun, deniz bakterileri tarafından kolonizasyon derecesi ile ters orantılı olduğunu göstermiştir [159].

Furanonun bu yosunların bakteriler tarafından kolonize edilmesini önlemekte katkı sagladığı gözlenmiştir [160]. O zamandan beri, sentetik bromlu furanonların, bakterisidal olmayan konsantrasyonlarda farklı bakteri türleri tarafından biyofilm oluşumuna karşı kullanımda ve biyofilmdeki bakterilere karşı antibiyotik ve dezenfektanların etkisini güçlendirmede ümit verici olduğu düşünülmüştür [161].

Yapısal olarak bakteriyel açil homoserin laktonlara (AHL) benzerler. AHL, hücre popülasyon yoğunluğundaki değişiklikler üzerine salınmaktadır ve LuxR ailesinin transkripsiyon faktörlerine bağlanıp, QS kontrollü genleri indüklemektedir. Gram negatif bakteriler, ökaryotlar ve bitkilerle etkileşime girebilmek için AHL'ye bağlı ilişkileri kullanmaktadır. Bu nedenle deniz yosunları, bakteri kolonizasyonunun olumsuz etkisine yanıt olarak AHL antagonistleri olarak halojenli furanonları geliştirmiştir [162].

Bazı QS sistemlerini bozduğu belirlenen mikrobiyal kolonileri uzak tutmasıyla tanımlanan Delisea pulchra'nın doğal furanonlarında, *B. subtilis, E. coli,* ve *P. aeruginosa*'ya karşı in vitro antibiyofilm etkisi saptanmıştır. Furanonların antibiyofilm etkilerinden dolayı biyofilmlere karşı klinik implantlara yerleştirilebiliceği de düşünülmektedir [163].

D. pulchra'dan elde edilen doğal bileşik olan (5Z) - 4-bromo-5- (bromometilen) - 3-butil 2 (5H) -furanonun, hem asil-homoserin lakton bazlı hem de otoindüktör- 2 bazlı QS'yi inhibe ettiği gözlenmiştir [22].

Furanon türevlerinin farklı bakterilerde biyofilm üretimi de dahil olmak üzere çeşitli AHL-aracılığı ile gelişmekte olan virulans faktörlerinin sentezinin engellenemesinde etkili olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda bu moleküllerin temel etki mekanizmasının LuxR proteininin parçalanmasının artmasında fayda sağlaması olduğu belirlenmiştir [160].

Delisea pulchra'nın ürettiği ve veziküllerinde depoladığı furanon bileşiklerinin *P. aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens*'de de QS moleküllerini inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir [95].

Delisea pulchra, Gram negatif bakterilerin genel metabolizmalarını veya büyümelerini değiştirmeden bir AHL sistemi ile ekileşimini önlemek için değişken potansiyele sahip 30' dan fazla furanon üretmektedir [162].

Bu bileşiklerin biyolojik aktivitesinin en önemli özelliklerinden biri, bakteriyel sinyal aracılı çekirdek algılama sistemlerine müdahale edebilmeleri ve böylece bakterilerin yüzeyleri kolonize etmek için kullandığı bir dizi fenotiplere müdahale edebilmeleridir. Furanonlar özellikle AHL tarafından düzenlenen quorum sensing sistemine müdahale etmektedir [158]. Çeşitli çalışmalar, sentetik furanonların çeşitli bakterilerin biyofilm oluşumunu inhibe etme kabiliyetini bildirmiştir. Birçok furanon türevinin, Gram-negatif bakterilerin quorum sensing sistemlerine müdahale ederek biyofilm büyümesini engellerken, bazı furanonların *Bacillus subtilis* ve Staphylococci tarafından biyofilm oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir [164].

Yapılan araştırmalarda furanonun, Pseudomonas'ta virülans faktör üretimini ve patogenezi ,*E. coli'* de de biyofilm oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir [162].

1996'da tanımlanan doğal halojenli furanonların yapısı sentetik quorum sensing inhibitörleri için bir araç olarak kullanılmıştır. Hentzer ve arkadaşları [165], en verimli modifiye edilmiş furanon bileşiği C-30 ile tedavi edilen *P. aeruginosa* biyofilminin tobramisin tedavisine çok daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca en önemlisi, pulmoner bir fare enfeksiyonu modelinin tedavisi, C-30'un, tedavi edilmeyen kontrol faresine kıyasla enfekte edici bakterilerin etkili bir şekilde temizlenmesine sebep olduğunu göstermektedir [166].

Furanonlar, Gram-negatif bakterilerdeki açil homoserin lakton düzenleyici sistem olan önemli bir bakteriyel çekirdek algılama yolu ile etkileşime girerek bakteri kolonizasyonunu ve biyofilm gelişimini engeller. Ayrıca Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerdeki alternatif AI-2 sinyalizasyon sistemine müdahale ederler. Sentetik programlar, yüzeye bağlı furanonlar dahil olmak üzere 200'den fazla furanon ve furanon-analoglarından oluşan bir kütüphane geliştirmiştir. Bu furanon analogları güçlü anti-enfektiflerdir ve gen mikrodizileri kullanılarak in-vitro ve fare modelleri kullanılarak in-vivo gösterildiği gibi Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerdeki patojenik fenotipleri inhibe eder [158].

Yapılan bazı çalışmalarda da furanon türevlerinin gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal aktivite sergilediği bildirilmiştir [164].

Furanon analogları, özellikle aynı kökenli AHL sinyallerine en az benzerlik gösteren furanon C-30, 1–10 μM aralığında *P. aeruginosa*'da QS'yi bloke eden en güçlü

QS inhibitor aktivitesini gösterir. Geleneksel antibiyotiklerin aksine, sentetik furanonlar planktonik ve biyofilm gömülü hücreler üzerinde eşit derecede aktiftir [158].

Planktonik hücrelerde çekirdek algılama kontrollü gen ekspresyonunu önemli ölçüde azaltan konsantrasyonlarda sentetik furanonların, çok farklı büyüme şekillerine rağmen biyofilm bakterilerine karşı eşit derecede aktif oldukları dikkat çekicidir. Buna karşılık, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tobramisin ve piperasilin gibi klasik antibiyotikler, biyofilm bakterilerini öldürmek için planktonik muadillerini öldürmekten 100 ila 1.000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda gereklidir [165].

Bazı çalışmalarda makrolit antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'da AHL sentezini inhibe ettikleri gözlenmiştir. Örneğin, eritromisinin *P. aeruginosa*'da AHL sinyallerini baskıladığı gözlenmiştir [13].

Furanonlar patojenik özellikler üzerindeki etkileri açısından geniş ölçüde araştırılmıştır, ancak en büyük odak noktası Gram-negatif patojen *P. aeruginosa* olmuştur. *P. aeruginosa*, bağışıklık yetersizliği olan hastaların hastane enfeksiyonlarında ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarında bulunan en yaygın Gram-negatif bakterilerdir [104].

Furanonlarla ilgili yapılmış olan araştırmalar, kırmızı bir deniz algi olan D. pulchra'dan elde edilmiş halojenlenmiş furanonların bazı bakterilerdeki QS sistemini inhibe ettiğini açıklamaktadır [167].

Ayrıca biyomalzemelerde furanonlar gibi çekirdek algılayıcı inhibitörlerin kullanılması, biyomalzemeler üzerinde zararlı biyofilmlerin gelişmesini önleme potansiyeli sunmaktadır [158].

Yapılan bir başka çalışmada, kateter yüzeyi sentetik bir QS inhibitörü furanon ile tedavi edilmiştir. Furanon bileşiklerinin kullanımı biyofilm inhibisyonu için uygundur çünkü biyofilm oluşturan bakteriler bunlara karşı direnç geliştiremeyecektir [163].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Steril plastik öze (Looplast,Italy)
- Vorteks (Dlab Scientific)
- İnkübatör (36±2°C) (Nüve)
- -20°C, +4°C (Nüve)
- Pipet uçları (10-100-1000 µL) (Isolab)
- Hassas Terazi (KERN)
- Steril cam baget
- Serum Fizyolojik
- Eppendorf tüpler (Laborant)
- Otoklav (Nüve)
- Pasteur Fırını (Nüve)
- Steril Kabin (Nüve)
- Spektrofotometre (ThermoScientific)
- Mikropipetler (Transferpette)
- pH metre (Macharey Nagel)
- 96 kuyucuklu steril mikroplak
- Petri kutusu (Isolab)
- Çalkalamalı etüv (FinePCR)
- Distile su cihazı (Merck)
- Cam tüpler
- Balon joje

3.1.1. Kimyasal Maddeler

- DMSO (Neofroxx, Germany)
- Kristal viyole
- % 99 methanol
- Absolute ethanol

3.1.2. Antibiyotikler

- Tobramisin (Glentham, UK)
- Siprofloksasin (Himedia)
- Meropenem (Glentham, UK)

3.1.3. Çalışmada kullanılan doğal bileşikler

- Furanon (Sigma Aldrich, Germany)
- Elajik asit (Cayman Chemical, USA)

3.1.4. Besiyerleri

- Tryptic Soya Agar (Condalab, Madrid)
- Tryptic Soya Broth (Condalab, Madrid)

3.1.5. Mikroorganizma

- *P. aeruginosa* (ATCC BAA-47)

3.1.6. Çözeltiler

- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (PBS) (MP Biomedicals)
- MTT solüsyonu (Boster Bio, USA)
- Formazan çözündürme solüsyonu (Boster Bio, USA)

3.1.7. Çalışmada Kullanılan Bakteri

Çalışmamızda biyofilm yapan *P. aeruginosa* ATCC BAA- 47 standart suşu kullanılmıştır.

3.1.8. Bakteri Suşunun Toplanması ve Saklanması

P. aeruginosa ATCC BAA-47 standart suş tedarikçi firmanın talimatları doğrultusunda sulandırılmıştır. Stok kültürler oluşturmak için pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işlemi için Tryptic soya agar kullanılmıştır.Üreyen mikroorganizmalar öze yardımı ile alınarak % 30'luk gliserinli Brucella Broth içerisinde uzun sureli saklama amacıyla -80^{o} C' de muhafaza edilmiştir. Gerektiğinde çıkarılarak Tryptic soya agara ekim yapılmıştır ve 37^{o}C'de etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.9. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Tryptic soya agara ekilen bakteri öze yardımıyla alınarak serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan bir

öze dolusu alınarak Tryptic soya brotha ekim yapılmış ve çalkalamalı etüvde 37°C' de 0.5 McFarlanda ulaşana kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bu bakteri süspansiyonu 1/200 oranında TSB ile dilüe edilerek $5x10^5$ CFU/ml ayarlanmıştır.

3.1.10. Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm besiyerleri 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.11. Kristal Viyole Hazırlanması

Biyofilm oluşumunu gözlemlemek için kullanılan Kristal Viyole 100 ml'de 1 gram olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.12. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

EA, F, MEM, CIP ve TOB toz halinde bulunan kimyasallar, hassas tartıda istenilen miktarda tartılarak hazırlanmıştır. Stok çözeltileri üretim parti numarasına ait potensleri göz önüne alınarak hazırlanmıştır. Standart çözelti hazırlamak için gerekli olan sulandırıcı miktarı CLSI M27-A3'de bulunan aşagıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. MEM, CIP ve TOB distile su içerisinde çözündürülmüştür. EA, DMSO ile F, absolute ethanol ile çözdürülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır.

$$\textbf{Kütle (mg)} = \frac{\text{İstenilen konsantrasyon (µg/mL)} \times \text{Çözücü hacmi (mL)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Çözeltilerin sulandırımları aşağıdaki tabloya göre istenilen konsantrasyonlarda hazırlandı.

Tablo 3-1. Antibiyotik sulandırım tablosu [168]

Stok antibiyotik çözeltisi konsantrasyonu mg/L	Stok antibiyotik Çözeltisi hacmi mL	TSB hacmi mL	Antibiyotik çözeltisinin son konsantrasyonu mg/L
5120	1	9	512
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0.5
1	1	3	0.25
1	1	7	0.125

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Biyofilm Oluşumunun Tespiti

P. aeruginosa suşu Tryptic soya agar (TSA) besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürden öze ile alınarak tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık standardına (1 x 10^8 kob / mL) eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu alınarak Tryptic soya broth (TSB) içerisine ekim yapılmıştır ve 0.5 McFarland bulanıklık standartına ulaşana kadar çalkalamalı etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bakteri süspansiyonu önce 1/100 oranında daha sonra 1/2 oranında TSB dilüe edilerek bakteri sayısı 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. U tabanlı mikroplak kuyucuğuna hazırlanan süspansiyondan 200 µL konularak 37 ºC'de 18 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak 200 µL TSB besiyeri konulmuştur.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar otomatik mikropipet yardımı ile nazikçe boşaltıldıktan sonra tutunamayan hücrelerin uzaklaştırılması için mikroplak 250 µL PBS ile iki kez yıkanmış ve havada kurutulmuya bırakılmıştır. Mikroplak kurutulduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 99'luk metanol eklenip 15 dakika bekletilmiş ve kuyucuklar boşaltıldıktan sonra mikroplak oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Mikroplak kuruduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 1'lik kristal viyole

eklenip 15 dakika bekletilmiştir. Boyanın fazlası su ile yıkanıp uzaklaştırılarak plak kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklara Kristal viyolenin çözünmesi amacıyla 200 µL % 96'lik etanol eklenip 30 dakika bekletilmiştir ve süre sonunda mikroplak okuyucuda 595 nm'de okutulmuştur. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlara göre aşağıdaki formül uygulanarak eşik değer belirlenmiştir [14].

Eşik değer=Negatif kontrol kuyucuklarının OD ortalaması +3 × standart sapma değeri

3.2.2. *P. aeruginosa* Biyofilm Oluşturması Üzerine Furanon, Elajik Asit ve Antibiyotiklerin Etkisinin Tespiti

Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBİK)

P. aeruginosa suşu TSA besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürden öze ile alınarak tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık standardına (1 x 10^8 kob / mL) eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu alınarak TSB içerisine ekim yapılmıştır ve 0.5 McFarland bulanıklık standartına ulaşana kadar çalkalamalı etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bakteri süspansiyonu önce 1/100 oranında daha sonra 1/2 oranında TSB dilüe edilerek bakteri sayısı 5×10^5CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Meropenem, siprofloksasin, tobramisin için antibiyotik stok çözeltileri konsantrasyonları (64-0,125) µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Furanon absolute ethanolde , elajik asit DMSO içerisinde çözdürülmüştür. Furanon ve elajik asit (512-4) µg/mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Mikroplağın kuyucuklarına 100 µl TSB dağıtılmıştır. İlk kuyucuklar boş bırakılmıştır. Stok solüsyonlar 96 kuyucuklu mikroplağın ilk kuyucuğuna 200 µL olacak şekilde eklendi. İlk kuyucuktan itibaren 100 µL aktararak çift katlı seri sulandırım yapıldı ve en son 100 µl dışarıya atıldı. Daha sonra bu kuyucuklara 100 µl hazırlanan bakteri süspansiyonundan eklenerek 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir.Pozitif kontrol olarak 200 µl (100µl TSB + 100 µl bakteri süsp.) bakteri süspansiyonu negatif kontrol olarak ise 200 µl TSB kullanılmıştır.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar otomatik mikropipet yardımı ile nazikçe boşaltıldıktan sonra 250 µL PBS ile iki kez yıkanmış ve havada kurutulmuya

bırakılmıştır. Mikroplak kurutulduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 99'luk metanol eklenip 15 dakika bekletilmiş ve kuyucuklar boşaltıldıktan sonra mikroplak havada kurumaya bırakılmıştır. Mikroplak kuruduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 1'lik kristal viyole eklenip 15 dakika bekletilmiştir. Boyanın fazlası su ile yıkanarak uzaklaştırılarak ve plak kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklara 200 µL % 96'lik etanol eklenip 30 dakika bekletilmiştir ve süre sonunda mikroplak okuyucuda 595 nm'de okutulmuştur. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Tablo 3-2. *P. aeruginosa'* ya ait minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2020/Pseudomonas_aeruginosa_v_7.0_January_2020.pdf)

MIC breakpoints (mg/L)		
	S ≤	**R >**
CIP	≤0.001 mg/L	>0.5 mg/L
TOB	≤2 mg/L	>2 mg/L
MEM	≤2 mg/L	>8 mg/L

Antimikrobiyal duyarlılık belirlenmesi için EUCAST' in standartları, duyarlı (S) ve dirençli (R) için sırasıyla parantez içinde yer alan mg /mL MIC değerleri ile yukarıda listelenmiştir. CIP : Siprofloksasin ; TOB : Tobramisin ; MEM : Meropenem

3.2.3. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBEK)

P. aeruginosa suşu TSA besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürden öze ile alınarak tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklık standardına (1 x 108 kob / mL) eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu alınarak TSB içerisine ekim yapılmıştır ve 0.5 McFarland bulanıklık standartına ulaşana kadar çalkalamalı etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra bakteri süspansiyonu önce 1/100 oranında daha sonra 1/2 oranında TSB dilüe edilerek bakteri sayısı 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 200 µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak 200 µl (100µl TSB +

100 µl bakteri süsp.) bakteri süspansiyonu negatif kontrol olarak ise 200 µl TSB kullanılmıştır.

İnkübasyon sonrası kuyucuklar otomatik mikropipet yardımı ile nazikçe boşaltıldıktan sonra 250 µL PBS ile iki kez yıkanmış ve havada kurutulmuya bırakılmıştır. Başka bir steril mikroplak kullanılarak dilüsyonlar yapılmıştır. Mikroplağın kuyucuklarına 100 µl TSB dağıtılmıştır. İlk kuyucuklar boş bırakılmıştır. Stok solüsyonlar 96 kuyucuklu mikroplağın ilk kuyucuğuna 200 µL olacak şekilde eklendi. İlk kuyucuktan itibaren 100 µL aktararak çift katlı seri sulandırım yapıldı ve en son 100 µl dışarıya atıldı. Çift katlı seri sulandırım yapılarak hazırlanmış olan plakların içeriği, inokulum içeren bu plaklara aktarılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarına sadece TSB eklenmiştir. 18 saat 37 ºC'de inkübasyon sonrası kuyucuklar otomatik mikropipet yardımı ile nazikçe boşaltıldıktan sonra 250 µL PBS ile iki kez yıkanmış ve havada kurutulmuya bırakılmıştır. Mikroplak kurutulduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 99'luk metanol eklenip 15 dakika bekletilmiş ve kuyucuklar boşaltıldıktan sonra mikroplak havada kurumaya bırakılmıştır. Mikroplak kuruduktan sonra kuyucuklara 200 µL % 1'lik kristal viyole eklenip 15 dakika bekletilmiştir. Boyanın fazlası su ile yıkanarak uzaklaştırılarak ve plak kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklara 200 µL % 96'lik etanol eklenip 30 dakika bekletilmiştir ve süre sonunda mikroplak okuyucuda 595 nm'de okutulmuştur. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Üremenin görülmediği en düşük konsantrasyonların olduğu kuyucuktaki madde miktarları MBEK olarak saptandı.

3.2.4. Hücre Canlılık Testinin Yapılışı (MTT Testi)

Biyofilmlerin içindeki bakteri canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.

Bu yöntem, hücre canlılığını belirlemek için kolorimetre kullanmaktadır. MTT reaktifi, hücre yokluğunda düşük absorbans değerleri verir. MTT yönteminde, metabolik olarak aktif hücreler ve üretilen renk arasında doğrusal bir ilişki kurulur, böylece hücre ölümü veya proliferasyon oranındaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülmesi sağlanır. Sağlıklı ve hızlı büyüyen hücreler, formazana yüksek MTT indirgeme oranları sergilerken, ölü veya inaktif hücreler bunu yapamaz. MTT indirgemesinin son ürünü, mor renkli bir formazandır [169].

Sarı MTT boyası, mor MTT formazan üretmek için canlı hücrelerde dehidrojenaz ile indirgenir.Bu boya çözünür hale getirilebilen, görsel olarak okunabilen veya 570 nm'de spektrofotometrik ölçümle ölçülebilen bir boyadır [170]. Canlı hücre arttıkça mor rengin yoğunlaştığı gözlemlendi.

Biyofilm inhibisyon ve eradikasyon plateleri yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Test maddeleri ile inkübe edilen 96 kuyucuklu mikroplaklar inkübasyondan sonra nazikçe aspire edilmiştir ve havada kurumaya bırakılmıştır. Mikroplaklar kurututulduktan sonra MTT kit prosedürü doğrultusunda her bir kuyucuğa 100 µl TSB ve 10 µl MTT solüsyonu eklenmiştir. Mikroplaklar 37^{o}C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitmesinin ardından mikroplaklar etüvden cıkartılarak ve her bir kuyucuğa 100 µl Formazan solüsyonu dağıtılmıştır. Ardından mikroplaklar 37^{o} C'de 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun süresininin bitimini takiben mikroplaklar etüvden cıkarılarak 570 nm de spektrofotometrede okutulmuştur. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

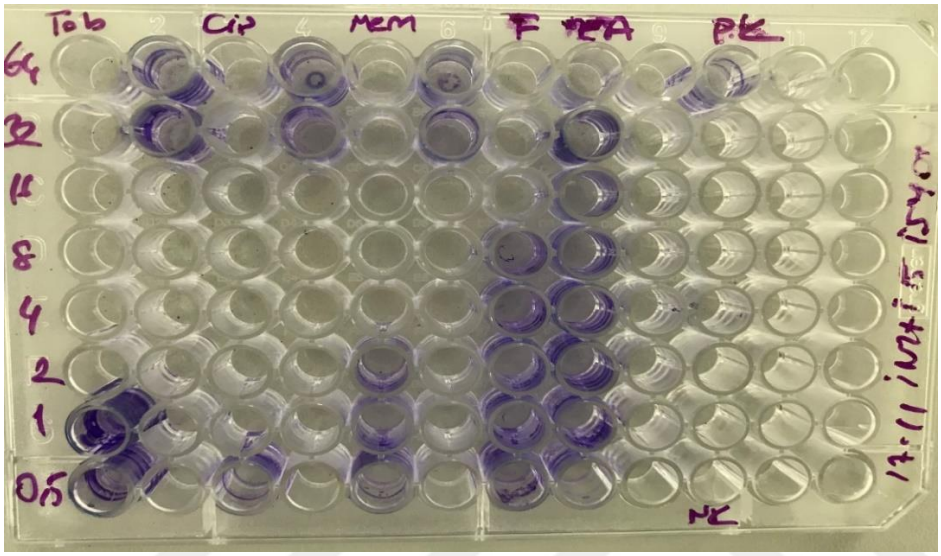
3.2.5. İstatistiksel analiz

Verilerin istatiksel analizi SPSS 22.0v programı ile yapıldı. Bileşenlerin etkinlikleri WILCOXON testi uygulayarak araştırıldı. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyofilm Oluşumunun Tespiti

Biyofilm oluşumu için *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 standart suşu kullanılmıştır. Çalışmamızda biyofilm oluşumunun tespiti kristal viyole mikroplak yöntemi ile belirlenmiştir.



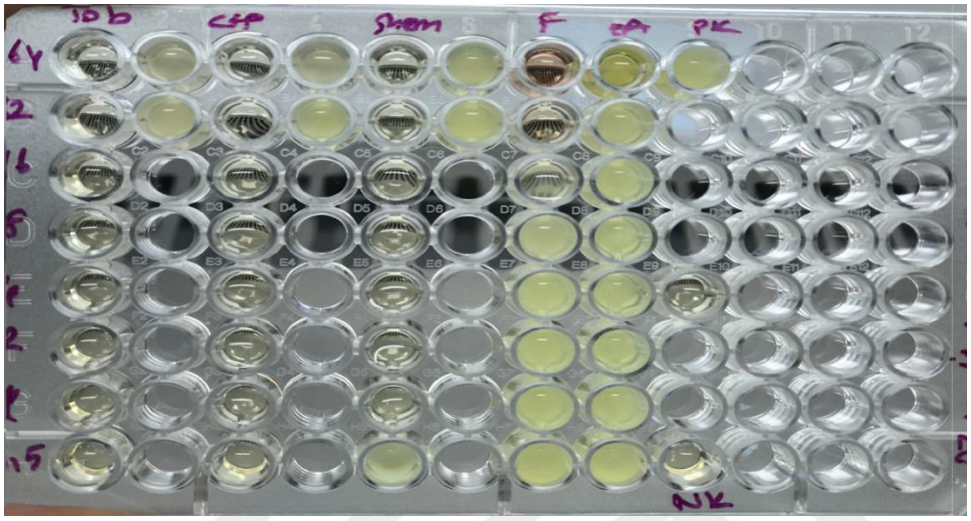
Şekil 4-1. *P. aeruginosa* biyofilminde kristal viyole mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespiti



Şekil 4-2. *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun kristal viyole doğrulanması ve ELISA reader'da OD ölçümü ile değerlendirilmesi

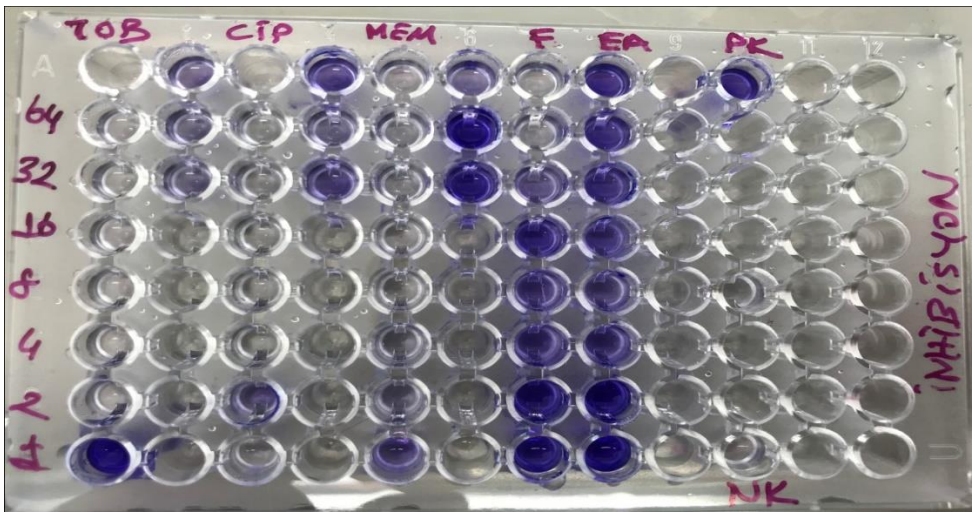
4.2. Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBİK)

Meropenem (MEM), siprofloksasin (CIP) , tobramisin (TOB) için antibiyotik stok çözeltileri konsantrasyonları (64 - 0,125) µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Furanon (F) ve elajik asit (EA) (512 - 4) µg/mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan antimikrobiyaller ile birlikte *P. aeruginosa* biyofilminde inhibisyon etkisine bakılmıştır.



Şekil 4-3. *P. aeruginosa*' nın oluşturduğu biyofilm üzerine Tobramisin (TOB), Siprofloksasin (CIP), Meropenem (MEM) antibiyotiklerinin ve Furanon (F) ve Elajik Asit (EA) doğal bileşiklerinin karşılaştırmalı olarak inhibisyon etkisinin belirlenmesi

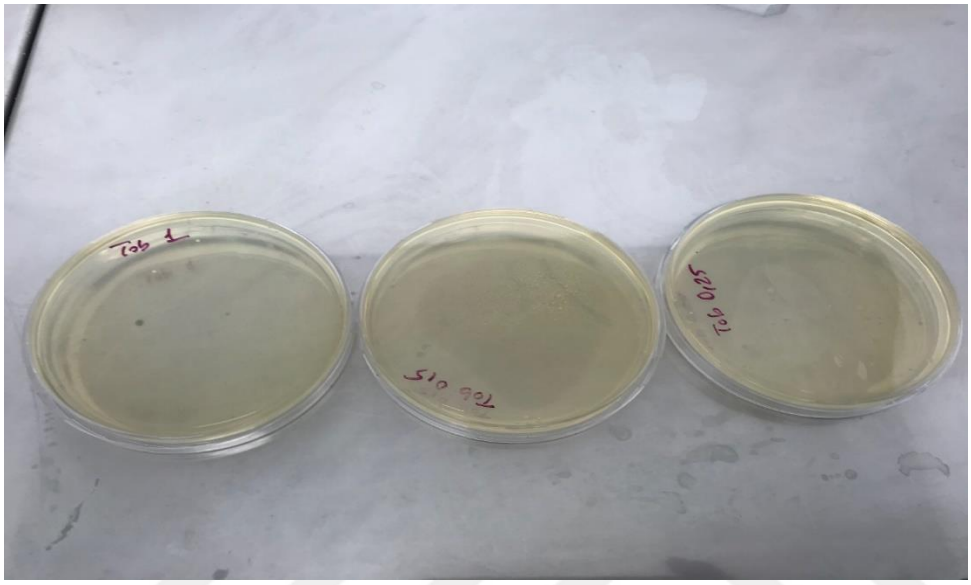
A1-B2 : Tobramisin (TOB) (64 - 0,125 µg / mL); A3-B4 : Siprofloksasin (CIP) (64 - 0,125 µg / mL); A5-B6: Meropenem (MEM) (64 - 0,125 µg / mL); A7- H7 : Furanon (F) (512 - 4 µg / mL); A8- H8 : Elajik Asit (EA) (512 - 4 µg / mL); A9 : Pozitif Kontrol (PK); H9 : Negatif Kontrol (NK)



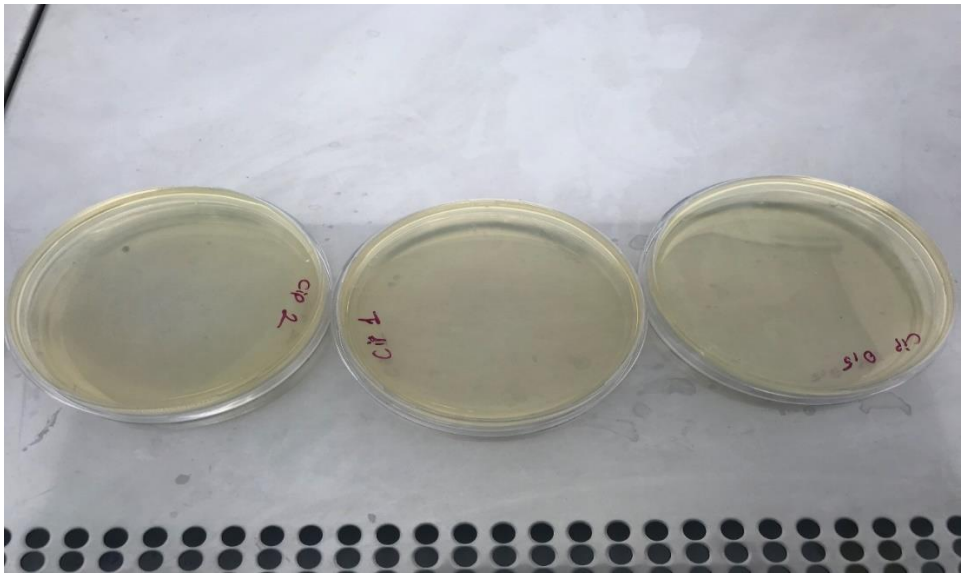
Şekil 4-4. *P. aeruginosa* biyofilminin antimikrobiyallerle muamele edildikten sonra kristal viyole yöntemi ile boyanması

A1-B2 : Tobramisin (TOB) (64 - 0,125 µg / mL); A3-B4 : Siprofloksasin (CIP) (64 - 0,125 µg / mL); A5-B6: Meropenem (MEM) (64 - 0,125 µg / mL); A7- H7 : Furanon (F) (512 - 4 µg / mL); A8- H8 : Elajik Asit (EA) (512 - 4 µg / mL); A9 : Pozitif Kontrol (PK); H9 : Negatif Kontrol (NK)

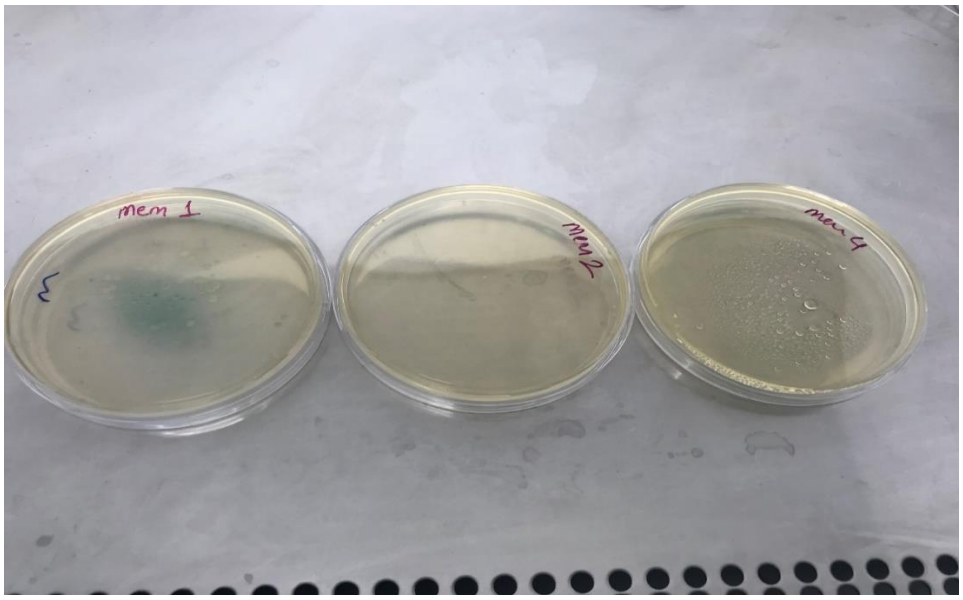
4.2.1. İnhibisyon plak kuyucuklarından TSA yapılan ekimler



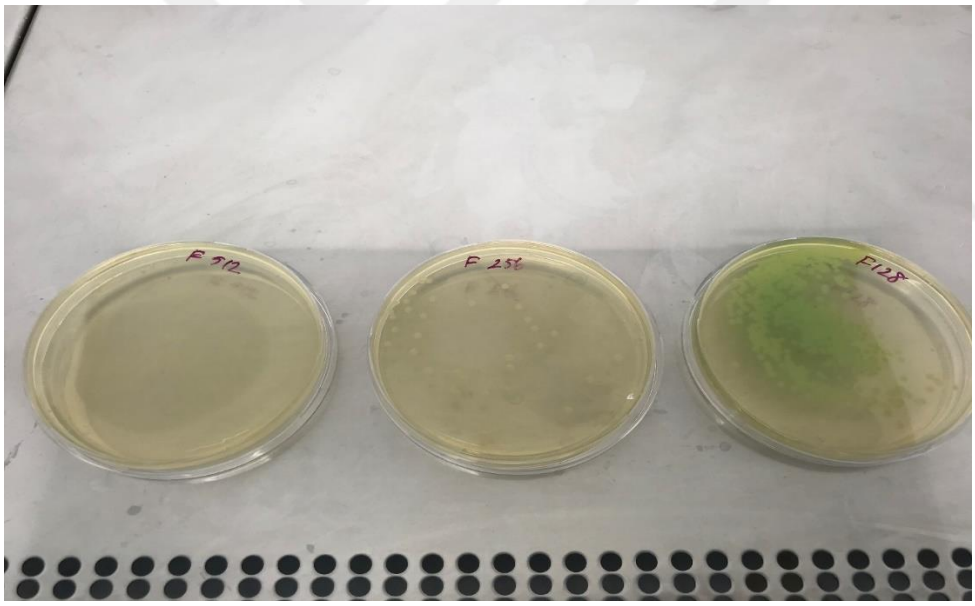
Tobramisin (TOB); (1;0,5 ; 0,25 µg / mL) konsantrasyonlarından yapılan ekimler



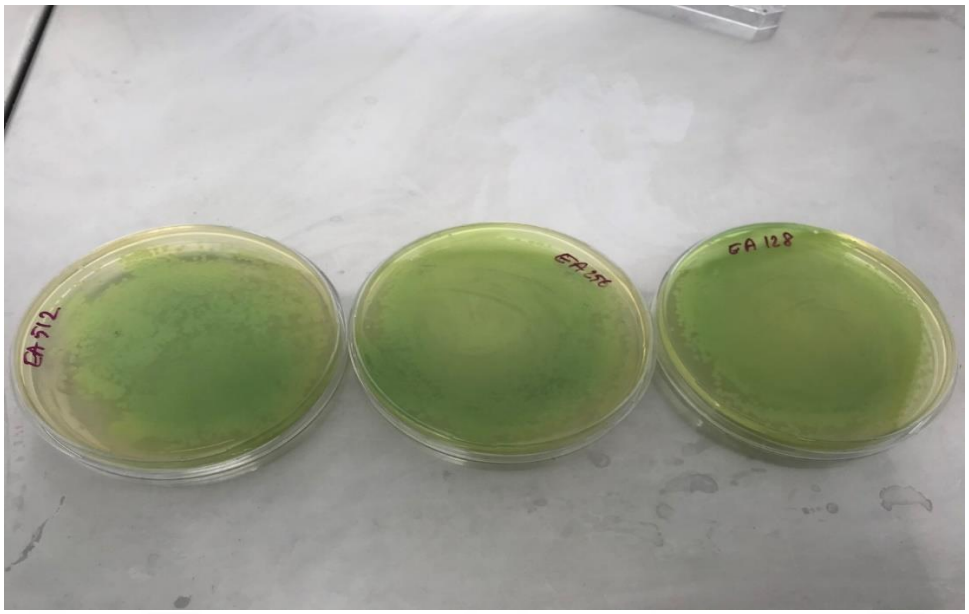
Siprofloksasin (CIP); (2 ;1; 0,5 µg / mL) konsantrasyonlarından yapılan ekimler



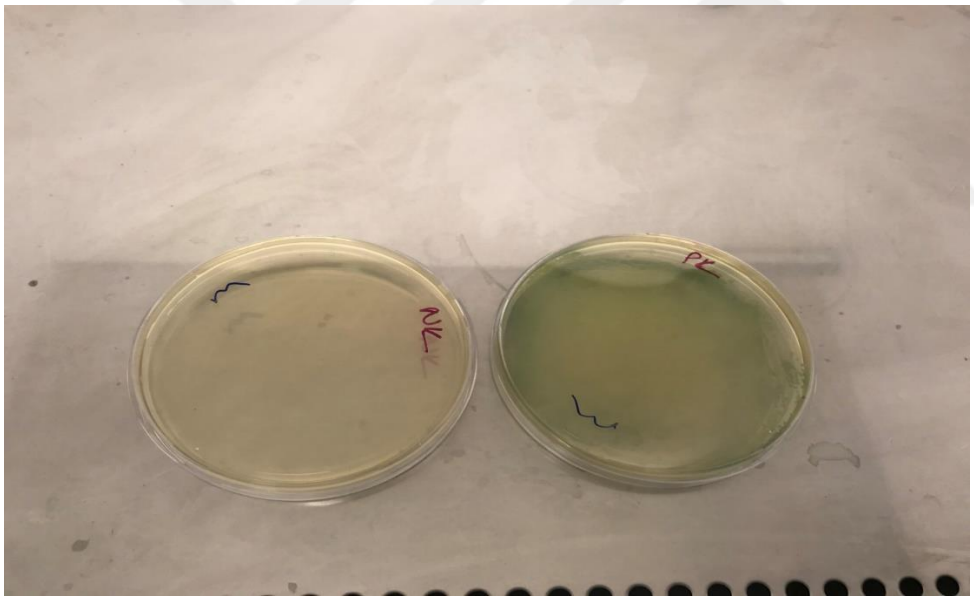
Meropenem (MEM); (1 ;2; 4 µg / mL) konsantrasyonlarından yapılan ekimler



Furanon (F); (512 ; 256 ; 128 µg / mL) konsantrasyonlarından yapılan ekimler



Elajik Asit (EA); (512 ; 256 ; 128 µg / mL) konsantrasyonlarından yapılan ekimler



Negatif kontrol (NK) ve Pozitif kontrol (PK) kuyucuklarından yapılan ekimler

P. aeruginosa' nın oluşturduğu biyofilm üzerine tobramisin, siprofloksasin, meropenem antibiyotikleri ile furanon, elajik asit doğal bileşiklerinin inhibisyon etkilerinin karşılaştırması çalışmalarının sonuçları aşağıdadır.

Tablo 4-1. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi I. Deney Sonuçları

MBİK (µg / mL)											
TOB 64	0,086	**CİP 64**	0,081	**MEM 64**	0,085	**F 512**	0,079	**EA 512**	0,871	**PK**	1,393
TOB 32	0,087	**CİP 32**	0,083	**MEM 32**	0,091	**F 256**	0,083	**EA 256**	0,894	**NK**	0,097
TOB 16	0,089	**CİP 16**	0,085	**MEM 16**	0,091	**F 128**	0,215	**EA 128**	1,095		
TOB 8	0,09	**CİP 8**	0,088	**MEM 8**	0,095	**F 64**	0,544	**EA 64**	1,624		
TOB 4	0,094	**CİP 4**	0,105	**MEM 4**	0,14	**F 32**	0,859	**EA 32**	1,712		
TOB 2	0,109	**CİP 2**	0,154	**MEM 2**	0,198	**F 16**	0,93	**EA 16**	1,802		
TOB 1	0,359	**CİP 1**	0,205	**MEM 1**	0,505	**F 8**	1,615	**EA 8**	2,548		
TOB 0.5	2,434	**CİP 0.5**	1,616	**MEM 0.5**	1,294	**F 4**	1,782	**EA 4**	2,802		
TOB 0.25	2,953	**CİP 0.25**	2,238	**MEM 0.25**	2,042						
TOB 0.125	3,533	**CİP 0.125**	3,448	**MEM 0.125**	3,14						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-2. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi II. Deney Sonuçları

MBİK (µg / mL)											
TOB 64	0,089	**CİP 64**	0,082	**MEM 64**	0,089	**F 512**	0,084	**EA 512**	0,802	**PK**	1,367
TOB 32	0,091	**CİP 32**	0,087	**MEM 32**	0,092	**F 256**	0,09	**EA 256**	0,93	**NK**	0,092
TOB 16	0,112	**CİP 16**	0,088	**MEM 16**	0,093	**F 128**	0,169	**EA 128**	1,006		
TOB 8	0,186	**CİP 8**	0,095	**MEM 8**	0,092	**F 64**	0,573	**EA 64**	1,797		
TOB 4	0,191	**CİP 4**	0,099	**MEM 4**	0,147	**F 32**	0,844	**EA 32**	1,884		
TOB 2	0,251	**CİP 2**	0,104	**MEM 2**	0,154	**F 16**	0,919	**EA 16**	1,923		
TOB 1	0,751	**CİP 1**	0,124	**MEM 1**	0,604	**F 8**	1,652	**EA 8**	2,096		
TOB 0.5	2,575	**CİP 0.5**	1,213	**MEM 0.5**	1,213	**F 4**	1,876	**EA 4**	2,395		
TOB 0.25	2,829	**CİP 0.25**	2,256	**MEM 0.25**	2,256						
TOB 0.125	3,888	**CİP 0.125**	3,359	**MEM 0.125**	3,359						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-3. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi III. Deney Sonuçları

MBİK (µg / mL)											
TOB 64	0,077	**CİP 64**	0,067	**MEM 64**	0,071	**F 512**	0,071	**EA 512**	0,864	**PK**	1,395
TOB 32	0,072	**CİP 32**	0,069	**MEM 32**	0,073	**F 256**	0,078	**EA 256**	0,988	**NK**	0,084
TOB 16	0,068	**CİP 16**	0,082	**MEM 16**	0,09	**F 128**	0,183	**EA 128**	1,054		
TOB 8	0,071	**CİP 8**	0,074	**MEM 8**	0,093	**F 64**	0,524	**EA 64**	1,771		
TOB 4	0,066	**CİP 4**	0,084	**MEM 4**	0,176	**F 32**	0,907	**EA 32**	1,807		
TOB 2	0,167	**CİP 2**	0,109	**MEM 2**	0,35	**F 16**	0,916	**EA 16**	1,906		
TOB 1	0,647	**CİP 1**	0,122	**MEM 1**	0,909	**F 8**	1,648	**EA 8**	2,471		
TOB 0.5	1,953	**CİP 0.5**	1,428	**MEM 0.5**	1,469	**F 4**	1,573	**EA 4**	2,643		
TOB 0.25	2,439	**CİP 0.25**	2,172	**MEM 0.25**	2,503						
TOB 0.125	3,069	**CİP 0.125**	3,368	**MEM 0.125**	3,665						

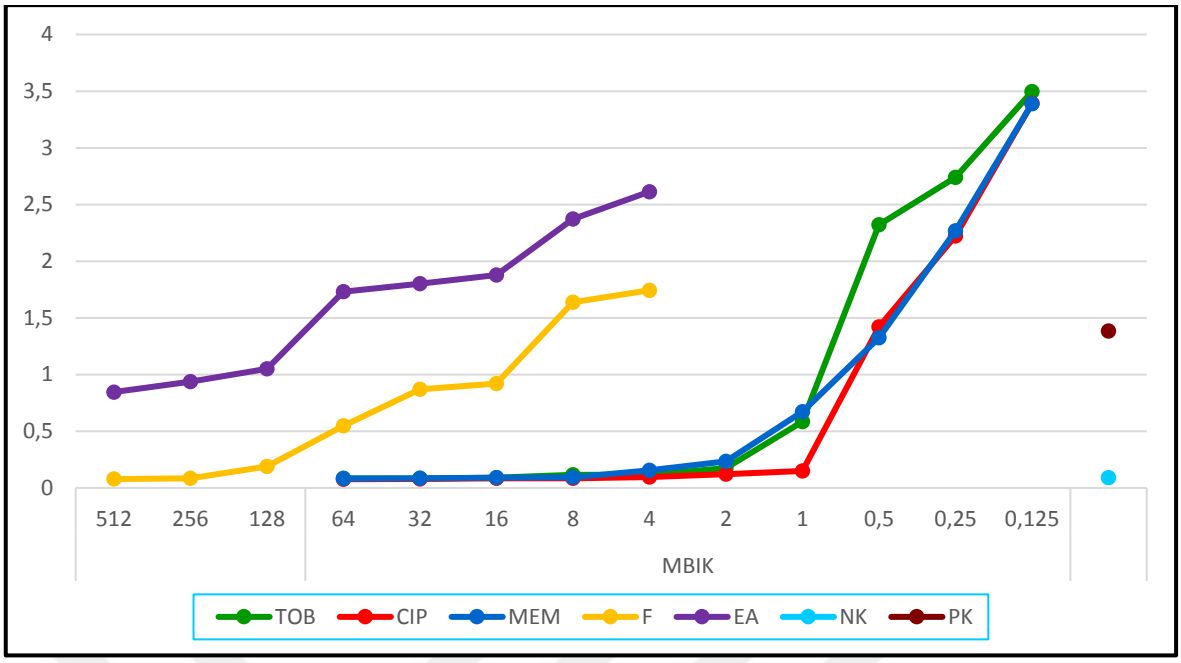
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-4. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Belirlenmesi Üç Deney Ortalama Sonuçları

	µg mL	***TOB***	***CIP***	***MEM***	***F***	***EA***	***NK***	***PK***
MBIK	**512**				0,078	**0,846**		
	256				0,084	0,937		
	128				0,189	1,052		
	64	0,084	0,077	0,082	0,547	1,731		
	32	0,083	0,080	0,085	**0,870**	1,801		
	16	**0,090**	0,085	**0,091**	0,922	1,877		
	8	0,116	**0,086**	0,093	1,638	2,372		
	4	0,117	0,096	0,154	1,744	2,613		
	2	0,176	0,122	0,234				
	1	0,586	0,150	0,673				
	0,5	2,321	1,419	1,325				
	0,25	2,740	2,222	2,267				
	0,125	3,497	3,392	3,388				
							0,091	**1,385**

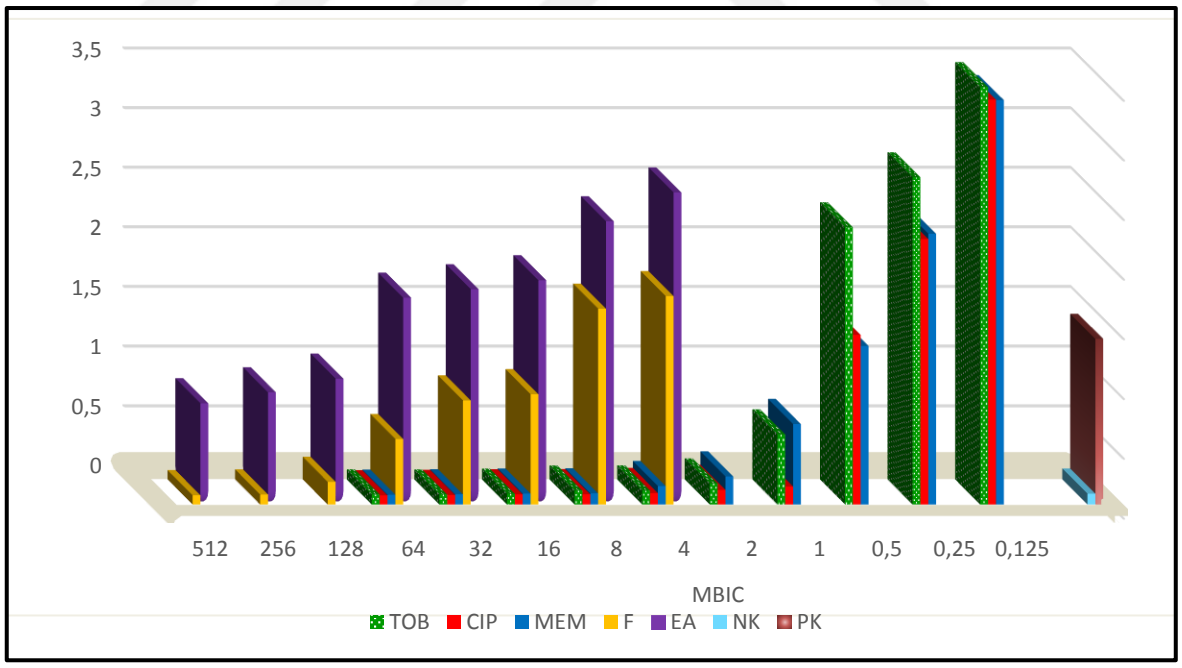
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Negatif kontrole göre CIP; 8 µg /mL, TOB ve MEM; 16 µg /mL, F; 32 µg /mL, EA; 512 µg /mL konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi göstermiştir.



Şekil 4-5. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın eğrileri

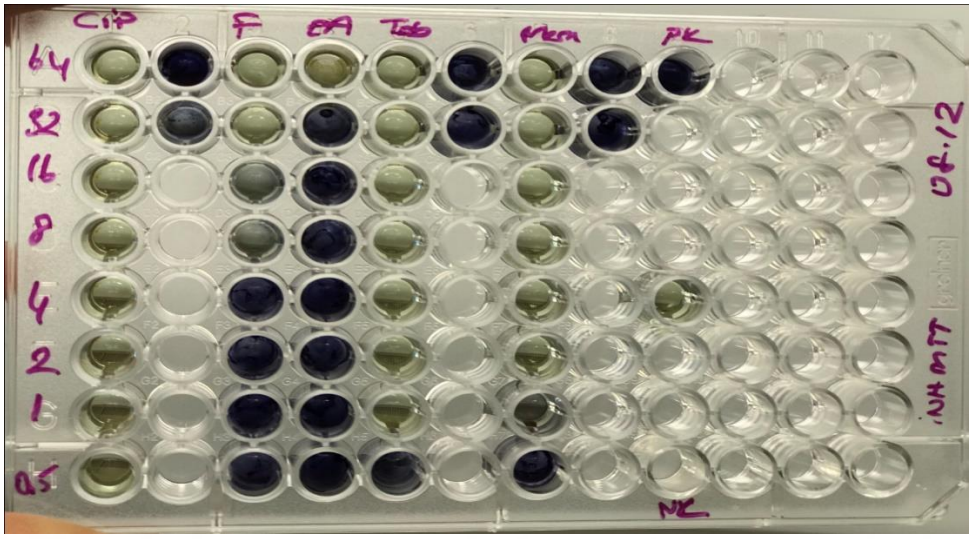
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)



Şekil 4-6. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın diyagram olarak gösterilmesi

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Hücre Canlılık Testi (MTT Testi)



Şekil 4-7. *P. aeruginosa* oluşturduğu Biyofilm Üzerine Hücre Canlılık Testi (MTT) yöntemi ile Tobramisin, Siprofloksasin, Meropenem antibiyotikleri ile Furanone, Elajik Asit doğal bileşiklerinin İnhibisyon Etkisinin Karşılaştırmalı Olarak Tespiti

A1-B2 :Tobramisin (TOB) (64-0,125 µg / mL); A3-B4 : Siprofloksasin (CIP) (64-0,125 µg / mL); A5-B6: Meropenem (MEM) (64-0,125 µg / mL); A7- H7 : Furanon (F) (512-4 µg / mL); A8- H8 :Elajik Asit (EA) (512-4 µg / mL); A9 : Pozitif Kontrol (PK); H9 : Negatif Kontrol (NK)

Tablo 4-5. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) I. Deney Sonuçları

MBİK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,328	**CİP 64**	0,526	**MEM 64**	0,368	**F 512**	0,338	**EA 512**	0,675	**PK**	3,264
TOB 32	0,370	**CİP 32**	0,575	**MEM 32**	0,512	**F 256**	0,399	**EA 256**	2,782	**NK**	0,427
TOB 16	0,500	**CİP 16**	0,591	**MEM 16**	0,600	**F 128**	1,254	**EA 128**	3,109		
TOB 8	0,557	**CİP 8**	0,607	**MEM 8**	0,612	**F 64**	1,625	**EA 64**	3,241		
TOB 4	0,579	**CİP 4**	0,657	**MEM 4**	0,595	**F 32**	2,367	**EA 32**	3,671		
TOB 2	0,574	**CİP 2**	0,780	**MEM 2**	0,791	**F 16**	2,449	**EA 16**	3,730		
TOB 1	0,557	**CİP 1**	0,785	**MEM 1**	1,208	**F 8**	3,256	**EA 8**	3,786		
TOB 0.5	0,570	**CİP 0.5**	0,895	**MEM 0.5**	1,953	**F 4**	3,433	**EA 4**	3,807		
TOB 0.25	3,361	**CİP 0.25**	2,550	**MEM 0.25**	2,944						
TOB 0.125	3,770	**CİP 0.125**	3,449	**MEM 0.125**	3,205						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-6. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) II. Deney Sonuçları

MBİK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,384	**CİP 64**	0,354	**MEM 64**	0,381	**F 512**	0,380	**EA 512**	0,797	**PK**	3,298
TOB 32	0,385	**CİP 32**	0,353	**MEM 32**	0,391	**F 256**	0,394	**EA 256**	2,978	**NK**	0,371
TOB 16	0,388	**CİP 16**	0,374	**MEM 16**	0,392	**F 128**	1,197	**EA 128**	3,014		
TOB 8	0,404	**CİP 8**	0,385	**MEM 8**	0,407	**F 64**	1,332	**EA 64**	3,038		
TOB 4	0,413	**CİP 4**	0,387	**MEM 4**	0,487	**F 32**	2,494	**EA 32**	3,057		
TOB 2	0,417	**CİP 2**	0,391	**MEM 2**	0,581	**F 16**	2,957	**EA 16**	3,156		
TOB 1	0,515	**CİP 1**	0,395	**MEM 1**	1,693	**F 8**	3,061	**EA 8**	3,225		
TOB 0.5	0,542	**CİP 0.5**	0,406	**MEM 0.5**	2,447	**F 4**	3,407	**EA 4**	3,307		
TOB 0.25	3,032	**CİP 0.25**	2,671	**MEM 0.25**	3,025						
TOB 0.125	3,071	**CİP 0.125**	3,471	**MEM 0.125**	3,086						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-7. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) III. Deney Sonuçları

MBİK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,326	**CİP 64**	0,243	**MEM 64**	0,323	**F 512**	0,322	**EA 512**	0,534	**PK**	2,911
TOB 32	0,340	**CİP 32**	0,295	**MEM 32**	0,398	**F 256**	0,398	**EA 256**	2,276	**NK**	0,381
TOB 16	0,393	**CİP 16**	0,311	**MEM 16**	0,488	**F 128**	1,828	**EA 128**	2,869		
TOB 8	0,419	**CİP 8**	0,363	**MEM 8**	0,560	**F 64**	1,962	**EA 64**	3,096		
TOB 4	0,462	**CİP 4**	0,381	**MEM 4**	0,656	**F 32**	2,293	**EA 32**	3,174		
TOB 2	0,454	**CİP 2**	0,393	**MEM 2**	0,897	**F 16**	2,491	**EA 16**	3,201		
TOB 1	0,612	**CİP 1**	0,480	**MEM 1**	1,195	**F 8**	3,447	**EA 8**	3,455		
TOB 0.5	0,705	**CİP 0.5**	0,577	**MEM 0.5**	2,094	**F 4**	3,466	**EA 4**	3,964		
TOB 0.25	3,235	**CİP 0.25**	2,921	**MEM 0.25**	3,001						
TOB 0.125	3,350	**CİP 0.125**	3,572	**MEM 0.125**	3,560						

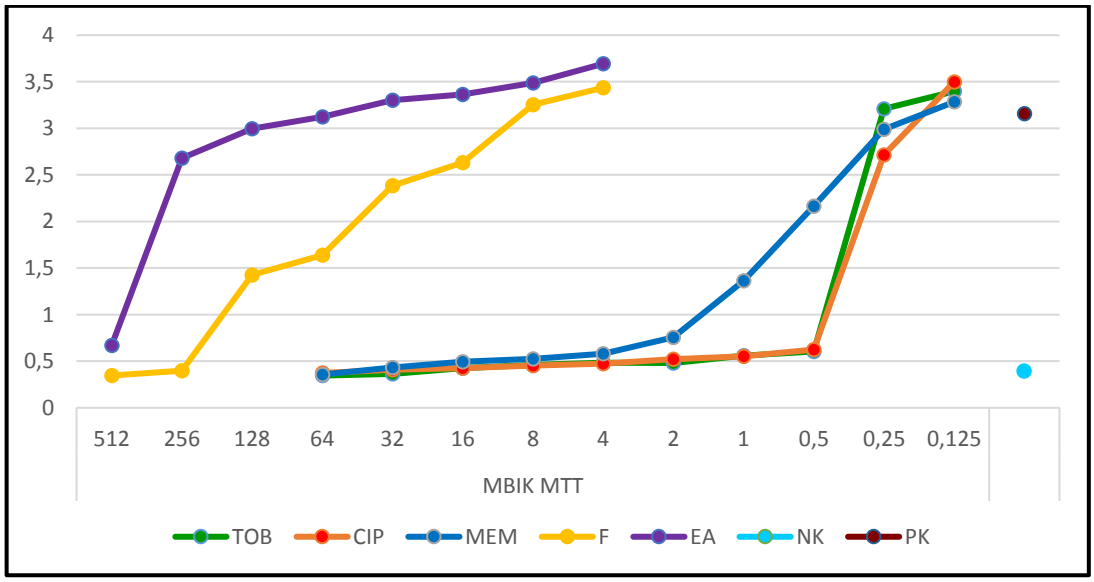
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-8. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK) Hücre Canlılık Testi (MTT) Üç Deney Ortalama Sonuçları

	µg mL	*TOB*	*CIP*	*MEM*	*F*	*EA*	*NK*	*PK*
MBIK MTT	**512**				0,347	0,669		
	256				**0,397**	2,679		
	128				1,426	2,997		
	64	0,346	**0,374**	**0,357**	1,64	3,125		
	32	**0,365**	0,408	0,434	2,385	3,301		
	16	0,427	0,425	0,493	2,632	3,362		
	8	0,460	0,452	0,526	3,255	3,489		
	4	0,485	0,475	0,579	3,435	3,693		
	2	0,482	0,521	0,756				
	1	0,561	0,553	1,365				
	0,5	0,606	0,626	2,165				
	0,25	3,209	2,714	2,99				
	0,125	3,397	3,497	3,284				
							0,393	**3,158**

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

MBIC MTT sonucuna göre TOB; 32 µg /mL, CIP ve MEM; 64 µg /mL, F; 256 µg /mL konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi göstermiştir ve EA inhibisyon etkisi göstermemiştir.

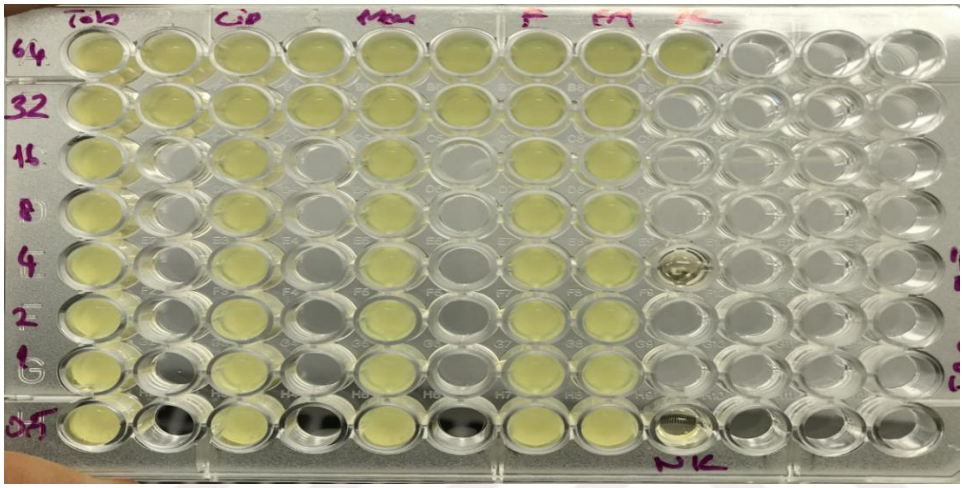


Şekil 4-8. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonları (MBİK)'nın Hücre Canlılık Testi (MTT) eğrileri

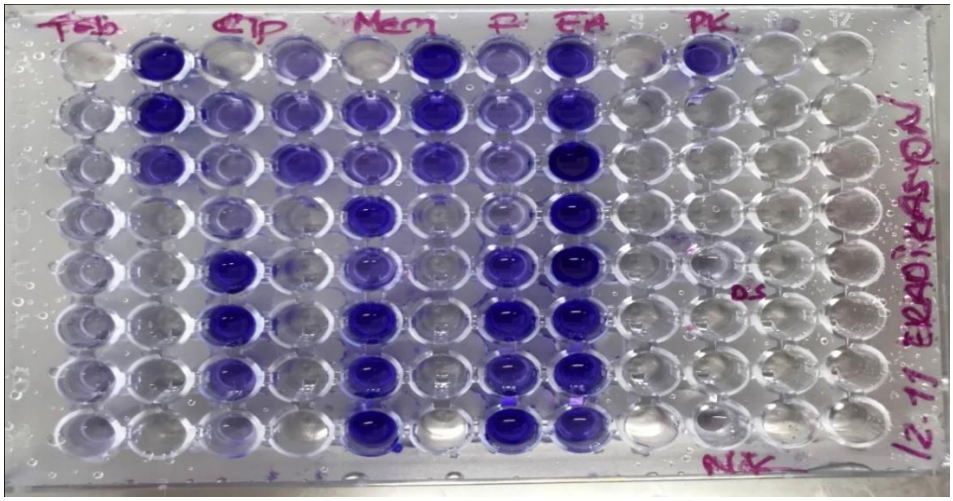
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

4.3. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MBEK)

Meropenem (MEM), siprofloksasin (CIP), tobramisin (TOB) için antibiyotik stok çözeltileri konsantrasyonları (64 - 0,125) µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Furanon (F) ve elajik asit (EA) (512 - 4) µg/mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan antimikrobiyaller ile birlikte *P. aeruginosa* biyofilminde eradikasyon etkisine bakılmıştır.



Şekil 4-9. Eradikasyon plağının inkübasyon sonrasında görünümü



Şekil 4-10. *P. aeruginosa* biyofilminin antibiyotikler ve doğal bileşikler ile muamele edildikten sonra eradikasyon plağının Kristal viyole yöntemi ile boyanması

A1-B2 :Tobramisin (TOB) (64-0,125 µg / mL); A3-B4 : Siprofloksasin (CIP) (64-0,125 µg / mL); A5-B6: Meropenem (MEM) (64-0,125 µg / mL); A7- H7 : Furanon (F) (512-4 µg / mL); A8- H8 :Elajik Asit (EA) (512-4 µg / mL); A9 : Pozitif Kontrol (PK); H9 : Negatif Kontrol (NK)

Tablo 4-9. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi I. Deney Sonuçları

MBEK (µg / mL)											
TOB 64	0,147	**CİP 64**	0,26	**MEM 64**	0,297	**F 512**	0,227	**EA 512**	1,685	**PK**	2,279
TOB 32	0,327	**CİP 32**	0,344	**MEM 32**	0,348	**F 256**	0,322	**EA 256**	2,259	**NK**	0,165
TOB 16	0,358	**CİP 16**	0,369	**MEM 16**	0,578	**F 128**	0,507	**EA 128**	2,324		
TOB 8	0,422	**CİP 8**	0,479	**MEM 8**	1,7	**F 64**	1,307	**EA 64**	2,594		
TOB 4	0,556	**CİP 4**	0,956	**MEM 4**	1,836	**F 32**	2,67	**EA 32**	2,814		
TOB 2	1,917	**CİP 2**	1,071	**MEM 2**	2,125	**F 16**	2,876	**EA 16**	2,906		
TOB 1	2,892	**CİP 1**	1,456	**MEM 1**	2,959	**F 8**	3,545	**EA 8**	3,234		
TOB 0.5	3,165	**CİP 0.5**	2,423	**MEM 0.5**	3,28	**F 4**	3,602	**EA 4**	3,503		
TOB 0.25	3,281	**CİP 0.25**	3,832	**MEM 0.25**	3,174						
TOB 0.125	3,756	**CİP 0.125**	3,915	**MEM 0.125**	3,48						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-10. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi II. Deney Sonuçları

MBEK (µg / mL)											
TOB 64	0,174	**CİP 64**	0,234	**MEM 64**	0,354	**F 512**	0,329	**EA 512**	1,967	**PK**	2,503
TOB 32	0,363	**CİP 32**	0,334	**MEM 32**	0,519	**F 256**	0,41	**EA 256**	2,163	**NK**	0,121
TOB 16	0,439	**CİP 16**	0,395	**MEM 16**	0,541	**F 128**	0,605	**EA 128**	2,423		
TOB 8	0,505	**CİP 8**	0,66	**MEM 8**	1,657	**F 64**	1,901	**EA 64**	2,901		
TOB 4	0,522	**CİP 4**	1,055	**MEM 4**	1,705	**F 32**	2,81	**EA 32**	3,015		
TOB 2	1,255	**CİP 2**	1,066	**MEM 2**	2,522	**F 16**	2,959	**EA 16**	3,332		
TOB 1	2,252	**CİP 1**	1,268	**MEM 1**	2,914	**F 8**	3,732	**EA 8**	3,359		
TOB 0.5	3,817	**CİP 0.5**	2,438	**MEM 0.5**	3,208	**F 4**	3,982	**EA 4**	3,582		
TOB 0.25	3,858	**CİP 0.25**	3,709	**MEM 0.25**	3,628						
TOB 0.125	3,822	**CİP 0.125**	3,806	**MEM 0.125**	3,889						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-11. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi III. Deney Sonuçları

MBEK (µg / mL)											
TOB 64	0,156	**CİP 64**	0,238	**MEM 64**	0,781	**F 512**	0,259	**EA 512**	1,142	**PK**	2,221
TOB 32	0,453	**CİP 32**	0,329	**MEM 32**	0,806	**F 256**	0,275	**EA 256**	2,124	**NK**	0,063
TOB 16	0,519	**CİP 16**	0,354	**MEM 16**	0,975	**F 128**	0,359	**EA 128**	2,158		
TOB 8	0,569	**CİP 8**	0,363	**MEM 8**	1,586	**F 64**	1,771	**EA 64**	2,352		
TOB 4	0,625	**CİP 4**	0,838	**MEM 4**	1,613	**F 32**	2,296	**EA 32**	2,403		
TOB 2	1,260	**CİP 2**	1,271	**MEM 2**	2,881	**F 16**	2,541	**EA 16**	2,553		
TOB 1	2,800	**CİP 1**	1,854	**MEM 1**	2,966	**F 8**	3,594	**EA 8**	2,851		
TOB 0.5	3,242	**CİP 0.5**	2,31	**MEM 0.5**	3,221	**F 4**	3,799	**EA 4**	3,199		
TOB 0.25	3,694	**CİP 0.25**	3,601	**MEM 0.25**	3,242						
TOB 0.125	3,754	**CİP 0.125**	3,889	**MEM 0.125**	3,626						

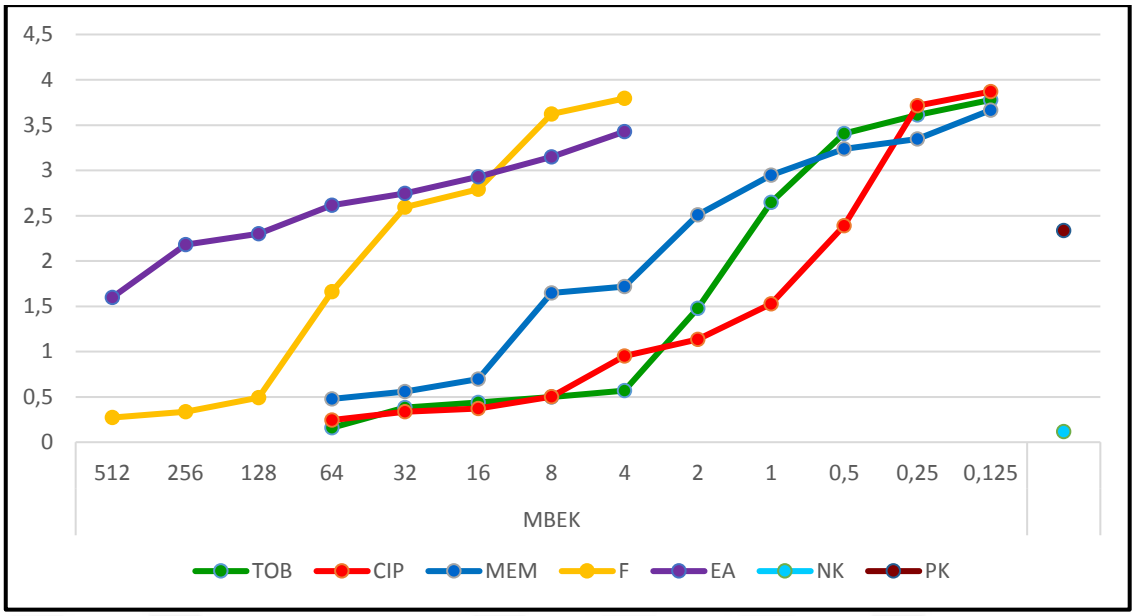
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-12. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Belirlenmesi Üç Deney Ortalama Sonuçları

	µg / mL	***TOB***	***CIP***	***MEM***	***F***	***EA***	***NK***	***PK***
MBEK	**512**				**0,272**	1,598		
	256				0,336	2,182		
	128				0,490	2,302		
	64	**0,159**	**0,244**	0,477	1,660	2,616		
	32	0,381	0,336	0,558	2,592	2,744		
	16	0,439	0,373	0,698	2,792	2,930		
	8	0,499	0,501	1,648	3,624	3,148		
	4	0,568	0,950	1,718	3,794	3,428		
	2	1,477	1,136	2,509				
	1	2,648	1,526	2,946				
	0,5	3,408	2,390	3,236				
	0,25	3,611	3,714	3,348				
	0,125	3,777	3,870	3,665				
							0,116	**2,334**

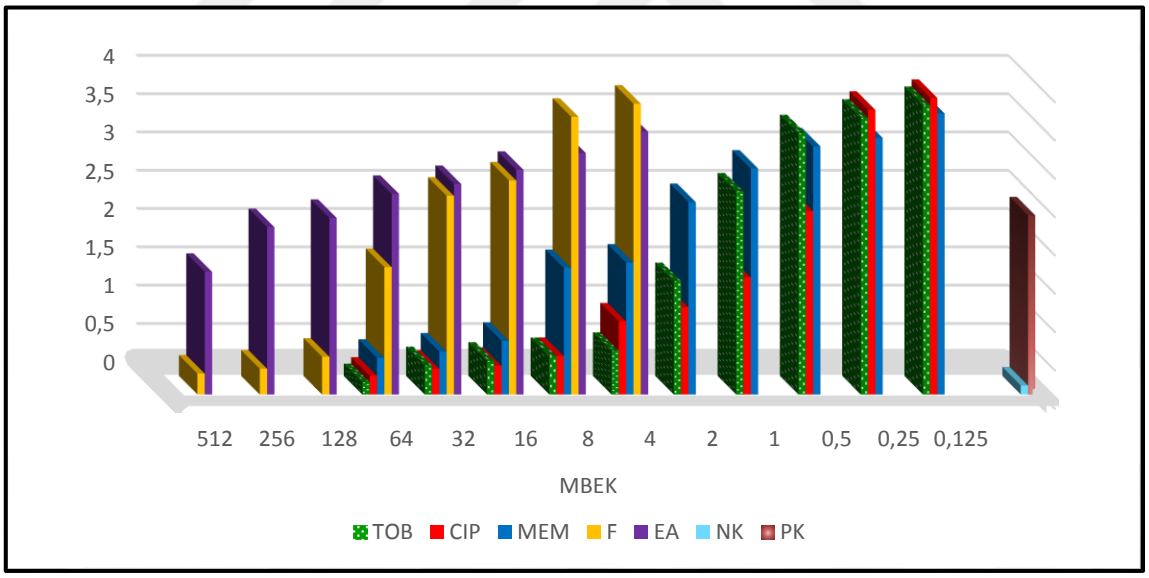
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Sadece TOB; 64 µg /mL konsantrasyonlarda eradikasyon etkisi göstermiştir, CIP (0,244 µg /mL); 64 µg /mL, F (0,272 µg /mL); 512 µg /mL konsantrasyonlarda negatife yakın eradikasyon etkisi göstermiştir. MEM ve EA etkisiz bulunmuştur.



Şekil 4-11. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın eğrileri

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)



Şekil 4-12. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın diyagram olarak gösterilmesi

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK)

Tablo 4-13. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) I. Deney Sonuçları

MBEK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,445	**CİP 64**	0,369	**MEM 64**	0,384	**F 512**	0,314	**EA 512**	0,459	**PK**	2,500
TOB 32	0,782	**CİP 32**	0,543	**MEM 32**	0,806	**F 256**	0,346	**EA 256**	2,272	**NK**	0,296
TOB 16	1,403	**CİP 16**	1,010	**MEM 16**	1,904	**F 128**	0,398	**EA 128**	2,344		
TOB 8	1,615	**CİP 8**	1,391	**MEM 8**	1,910	**F 64**	2,068	**EA 64**	2,538		
TOB 4	1,908	**CİP 4**	1,786	**MEM 4**	1,982	**F 32**	2,382	**EA 32**	2,771		
TOB 2	2,308	**CİP 2**	1,789	**MEM 2**	2,174	**F 16**	2,683	**EA 16**	2,819		
TOB 1	2,503	**CİP 1**	2,544	**MEM 1**	2,308	**F 8**	2,800	**EA 8**	2,821		
TOB 0.5	2,701	**CİP 0.5**	2,678	**MEM 0.5**	2,627	**F 4**	2,836	**EA 4**	3,399		
TOB 0.25	2,851	**CİP 0.25**	2,704	**MEM 0.25**	2,867						
TOB 0.125	2,994	**CİP 0.125**	2,935	**MEM 0.125**	2,933						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-14. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) II. Deney Sonuçları

MBEK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,706	**CİP 64**	0,484	**MEM 64**	0,773	**F 512**	0,320	**EA 512**	0,369	**PK**	2,697
TOB 32	0,757	**CİP 32**	0,871	**MEM 32**	0,926	**F 256**	0,364	**EA 256**	2,309	**NK**	0,195
TOB 16	1,669	**CİP 16**	1,080	**MEM 16**	1,136	**F 128**	0,532	**EA 128**	2,842		
TOB 8	1,956	**CİP 8**	1,387	**MEM 8**	1,249	**F 64**	2,310	**EA 64**	2,921		
TOB 4	1,994	**CİP 4**	1,558	**MEM 4**	1,503	**F 32**	2,497	**EA 32**	2,935		
TOB 2	2,585	**CİP 2**	1,810	**MEM 2**	2,256	**F 16**	2,822	**EA 16**	2,962		
TOB 1	2,695	**CİP 1**	2,354	**MEM 1**	2,332	**F 8**	2,879	**EA 8**	2,977		
TOB 0.5	2,063	**CİP 0.5**	2,746	**MEM 0.5**	2,479	**F 4**	2,886	**EA 4**	3,207		
TOB 0.25	2,877	**CİP 0.25**	2,871	**MEM 0.25**	2,718						
TOB 0.125	2,854	**CİP 0.125**	2,714	**MEM 0.125**	2,879						

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-15. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin *P. aeruginosa* Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) III. Deney Sonuçları

MBEK MTT (µg / mL)											
TOB 64	0,316	**CİP 64**	0,473	**MEM 64**	0,344	**F 512**	0,246	**EA 512**	0,469	**PK**	2,887
TOB 32	0,450	**CİP 32**	0,665	**MEM 32**	0,799	**F 256**	0,305	**EA 256**	2,388	**NK**	0,296
TOB 16	1,599	**CİP 16**	1,195	**MEM 16**	1,153	**F 128**	0,737	**EA 128**	2,562		
TOB 8	1,605	**CİP 8**	1,544	**MEM 8**	1,418	**F 64**	2,169	**EA 64**	2,623		
TOB 4	1,955	**CİP 4**	1,890	**MEM 4**	1,569	**F 32**	2,357	**EA 32**	2,777		
TOB 2	2,501	**CİP 2**	1,922	**MEM 2**	1,924	**F 16**	2,546	**EA 16**	2,834		
TOB 1	2,572	**CİP 1**	2,697	**MEM 1**	2,366	**F 8**	2,724	**EA 8**	2,974		
TOB 0.5	2,695	**CİP 0.5**	2,794	**MEM 0.5**	2,831	**F 4**	2,806	**EA 4**	3,010		
TOB 0.25	2,811	**CİP 0.25**	2,822	**MEM 0.25**	2,825						
TOB 0.125	2,886	**CİP 0.125**	2,996	**MEM 0.125**	2,944						

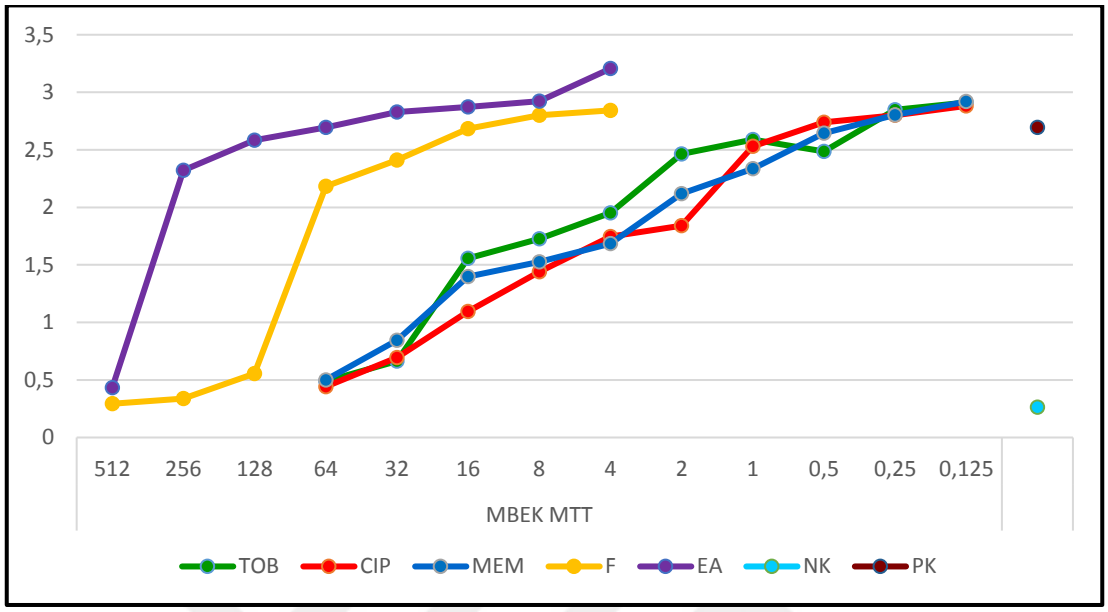
Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

Tablo 4-16. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin P. aeruginosa Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK) Hücre Canlılık Testi (MTT) Üç Deney Ortalama Sonuçları

	µg / mL	***TOB***	***CIP***	***MEM***	***F***	***EA***	***NK***	***PK***
MBEK MTT	**512**				**0,293**	0,432		
	256	.			0,338	2,323		
	128				0,556	2,583		
	64	0,489	0,442	0,500	2,182	2,694		
	32	0,663	0,693	0,844	2,412	2,828		
	16	1,557	1,095	1,398	2,684	2,872		
	8	1,725	1,441	1,526	2,801	2,924		
	4	1,952	1,745	1,685	2,843	3,205		
	2	2,465	1,840	2,118				
	1	2,590	2,532	2,335				
	0,5	2,486	2,739	2,646				
	0,25	2,846	2,799	2,803				
	0,125	2,911	2,882	2,919				
							0,262	**2,695**

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

MBEC MTT sonucuna göre sadece F (256 µg /mL) konsantrasyonlarda eradikasyon etkisi göstermiştir.



Şekil 4-13. Antibiyotiklerin ve doğal bileşiklerin P. aeruginosa Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonları (MBEK)'nın Hücre Canlılık Testi (MTT) eğrileri

Meropenem (MEM), Siprofloksasin (CIP), Tobramisin (TOB) (64- 0,125 µg /mL); Furanon (F), Elajik Asit (EA) (512-4 µg /mL), Negatif Kontrol (NK), Pozitif Kontrol (PK), Hücre canlılık testi Metiltiazol difenil tetrazolyum Test (MTT)

4.4. İstatistiksel analiz

Verilerin istatiksel analizi SPSS 22.0v programı ile yapıldı. Bilşenlerin etkinlikleri WILCOXON testi uygulayarak araştırıldı. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 4-17. En Yüksek 4 Doz (Tob, Mem, Cip-64, 32, 16, 8) (F, Ea- 512, 256, 128, 64) OD Karşılaştırması

Antibiotik	TOB	CIP	MEM	F	EA
TOB	-	*P* =1.63	*P* =0.59	*P* =1.63	***P* = 0.01**
CIP	*P* =1.63	-	***P* =0.01**	*P* =1.56	***P* =0.01**
MEM	*P* =0.59	***P* =0.01**	-	*P* =8.77	***P* =0.01**
F	*P* =1.63	*P* =1.56	*P* =8.77	-	***P* =0.001**
EA	***P* =0.01**	***P* =0.01**	***P* =0.01**	***P* =0.001**	-

Çalışmamızda kullanılan her bir antibiyotiğin ve doğal bileşiklerin en yüksek 4 dozlarındaki OD karşılaştırıldığında; CIP etkisi anlamlı bir farkla MEM'den daha yüksek (p=0.01) saptanmıştır. TOB, MEM, CIP ve F etkileri EA'dan anlamlı bir farkla daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla p=0.01, p=0.01, p=0.01, p=0.001).

F ise diğer antibiyotiklerle kıyaslandığında etkinlik yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Negatif kontrole göre kıyaslama yapıldığında özellikle eradikasyon deneylerinde F'nin TOB, CIP, MEM ve EA'den daha etkili, EA ise TOB, CIP, MEM ve F'den daha düşük etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Fakat istatistiksel analizde bu fark anlamlı bulunmamıştır.

5.TARTIŞMA

P. aeruginosa, pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve cerrahi alan enfeksiyonları dahil olmak üzere sağlıkla ilişkili birçok enfeksiyon türüne neden olmaktadır. Genellikle hastanedeki veya bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde ve özellikle kronik akciğer hastalığı olan hastalarda oldukça tehlikelidir. Bu bakteriler, neden oldukları enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin etkilerinden kaçınmak için sürekli yeni yollar bulmaktadırlar. Birkaç tür antibiyotiğe birden direnç geliştirerek karbapenemler dahil çoklu ilaca dirençli hale gelebilir. Bu mikroplarla kirlenmiş suya veya toprağa maruz kaldıklarında sağlık bakım ortamlarındaki insanlara yayılabilir. Sağlık bakımı ortamlarında kontamine eller, ekipman veya yüzeyler yoluyla bir kişiden diğerine yayılabilir. Bu bakteri enfeksiyonlarının tedavisi de daha zor hale gelmektedir [171].

Fırsatçı patojen *P. aeruginosa*'yı içeren bazı enfeksiyonların kronik olmasının açıklamalarından birisi bu mikroorganizmanın bakterilerin konakçı savunmalarından ve antibiyotikler tarafından öldürülmekten kendini koruduğu biyofilm yapıları oluşturma konusunda becerikli olmasıdır [172].

P. aeruginosa, sağlam biyofilmler ürettiği bilinen bir bakteridir ve biyofilmleri, kistik fibroz veya yara enfeksiyonu olanlar dahil olmak üzere bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi sorunlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu benzersiz biyofilm özellikleri, biyofilm enfeksiyonunun eradikasyonunu daha da karmaşıklaştırarak kronik enfeksiyonların gelişmesine yol açmaktadır [173].

P. aeruginosa enfeksiyon direncinde biyofilm üretimi, çoklu ilaç direnci, akciğerin farklı bölgelerinde patojen rezervuarlarının oluşumu ve kalıcı, hareketsiz bakteri formları anahtar faktörler olarak bilinmektedir [174].

P. aeruginosa biyofilmi ile ilişkili enfeksiyonların antibiyotiklerle tedavisi zordur. Biyofilmin farklı katmanları boyunca, *P. aeruginosa* popülasyonu heterojendir ve metabolik aktivitesini yerel mikro çevreye uyarlama konusunda oldukça iyi bir yetenek sergilemektedir [175].

Biyofilm içindeki bakteriler, aynı suşun planktonik hücrelerine oranla antimikrobiyal tedaviye daha toleranslıdır. Yapılan çalışmalar, biyofilm bakterilerinin

planktonik muadillerine göre antimikrobiyal tedaviye binlerce kat daha toleranslı olduğunu göstermiştir [132].

Bakteriyel biyofilmler, bozulmuş antibiyotik difüzyonu, antibiyotik akışı, besin ve oksijen sınırlaması, biyofilm spesifik genetik mekanizmaların ekspresyonu, dirençli mutantların seçimi veya toleranslı hücrelerin hayatta kalması gibi sebeplerden dolayı biyofilm yapıları antibiyotik tedavisi ile eradike edilememektedir [175].

P. aeruginosa'nın patojenitesi, quorum sensing (QS) sistemi tarafından kontrol edilmektedir. QS sisteminin inhibisyonu, mikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek için potansiyel bir strateji olarak görülmektir [171].

P. aeruginosa, tolerans mekanizmalarını ve biyofilmdeki tedavi stratejilerini araştırmak için çoğunlukla bir çalışma modeli olarak kullanılmış olsa da, bugüne kadar *P. aeruginosa* biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi ile ilgili herhangi bir kılavuz bulunmamaktadır [175].

Çalışmamızda *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine Tobramisin (TOB), Siprofloksasin (CIP), Meropenem (MEM) antibiyotiklerinin ve Furanon (F) ve Elajik Asit (EA) doğal bileşiklerinin karşılaştırmalı olarak inhibisyon ve eradikasyon etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan in vitro çalışmalar, CIP'in *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın bakteriyel biyofilmine karşı en aktif ajanlardan biri olduğunu göstermiştir. Bunun sebebinin de florokinolonların büyümeyen bakterileri öldüren biyofilmlere nüfuz etme kabiliyetiyle ilgili olduğu düşünülmüştür [176], [177]. Çalışmamızda CIP' in biyofilm inhibisyonuna etkisi anlamlı bir farkla MEM'den daha yüksek ($p=0.01$) bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarla benzer bulgular tespit edilmiştir.

Gupta ve ark. (2016) *P. aeruginosa* PA01 ve 4 adet klinik *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada CIP'in biyofilm inhibisyon etkisine bakılmıştır. 0,06 µg/mL konsantrasyonunda CIP' in tüm suşlarda biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. [178]. Bizim çalışmamızda CIP (0,086 µg/mL) 8 µg/mL konsantrasyonunda negatif kontrole (0,091 µg/mL) göre inhibisyon MBIK etkisi göstermiştir (Tablo 0-1). MBIK MTT çalışmasında ise negatif kontrole (0,393 µg/mL) göre 64 µg/mL konsantrasyonda 0,374 µg/mL'lik bir aktivite göstermiştir (Tablo 0-2).

Eradikasyon çalışmamızda negatif kontrolümüz 0,116 µg/mL iken CIP (0,244 µg/mL)'in 64 µg/mL konsantrasyonda eradikasyona en yakın bir aktivite sergilediği gözlenmiştir (Tablo 0-3). MBEK MTT çalışmasında ise CIP herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Wang ve ark. (2019) yaptıkları bir çalışmada *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* biyofimlerinde fosfomisin, siprofloksasin ve gentamisin antibiyotiklerinin sinerjistik etkisini araştırmışlardır. Planktonik koşullarda CIP' in (MIK = 0.25 µg / mL ve MBK = 1 µg / mL) *P. aeruginosa*'ya karşı etkili bir bakterisidal aktivite gösterdiğini, ancak bir mikrotitre biyofilm modelinde çok daha düşük bir aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir [179].

Bizim çalışmamız da bunu desteklemektedir.

P. aeruginosa suşlarının oluşturduğu biyofilmin eradikasyonu üzerine yapılan bir araştırmada *P. aeruginosa* suşuna karşı CIP'in biyofilm minimum eradikasyon konsantrasyon (MBEK) değerinin, planktonik formu için bildirilen MİK değerinin 16 katı daha fazla olduğu gözlenmiştir [180].

Bakteriyel biyofilmlerin eradikasyonu, planktonik bakterilerin öldürülmesine oranla önemli ölçüde daha yüksek antibiyotik konsantrasyonları gerektirmektedir [175].

Cao ve ark. (2015) tarafından *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada planktonik bakteri hücrelerinin % 99' undan fazlasının tobramisin (TOB) tedavisi ile öldürüldüğü, ancak biyofilm oluştuktan sonra bakteri hücrelerindeki azalmanın % 25'e kadar düştüğü gözlenmiştir [181].

Castaneda ve ark. *P. aeruginosa* ATCC 27853 biyofilmi üzerine yaptıkları bir çalışmada tobramisinin etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda TOB biyofilm minimum eradikasyon konsantrasyonunun MBEK değerinin 2000 µg/mL olarak gözlemlediklerini bildirmişlerdir [182].

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları ile yapılan bir çalışmada; CIP ve TOB antibiyotiklerinin *P. aeruginosa* bakterisinin planktonik formu ve biyofilm formu üzerindeki etkisine bakılmıştır. Planktonik formlarında siprofloksasin için 0,25-2 µg/mL, tobramisin için 0,25 – 16 µg/mL MİK değer aralıklarını bulmuşlardır. Biyofilm formları üzerine antibiyotiklerin MBEK değer aralıklarını CIP için 80 - 1280 µg/mL, TOB için 160-2560 µg/mL bildirmişlerdir [14].

Bizim çalışmamızda TOB 16 µg/mL konsantrasyonda negatif kontrole (0,091 µg/mL) göre 0,090 µg/mL'lik bir inhibisyon göstermiştir (Tablo 0-4). MBIK MTT çalışmasında negatif kontrole (0,393 µg/mL) göre TOB 32 µg/mL konsantrasyonda 0,365 µg/mL değerinde bir aktivite sergilemiştir (Tablo 0-5). Eradikasyon çalışmamızda da araştırmaya alınan antibiyotiklerden tobramisin hariç hiç biri etkili bulunmamıştır. Negatif kontrolümüz 0,116 µg/mL iken TOB (0,159 µg/mL)'un 64 µg/mL konsantrasyonda 3 kat artarak eradikasyona en yakın bir aktivite sergilediği gözlenmiştir (Tablo 0-6). MBEK MTT çalışmasında ise TOB'da CIP gibi herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Kistik fibrozlu hastalarda *P.aeruginosa* biyofilmi üzerine yapılan bir çalışmada tobramisin, siprofloksasin ve meropenem' in biyofilm inhibisyonundaki etkileri değerlendirilmiştir. Sırasıyla CIP, TOB ve MEM için MIK değerleri 0,5; 2; 0,5 mg / L olarak bulunmuştur. Biyofilm inhibisyon konstantrasyonları ise sırasıyla CIP, TOB ve MEM için 1; 4; 2 mg / L olarak belirlenmiştir [183]

Bizim çalışmamızda MEM' de TOB gibi 16 µg/mL konsantrasyonda negatif kontrole (0,091 µg/mL) göre 0,091 µg/mL bir inhibisyon göstermiştir (Tablo 0-7). MBIK MTT çalışmasında negatif kontrole (0,393 µg/mL) göre MEM'de CIP gibi 64 µg/mL konsantrasyonda 0,357 µg/mL'lik bir aktivite sergilemiştir (Tablo 0-8). Eradikasyon (MBEK) çalışmasında ve MBEK MTT çalışmasında da MEM herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Antibiyotikler ile yapılan calışmalarda antibiyotiklerin biyofilmde hücre ölümünü tetiklese bile bakteriyel biyofilmleri tamamen eradike edemediği gözlenmiştir [184].

Bizim bulgularımızın da uyumluluk gösterdiği gözlenmiştir.

Avustralya deniz makroalglerinden Delisea pulchra' dan elde edilen halojenli furanonlar gibi doğal olarak oluşan furanonlarla yapılan bir çalışma halojenli furanon bileşiğinin *P. aeruginosa*'da AHL aracılı QS ile etkileşime girebildiğini ve önemli virülans faktörlerinin üretimini azaltabildiğini göstermiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu biyofilm oluşumunun inhibe edildiği bildirilmiştir [163].

Yapılan bir başka çalışmada ise furanon bileşiklerinin *P. aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens*' de quorum sensing (QS) moleküllerini inhibe ettiği bildirilmiştir [95]

Furanonların kimyasal yapısı, QS sisteminin sinyal molekülleri olan açil homoserin lakton (AHL)' lere benzerdir. Bu benzerlikten dolayı *P. aeruginosa*'da furanonlar, AHL'lere yanıt veren düzenleyici protein olan LasR proteinini bağlar ve böylece AHL bağlanması ile rekabet eder [185].

Bunlara ek olarak furanonun, endokardite ve apselere neden olabilen oral ve intestinal flora üyeleri *olan Streptococcus anginosus, Streptococcus intermedius* ve *Streptococcus mutans* tarafından oluşturulan biyofilm oluşumunu inhibe ettiği de bildirilmiştir [186].

Çalışmamızda *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine furanonun inhibisyon ve eradikasyon etkileri araştırılmıştır. Biyofilm inhibisyonu üzerine furanonun olumlu etkileri gözlenmiştir.

F, 256 µg/mL konsantrasyonda negatif kontrole (0,091 µg/mL) göre 0,084 µg/mL bir inhibisyon göstermiştir (Tablo 0-11). MBIK MTT çalışmasında negatif kontrole (0,393 µg/mL) göre yine 256 µg/mL konsantrasyonda 0,397 µg/mL'lik bir aktivite tespit edilmiştir.

Eradikasyon çalışmamızda negatif kontrolümüz 0,116 µg/mL iken F (0,272 µg/mL)'nun 512 µg/mL konsantrasyonda eradikasyona en yakın bir aktivite sergilediği belirlenmiştir (Tablo 0-12). MBEK MTT çalışmasında ise, yine 512 µg/mL konsantrasyonda negatif kontrole (0,262 µg/mL) göre canlı hücre sayısında 0,293 µg/mL'lik en yakın bir performans sergilediği gözlenmiştir. MBEK MTT çalışmasında Tek aktifite gösteren furanon olmuştur.

Pseudomonas putida biyofilmi oluşumu üzerine yapılan bir çalışmada elajik asitin *P. putida*'da anti- QS aktivitesi gösterdiği, swarming hareketliliğini ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir [187].

Yapılan bir başka çalışmada *P. aeruginosa* biyofilminde elajik asidin (EA) *P. aeruginosa* virülans faktörleri üzerindeki etkisi kontrol edilmiştir. 0,5 mg / ml konsantrasyonunda EA' in *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin üretiminde sadece % 10-15 azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [7].

Candida albicans'ın oluşturduğu biyofilm ile yapılan bir araştırmada EA' in *C. albicans* büyümesini doza bağımlı olarak % 0.68 - % 82.44 inhibe ettiği saptanmıştır [188].

Çalışmamızda *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm üzerine EA' in inhibisyon ve eradikasyon etkisine bakılmıştır. *P. aeruginosa* biyofilmi için EA etkisi etkin bulunmamıştır.

Sonuç olarak. günümüzde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavi edilememesinin en büyük sebebi bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmeleridir. Son zamanlarda yapılan tüm çalışmalar, antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde tolerans gösteren kalıcı hücrelerin, biyofilmlerin antibiyotiklerden kaçma kabiliyetinde önemli bir rol oynadığını doğrulamaktadır. Bu nedenle de biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler tek başına yeterli olamamaktadır. Bütün bu bilgiler doğrultusunda enfeksiyonlarla mücadele edebilmek için yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu yüzden biyofilm inhibisyonu veya eradikasyonu yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması bu enfeksiyonlarla mücadele edebilmek için oldukça önemlidir. Bu konuda QS inhibitörlerinin alternatif antibiyofilm ajanlar olabileceği düşünülmektedir. QS inhibitörleri artan antibiyotik dozajlarının dikkatsiz ve yaygın kullanımı nedeniyle birçok bakterinin antibiyotik direnci sorununun çözümü için tedavilerde kullanılabilecek yeni nesil ilaçlar olarak çekici hedefler olarak görülmektedirler. Ayrıca QS inhibitörlerinin antibiyotiklerle kombine tedavisinde antibiyotiklerin etkinliğini artıracağı da düşünülmektedir.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz verilerin istatiksel analizinde kullanılan her bir antibiyotiğin ve doğal bileşiklerin en yüksek 4 dozlarındaki OD karşılaştırıldığında; CIP etkisi anlamlı bir farkla MEM'den daha yüksek ($p=0.01$) saptanmıştır. TOB, MEM, CIP ve F etkileri EA'dan anlamlı bir farkla daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.001$).

F ise diğer antibiyotiklerle kıyaslandığında etkinlik yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır. Negatif kontrole göre kıyaslama yapıldığında özellikle eradikasyon deneylerinde F'nin TOB, CIP, MEM ve EA'den daha etkili, EA'in ise TOB, CIP, MEM ve F'den daha düşük etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Fakat istatistiksel analizde bu fark anlamlı bulunmamıştır.

Bu sonuçlar bize, özellikle yüksek doz antibiyotik gereksimini duyan dirençli bakterilerde antibiyotiklerin toksik etkilerinden korunmak için furanon biyofilme karşı savaşmak için umut veren yeni bir doğal alternatif tedavi olarak kullanılabileceğini

düşündürmektedir. Bu hipotezi desteklemek için daha geniş çaplı araştırmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

[1] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, ve M. A. Pfaller, *Medical microbiology*, 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016.

[2] J. Y. Ho, N. J. Cira, J. A. Crooks, J. Baeza, ve D. B. Weibel, "Rapid Identification of ESKAPE Bacterial Strains Using an Autonomous Microfluidic Device", *PLoS ONE*, c. 7, sy 7, s. e41245, Tem. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041245.

[3] H. W. Boucher *vd.*, "Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America", *Clin Infect Dis*, c. 48, sy 1, ss. 1-12, Oca. 2009, doi: 10.1086/595011.

[4] L. B. Rice, "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE", *The Journal of Infectious Diseases*, c. 197, sy 8, ss. 1079-1081, Nis. 2008, doi: 10.1086/533452.

[5] L. B. Rice, "Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens", *Infection Control & Hospital Epidemiology*, c. 31, sy S1, ss. S7-S10, Kas. 2010, doi: 10.1086/655995.

[6] O. Ciofu ve T. Tolker-Nielsen, "Tolerance and Resistance of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Antimicrobial Agents—How P. aeruginosa Can Escape Antibiotics", *Front. Microbiol.*, c. 10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00913.

[7] S. Sarabhai, P. Sharma, ve N. Capalash, "Ellagic Acid Derivatives from Terminalia chebula Retz. Downregulate the Expression of Quorum Sensing Genes to Attenuate Pseudomonas aeruginosa PAO1 Virulence", *PLoS ONE*, c. 8, sy 1, s. e53441, Oca. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0053441.

[8] K. G. Kerr ve A. M. Snelling, "Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary", *Journal of Hospital Infection*, c. 73, sy 4, ss. 338-344, Ara. 2009, doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020.

[9] A. Alhazmi, "Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms", *IJB*, c. 7, sy 2, s. p44, Şub. 2015, doi: 10.5539/ijb.v7n2p44.

[10] C. L. Ventola, "The Antibiotic Resistance Crisis", *P T*, c. 40, sy 4, ss. 277-283, Nis. 2015.

[11] A. L. Adonizio, K. Downum, B. C. Bennett, ve K. Mathee, "Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida", *Journal of Ethnopharmacology*, s. 9, 2006.

[12] Y.-H. Li ve X. Tian, "Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms", *Sensors (Basel)*, c. 12, sy 3, ss. 2519-2538, Şub. 2012, doi: 10.3390/s120302519.

[13] M. Hentzer ve M. Givskov, "Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections", *J Clin Invest*, c. 112, sy 9, ss. 1300-1307, Kas. 2003, doi: 10.1172/JCI20074.

[14] S. Dosler ve E. Karaaslan, "Inhibition and destruction of Pseudomonas aeruginosa biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides", *Peptides*, c. 62, ss. 32-37, Ara. 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.021.

[15] A. Furiga, B. Lajoie, S. El Hage, G. Baziard, ve C. Roques, "Impairment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum-Sensing Inhibitor", *Antimicrob. Agents Chemother.*, c. 60, sy 3, ss. 1676-1686, Mar. 2016, doi: 10.1128/AAC.02533-15.

[16] A. Ghadaksaz, A. A. I. Fooladi, H. Mahmoodzadeh Hosseini, ve M. Amin, "The prevalence of some Pseudomonas virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates", *J Appl Biomed*, c. 13, sy 1, ss. 61-68, Şub. 2015, doi: 10.1016/j.jab.2014.05.002.

[17] B. M. Fontaine *vd.*, "Identification of Ellagic Acid Rhamnoside as a Bioactive Component of a Complex Botanical Extract with Anti-biofilm Activity", *Front. Microbiol.*, c. 8, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00496.

[18] S. Peppoloni *vd.*, "The β-Lactamase Inhibitor Boronic Acid Derivative SM23 as a New Anti-Pseudomonas aeruginosa Biofilm", *Front. Microbiol.*, c. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00035.

[19] M. F. Siddiqui, "Biofouling control potential of tannic acid, ellagic acid, and epigallocatechin against Pseudomonas aeruginosa and reverse osmosis

membrane multispecies community", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, s. 8, 2015.

[20] C. Ceci, P. M. Lacal, L. Tentori, M. G. De Martino, R. Miano, ve G. Graziani, "Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid", *Nutrients*, c. 10, sy 11, Kas. 2018, doi: 10.3390/nu10111756.

[21] S. Munir *vd.*, "Quorum Sensing Interfering Strategies and Their Implications in the Management of Biofilm-Associated Bacterial Infections", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, c. 63, 2020, doi: 10.1590/1678-4324-2020190555.

[22] T. Maeda *vd.*, "Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds", *The ISME Journal*, c. 6, sy 3, Art. sy 3, Mar. 2012, doi: 10.1038/ismej.2011.122.

[23] E. Olivares, S. Badel-Berchoux, C. Provot, G. Prévost, T. Bernardi, ve F. Jehl, "Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections", *Front. Microbiol.*, c. 10, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.02894.

[24] P. D. Lister, D. J. Wolter, ve N. D. Hanson, "Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms", *Clinical Microbiology Reviews*, c. 22, sy 4, ss. 582-610, Eki. 2009, doi: 10.1128/CMR.00040-09.

[25] (Pitt TL Simpson AJH, "Pseudomonas and Bulkholderia spp.", içinde *Principles and practice of clinical bacteriology*, 2006.

[26] S. Gillespie ve P. M. Hawkey, *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. John Wiley & Sons, 2006.

[27] D. Golemi-Kotra, "Pseudomonas Infections", içinde *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2008, ss. 1-8.

[28] D. L. Paterson ve B.-N. Kim, "Pseudomonas aeruginosa", içinde *Antimicrobial Drug Resistance*, D. L. Mayers, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, ss. 811-817.

[29] G. Brooks, K. C. Carroll, J. Butel, ve S. Morse, *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26/E*. Blacklick: McGraw-Hill Publishing, 2012.

[30] B. H. Iglewski, *Pseudomonas*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

[31] W. Wu, Y. Jin, F. Bai, ve S. Jin, "Pseudomonas aeruginosa", içinde *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, ss. 753-767.

[32] S. Fujitani, K. S. Moffett, ve V. L. Yu, "Pseudomonas aeruginosa", *Antimicrobe*, 2017, Erişim: Ara. 27, 2020. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: http://www.antimicrobe.org/b112.asp.

[33] K. C. Carroll *vd.*, "Pathogenesis of Bacterial Infection", içinde *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 27. bs, New York, NY: McGraw-Hill Education, 2019.

[34] K. Todar, "Mechanisms of Bacterial Pathogenicity", *Todar's Online Textbook of Bacteriology*, 2020. http://textbookofbacteriology.net/pathogenesis.html (erişim Ara. 17, 2020).

[35] M. L. Vasil, "Pseudomonas aeruginosa: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology", *The Journal of Pediatrics*, c. 108, sy 5, ss. 800-805, May. 1986, doi: 10.1016/S0022-3476(86)80748-X.

[36] O. Karatuna ve A. Ya, "Pseudomonas aeruginosa'da virülans faktörleri ve quorum sensing", *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, c. 38, sy 1, ss. 42-51, 2008.

[37] N. M. Moore ve M. L. Flaws, "Epidemiology and Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Infections", *Clin Lab Sci*, c. 24, sy 1, ss. 43-46, Oca. 2011, doi: 10.29074/ascls.24.1.43.

[38] D. Nguyen ve P. K. Singh, "Evolving stealth: Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during cystic fibrosis infections", *Proc Natl Acad Sci U S A*, c. 103, sy 22, ss. 8305-8306, May. 2006, doi: 10.1073/pnas.0602526103.

[39] K. C. Blomquist ve D. E. Nix, "A Critical Evaluation of Newer β-Lactam Antibiotics for Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections", *Ann*

Pharmacother, s. 1060028020974003, Kas. 2020, doi: 10.1177/1060028020974003.

[40] M. C. Persoon, A. F. Voor in't holt, C. C. H. Wielders, D. Gommers, M. C. Vos, ve J. A. Severin, "Mortality associated with carbapenem-susceptible and Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase-positive Pseudomonas aeruginosa bacteremia", *Antimicrob Resist Infect Control*, c. 9, sy 1, s. 25, Ara. 2020, doi: 10.1186/s13756-020-0682-4.

[41] A. I. Hidron *vd.*, "Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007", *Infection Control & Hospital Epidemiology*, c. 29, sy 11, ss. 996-1011, Kas. 2008, doi: 10.1086/591861.

[42] S. Malhotra, D. Hayes, ve D. J. Wozniak, "Cystic Fibrosis and Pseudomonas aeruginosa: the Host-Microbe Interface", *Clinical Microbiology Reviews*, c. 32, sy 3, Haz. 2019, doi: 10.1128/CMR.00138-18.

[43] S. Moreau-Marquis, B. A. Stanton, ve G. A. O'Toole, "Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review", *Pulm Pharmacol Ther*, c. 21, sy 4, ss. 595-599, Ağu. 2008, doi: 10.1016/j.pupt.2007.12.001.

[44] J. A. Driscoll, S. L. Brody, ve M. H. Kollef, "The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections", *Drugs*, c. 67, sy 3, ss. 351-368, Şub. 2007, doi: 10.2165/00003495-200767030-00003.

[45] K. Smitten, "Catheter-associated Urinary Tract Infections", *MetalloBio*, 2020. https://www.metallobio.com/blog/catheter-associated-urinary-tract-infections (erişim Ara. 26, 2020).

[46] M. M. Folic, Z. Djordjevic, N. Folic, M. Z. Radojevic, ve S. M. Jankovic, "Epidemiology and risk factors for healthcare-associated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Chemotherapy*, ss. 1-8, Eyl. 2020, doi: 10.1080/1120009X.2020.1823679.

[47] Y. Kurmoo *vd.*, "Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections", *Biomaterials Science*, c. 8, sy 5, ss. 1464-1477, 2020, doi: 10.1039/C9BM00875F.

[48] Y. López ve S. M. Soto, "The Usefulness of Microalgae Compounds for Preventing Biofilm Infections", *Antibiotics (Basel)*, c. 9, sy 1, Ara. 2019, doi: 10.3390/antibiotics9010009.

[49] J. Gómez-Junyent *vd.*, "In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of continuous ceftazidime infusion alone and in combination with colistin against Pseudomonas aeruginosa biofilm", *International Journal of Antimicrobial Agents*, s. 106246, Kas. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106246.

[50] M. Yasir *vd.*, "Mechanism of Action of Surface Immobilized Antimicrobial Peptides Against Pseudomonas aeruginosa", *Front. Microbiol.*, c. 10, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.03053.

[51] J. W. Peterson, "Bacterial Pathogenesis", içinde *Medical Microbiology*, 4th bs, S. Baron, Ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

[52] R. Mutlu ve A. Eren Topkaya, "The Effect of Curcumin to the Several Virulance Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolates Which Obtained From Respiratory Tract Samples of Cystic Fibrosis Patients", *TMCD*, 2017, doi: 10.5222/TMCD.2017.106.

[53] B. Siriken ve V. Öz, "Pseudomonas aeruginosa: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması", *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, sy 18, ss. 42-52, 2017.

[54] S. Coleman, "Swarming motility in Pseudomonas aeruginosa : a complex adaptation with implications for antibiotic resistance and virulence", University of British Columbia, 2020.

[55] C. M. Toutain, M. E. Zegans, ve G. A. O'Toole, "Evidence for Two Flagellar Stators and Their Role in the Motility of Pseudomonas aeruginosa", *JB*, c. 187, sy 2, ss. 771-777, Oca. 2005, doi: 10.1128/JB.187.2.771-777.2005.

[56] T. Inoue, R. Shingaki, ve K. Fukui, "Inhibition of swarming motility of Pseudomonas aeruginosa by branched-chain fatty acids: Swarming inhibition by

fatty acids", *FEMS Microbiology Letters*, c. 281, sy 1, ss. 81-86, Nis. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01089.x.

[57] D.-G. Ha, S. L. Kuchma, ve G. A. O'Toole, "Plate-Based Assay for Swimming Motility in Pseudomonas aeruginosa", içinde *Pseudomonas Methods and Protocols*, A. Filloux ve J.-L. Ramos, Ed. New York, NY: Springer, 2014, ss. 59-65.

[58] T. S. Murray ve B. I. Kazmierczak, "FlhF Is Required for Swimming and Swarming in Pseudomonas aeruginosa", *Journal of Bacteriology*, c. 188, sy 19, ss. 6995-7004, Eki. 2006, doi: 10.1128/JB.00790-06.

[59] S. R. Coleman, T. Blimkie, R. Falsafi, ve R. E. W. Hancock, "Multidrug Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Cells", *Antimicrob Agents Chemother*, c. 64, sy 3, ss. e01999-19, /aac/64/3/AAC.01999-19.atom, Ara. 2019, doi: 10.1128/AAC.01999-19.

[60] S. Cesur ve A. P. Demiröz, "Antibiotics and the Mechanisms of Resistance to Antibiotics", *MJIWAS*, c. 21, sy 4, ss. 138-142, 2013, doi: 10.12816/0002645.

[61] N. Pandey ve M. Cascella, *Beta Lactam Antibiotics*. StatPearls Publishing, 2020.

[62] K. Poole, "Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa", *Antimicrob Agents Chemother*, c. 49, sy 2, ss. 479-487, Şub. 2005, doi: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.

[63] S. T. Sultana, D. R. Call, ve H. Beyenal, "Eradication of Pseudomonas aeruginosa biofilms and persister cells using an electrochemical scaffold and enhanced antibiotic susceptibility", *npj Biofilms Microbiomes*, c. 2, sy 1, s. 2, Ara. 2016, doi: 10.1038/s41522-016-0003-0.

[64] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, ve H. M. Lappin-Scott, "Microbial biofilms", *Annu. Rev. Microbiol.*, c. 49, ss. 711-745, 1995, doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

[65] L. Friedman ve R. Kolter, "Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix", *J. Bacteriol.*, c. 186, sy 14, ss. 4457-4465, Tem. 2004, doi: 10.1128/JB.186.14.4457-4465.2004.

[66] F. A ve V. I, "Biofilm: set-up and organization of a bacterial community", *Med Sci (Paris)*, c. 19, sy 1, ss. 77-83, Oca. 2003, doi: 10.1051/medsci/200319177.

[67] M. Whiteley *vd.*, "Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms", *Nature*, c. 413, sy 6858, ss. 860-864, Eki. 2001, doi: 10.1038/35101627.

[68] J. W. Costerton, G. G. Geesey, ve K.-J. Cheng, "How Bacteria Stick", *Sci Am*, c. 238, sy 1, ss. 86-95, Oca. 1978, doi: 10.1038/scientificamerican0178-86.

[69] R. M. Donlan ve J. W. Costerton, "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms", *Clin Microbiol Rev*, c. 15, sy 2, ss. 167-193, Nis. 2002, doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

[70] G. A. O'Toole, "Microtiter Dish Biofilm Formation Assay", *JoVE*, sy 47, s. 2437, Oca. 2011, doi: 10.3791/2437.

[71] H.-C. Flemming ve J. Wingender, "The biofilm matrix", *Nat Rev Microbiol*, c. 8, sy 9, ss. 623-633, Eyl. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2415.

[72] S. S. Sagar, R. Kumar, ve S. D. Kaistha, "Inhıbıtıon Of Dıfferent Stages Of Bıofilm Of Pseudomonas Aerugınosa Pa01 By Isolated Bacterıophage P2", c. 8, sy 2, s. 4, 2015.

[73] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, ve H. O. Sintim, "Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents", *Future Medicinal Chemistry*, c. 7, sy 4, ss. 493-512, Mar. 2015, doi: 10.4155/fmc.15.6.

[74] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, ve P. Tribedi, "Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review", *Arch Microbiol*, c. 198, sy 1, ss. 1-15, Oca. 2016, doi: 10.1007/s00203-015-1148-6.

[75] R. M. Donlan, "Biofilms: Microbial Life on Surfaces", *Emerg Infect Dis*, c. 8, sy 9, ss. 881-890, Eyl. 2002, doi: 10.3201/eid0809.020063.

[76] D. J. Wozniak *vd.*, "Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 Pseudomonas aeruginosa biofilms", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 100, sy 13, ss. 7907-7912, Haz. 2003, doi: 10.1073/pnas.1231792100.

[77] M. Jamal *vd.*, "Bacterial biofilm and associated infections", *Journal of the Chinese Medical Association*, c. 81, sy 1, ss. 7-11, Oca. 2018, doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

[78] M. Crouzet *vd.*, "Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies", *BMC Microbiol*, c. 14, Eyl. 2014, doi: 10.1186/s12866-014-0253-z.

[79] T. Rasamiravaka, Q. Labtani, P. Duez, ve M. El Jaziri, "The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms", *BioMed Research International*, 2015. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/759348/ (erişim Şub. 12, 2020).

[80] R. Vasudevan, "Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance", *JMEN*, c. 1, sy 3, Haz. 2014, doi: 10.15406/jmen.2014.01.00014.

[81] A. Temel ve B. Eraç, "Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance", *TMCD*, 2018, doi: 10.5222/TMCD.2018.001.

[82] N. Akçelik ve M. Akçelik, "Bakteriyel Biyofilmler ve Konakçı Savunma Sistemi ile Etkileşimleri", *ErciyesUniversity Journal of Natural and Applied Sciences*, c. 33, sy 1, 2017.

[83] M. J. Federle ve B. L. Bassler, "Interspecies communication in bacteria", *J Clin Invest*, c. 112, sy 9, ss. 1291-1299, Kas. 2003, doi: 10.1172/JCI20195.

[84] K. K. Jefferson, "What drives bacteria to produce a biofilm?", *FEMS Microbiology Letters*, c. 236, sy 2, ss. 163-173, Tem. 2004, doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x.

[85] N. C. Güvensen ve S. Ekmekcio, "Biyofilm Kontrolünde Biyositler Ve Etki Tarzları", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, c. 14, sy 1, ss. 1-19, 2016.

[86] C. M. Waters ve B. L. Bassler, "QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, c. 21, sy 1, ss. 319-346, Kas. 2005, doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.

[87] W. C. Fuqua, S. C. Winans, ve E. P. Greenberg, "Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.", *J Bacteriol*, c. 176, sy 2, ss. 269-275, Oca. 1994.

[88] A. Jayaraman ve T. K. Wood, "Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease", *Annual Review of Biomedical Engineering*, c. 10, sy 1, ss. 145-167, 2008, doi: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536.

[89] C. D. Sifri, "Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense", *Clin Infect Dis*, c. 47, sy 8, ss. 1070-1076, Eki. 2008, doi: 10.1086/592072.

[90] D. G. Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, ve E. P. Greenberg, "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm", *Science*, c. 280, sy 5361, ss. 295-298, Nis. 1998, doi: 10.1126/science.280.5361.295.

[91] R. G. Abisado, S. Benomar, J. R. Klaus, A. A. Dandekar, ve J. R. Chandler, "Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions", *mBio*, c. 9, sy 3, Tem. 2018, doi: 10.1128/mBio.02331-17.

[92] S. T. Rutherford ve B. L. Bassler, "Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control", *Cold Spring Harb Perspect Med*, c. 2, sy 11, Kas. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a012427.

[93] C. Fuqua, M. R. Parsek, ve E. P. Greenberg, "Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing", *Annual Review of Genetics*, c. 35, sy 1, ss. 439-468, 2001, doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913.

[94] N. B. Turan ve G. Ö. Engin, "Quorum Quenching", içinde *Comprehensive Analytical Chemistry*, c. 81, Elsevier, 2018, ss. 117-149.

[95] M. Manefield *vd.*, "Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein", *Microbiology*, c. 145, sy 2, ss. 283-291, Şub. 1999, doi: 10.1099/13500872-145-2-283.

[96] C. Grandclément, M. Tannières, S. Moréra, Y. Dessaux, ve D. Faure, "Quorum quenching: role in nature and applied developments", *FEMS Microbiology Reviews*, c. 40, sy 1, ss. 86-116, Oca. 2016, doi: 10.1093/femsre/fuv038.

[97] F. Hemmati *vd.*, "Quorum Quenching: A Potential Target for Antipseudomonal Therapy", *Infection and Drug Resistance*, Ağu. 24, 2020. https://www.dovepress.com/quorum-quenching-a-potential-target-for-antipseudomonal-therapy-peer-reviewed-fulltext-article-IDR (erişim Ara. 27, 2020).

[98] A. K. Bhardwaj, K. Vinothkumar, ve N. Rajpara, "Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance", *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, c. 8, sy 1, ss. 68-83, Nis. 2013, doi: 10.2174/1574891x11308010012.

[99] K.-M. Yeon, C.-H. Lee, ve J. Kim, "Magnetic Enzyme Carrier for Effective Biofouling Control in the Membrane Bioreactor Based on Enzymatic Quorum Quenching", *Environ. Sci. Technol.*, c. 43, sy 19, ss. 7403-7409, Eki. 2009, doi: 10.1021/es901323k.

[100] T. R. De Kievit, "Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms", *Environmental Microbiology*, c. 11, sy 2, ss. 279-288, Şub. 2009, doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x.

[101] J. Lee *vd.*, "A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response", *Nature Chemical Biology*, c. 9, sy 5, Art. sy 5, May. 2013, doi: 10.1038/nchembio.1225.

[102] P. Williams ve M. Cámara, "Quorum sensing and environmental adaptation in Pseudomonas aeruginosa: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules", *Curr Opin Microbiol*, c. 12, sy 2, ss. 182-191, Nis. 2009, doi: 10.1016/j.mib.2009.01.005.

[103] P. N. Jimenez, G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, ve W. J. Quax, "The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in Pseudomonas aeruginosa", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, c. 76, sy 1, ss. 46-65, Mar. 2012, doi: 10.1128/MMBR.05007-11.

[104] C. Van Delden ve B. H. Iglewski, "Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections.", *Emerg Infect Dis*, c. 4, sy 4, ss. 551-560, 1998.

[105] L. R. Hoffman *vd.*, "Pseudomonas aeruginosa lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression", *Journal of Cystic Fibrosis*, c. 8, sy 1, ss. 66-70, Oca. 2009, doi: 10.1016/j.jcf.2008.09.006.

[106] E. C. Pesci *vd.*, "Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa", *Proc Natl Acad Sci U S A*, c. 96, sy 20, ss. 11229-11234, Eyl. 1999.

[107] S. Gil-Perotin *vd.*, "Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept", *Critical Care*, c. 16, sy 3, s. R93, 2012, doi: 10.1186/cc11357.

[108] T.-F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart, ve G. A. O'Toole, "A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance", *Nature*, c. 426, sy 6964, Art. sy 6964, Kas. 2003, doi: 10.1038/nature02122.

[109] D. Davies, "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents", *Nat Rev Drug Discov*, c. 2, sy 2, ss. 114-122, Şub. 2003, doi: 10.1038/nrd1008.

[110] B. D. Hoyle ve J. W. Costerton, "Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms", içinde *Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques*, E. Jucker, Ed. Basel: Birkhäuser Basel, 1991, ss. 91-105.

[111] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, ve A. Buret, "The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms", *J Clin Microbiol*, c. 37, sy 6, ss. 1771-1776, Haz. 1999.

[112] P. S. Stewart ve J. William Costerton, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms", *The Lancet*, c. 358, sy 9276, ss. 135-138, Tem. 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.

[113] J. L. Del Pozo, "Biofilm-related disease", *Expert Review of Anti-infective Therapy*, c. 16, sy 1, ss. 51-65, Oca. 2018, doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.

[114] U. Römling ve C. Balsalobre, "Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies", *Journal of Internal Medicine*, c. 272, sy 6, ss. 541-561, 2012, doi: 10.1111/joim.12004.

[115] H. Wu, C. Moser, H.-Z. Wang, N. Høiby, ve Z.-J. Song, "Strategies for combating bacterial biofilm infections", *Int J Oral Sci*, c. 7, sy 1, ss. 1-7, Mar. 2015, doi: 10.1038/ijos.2014.65.

[116] R. M. Donlan, "Biofilms and Device-Associated Infections - Volume 7, Number 2—April 2001 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC", *Emerging Infectious Diseases*, c. 7, sy 2, 2001, doi: 10.3201/eid0702.700277.

[117] L. R. Mulcahy, V. M. Isabella, ve K. Lewis, "Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Disease", *Microb Ecol*, c. 68, sy 1, ss. 1-12, Tem. 2014, doi: 10.1007/s00248-013-0297-x.

[118] R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, ve V. Tiwari, "Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action", *Virulence*, c. 9, sy 1, ss. 522-554, Ara. 2018, doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.

[119] I. Ozturk, A. N. Yurtman, B. Erac, S. Gul-Yurtsever, S. Ermertcan, ve M. Hosgor-Limoncu, "In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates", *Bratisl Lek Listy*, c. 115, sy 8, ss. 483-486, 2014, doi: 10.4149/bll_2014_093.

[120] S. S. Atshan, M. N. Shamsudin, L. T. T. Lung, Z. Sekawi, E. Ghaznavi-Rad, ve C. P. Pei, "Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms", *J. Biomed. Biotechnol.*, c. 2012, s. 417247, 2012, doi: 10.1155/2012/417247.

[121] G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. O. Anglen, ve B. J. Gainor, "Methods for Evaluating Attached Bacteria and Biofilms: An Overview", içinde *Handbook of Bacterial Adhesion*, c. 0, New Jersey: Humana Press, 2000, ss. 213-233.

[122] T. A. Fassel ve C. E. Edmiston, "Evaluating Adherent Bacteria and Biofilm Using Electron Microscopy", içinde *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, Y. H. An ve R. J. Friedman, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2000, ss. 235-248.

[123] S. Kırmusaoğlu, "The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents", içinde *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, S. Kırmusaoğlu, Ed. IntechOpen, 2019.

[124] G. D. Christensen *vd.*, "Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.", *Journal of Clinical Microbiology*, c. 22, sy 6, ss. 996-1006, 1985, doi: 10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985.

[125] D. J. Freeman, F. R. Falkiner, ve C. T. Keane, "New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci", *J. Clin. Pathol.*, c. 42, sy 8, ss. 872-874, Ağu. 1989, doi: 10.1136/jcp.42.8.872.

[126] R. F. Rampelotto *vd.*, "Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, c. 51, sy 6, ss. 761-767, Ara. 2018, doi: 10.1590/0037-8682-0171-2018.

[127] J. H. Merritt, D. E. Kadouri, ve G. A. O'Toole, "Growing and Analyzing Static Biofilms", *Curr Protoc Microbiol*, c. 0 1, s. Unit-1B.1, Tem. 2005, doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.

[128] B. M. Coffey ve G. G. Anderson, "Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate", içinde *Pseudomonas Methods and Protocols*, c. 1149, A. Filloux ve J.-L. Ramos, Ed. New York, NY: Springer New York, 2014, ss. 631-641.

[129] R. Sharp, G. Hughes, A. Hart, ve J. T. Walker, "Bacteriophage for the treatment of bacterial biofilms", WO2004062677A9, Eki. 07, 2004.

[130] M. E. Cortés, J. C. Bonilla, ve R. D. Sinisterra, "Biofilm formation, control and novel strategies for eradication", s. 10, 2011.

[131] E. Mishchenko, *Antibacterial and anti-biofilm activity of novel marine natural product mimics*. UiT The Arctic University of Norway, 2017.

[132] A. D. Verderosa, M. Totsika, ve K. E. Fairfull-Smith, "Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review", *Front. Chem.*, c. 7, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00824.

[133] A. Taraszkiewicz, G. Fila, M. Grinholc, ve J. Nakonieczna, "Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance", *BioMed Research International*, 2013. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/150653/ (erişim Şub. 10, 2020).

[134] G. Brackman ve T. Coenye, "Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents", *CPD*, c. 21, sy 1, ss. 5-11, Kas. 2014, doi: 10.2174/13816128206661409051146 27.

[135] P. Saxena, Y. Joshi, K. Rawat, ve R. Bisht, "Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms", *Indian J Microbiol*, c. 59, sy 1, ss. 3-12, Mar. 2019, doi: 10.1007/s12088-018-0757-6.

[136] J. B. Kaplan, "Biofilm Dispersal", *J Dent Res*, c. 89, sy 3, ss. 205-218, Mar. 2010, doi: 10.1177/0022034509359403.

[137] M. Zezzi do Valle Gomes ve M. Nitschke, "Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria", *Food Control*, c. 25, sy 2, ss. 441-447, Haz. 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.11.025.

[138] A. Shahid *vd.*, "Innovative Strategies for the Control of Biofilm Formation in Clinical Settings", *Bacterial Biofilms*, Eki. 2019, doi: 10.5772/intechopen.89310.

[139] B. Girennavar *vd.*, "Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, c. 125, sy 2, ss. 204-208, Tem. 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.028.

[140] M. Alipour, Z. E. Suntres, R. M. Lafrenie, ve A. Omri, "Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, c. 65, sy 4, ss. 684-693, Nis. 2010, doi: 10.1093/jac/dkq036.

[141] S. M. Soto, "Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches", *Advances in Biology*, c. 2014, ss. 1-13, 2014, doi: 10.1155/2014/543974.

[142] H. Wolfmeier, D. Pletzer, S. C. Mansour, ve R. E. W. Hancock, "New Perspectives in Biofilm Eradication", *ACS Infect. Dis.*, c. 4, sy 2, ss. 93-106, Şub. 2018, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00170.

[143] D. Pires, S. Sillankorva, A. Faustino, ve J. Azeredo, "Use of newly isolated phages for control of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and ATCC 10145 biofilms", *Research in Microbiology*, c. 162, sy 8, ss. 798-806, Eki. 2011, doi: 10.1016/j.resmic.2011.06.010.

[144] K. Hori ve S. Matsumoto, "Bacterial adhesion: From mechanism to control", *Biochemical Engineering Journal*, c. 48, sy 3, ss. 424-434, Şub. 2010, doi: 10.1016/j.bej.2009.11.014.

[145] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, ve H. O. Sintim, "Agents that inhibit bacterial biofilm formation", *Future Medicinal Chemistry*, c. 7, sy 5, ss. 647-671, Nis. 2015, doi: 10.4155/fmc.15.7.

[146] A. Raza *vd.*, "Oral meropenem for superbugs: challenges and opportunities", *Drug Discovery Today*, s. S1359644620304694, Kas. 2020, doi: 10.1016/j.drudis.2020.11.004.

[147] J. R. Edwards, "Meropenem: a microbiological overview", *J Antimicrob Chemother*, c. 36, sy suppl_A, ss. 1-17, Tem. 1995, doi: 10.1093/jac/36.suppl_A.1.

[148] D. N. Fish ve T. J. Singletary, "Meropenem, a new carbapenem antibiotic", *Pharmacotherapy*, c. 17, sy 4, ss. 644-669, Ağu. 1997.

[149] B. Saran ve Z. C. Karahan, "Antimicrobial Agents at a Glance", *Turkish Urology Seminars*, c. 1, sy 8, ss. 216-220, Ara. 2010, doi: 10.5152/tus.2010.31.

[150] A. F. Nogueira ve B. Nunes, "Effects of low levels of the antibiotic ciprofloxacin on the polychaete Hediste diversicolor: biochemical and behavioural effects", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, c. 80, s. 103505, Kas. 2020, doi: 10.1016/j.etap.2020.103505.

[151] J. Porras, C. Bedoya, J. Silva-Agredo, A. Santamaría, J. J. Fernández, ve R. A. Torres-Palma, "Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic

ciprofloxacin in water", *Water Research*, c. 94, ss. 1-9, May. 2016, doi: 10.1016/j.watres.2016.02.024.

[152] G. Reyhanoglu ve A. K. R. Reddivari, "Tobramycin", içinde *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

[153] A. Shakeri, M. R. Zirak, ve A. Sahebkar, "Ellagic Acid: A Logical Lead for Drug Development?", *Current Pharmaceutical Design*, c. 24, May. 2017, doi: 10.2174/1381612823666171115094557.

[154] A. Borges, A. C. Abreu, J. Malheiro, M. J. Saavedra, ve M. Simões, "Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals", s. 10, 2013.

[155] E. Saldanha *vd.*, "Polyphenols in the Prevention of Acute Pancreatitis", içinde *Polyphenols in Human Health and Disease*, Elsevier, 2014, ss. 427-433.

[156] Z. Kiasalari *vd.*, "Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: an exploration of underlying mechanisms", *Psychopharmacology*, c. 234, sy 12, ss. 1841-1852, Haz. 2017, doi: 10.1007/s00213-017-4589-6.

[157] R. De *vd.*, "Antimicrobial activity of ellagic acid against Helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, c. 73, sy 6, ss. 1595-1603, Haz. 2018, doi: 10.1093/jac/dky079.

[158] R. de Nys, M. Givskov, N. Kumar, S. Kjelleberg, ve P. D. Steinberg, "Furanones", *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, c. 42, ss. 55-86, 2006, doi: 10.1007/3-540-30016-3_2.

[159] R. Maximilien *vd.*, "Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga Delisea pulchra", *AQUAT MICROB ECOL*, c. 15, sy 3, ss. 233-246, 1998.

[160] N. Ceyhan, "Klinikte Biyofilmlerin Önlenmesi İçin Antibiyofilm Stratejileri", s. 14, 2008.

[161] L. K. Vestby *vd.*, "Synthetic brominated furanone F 202 prevents biofilm formation by potentially human pathogenic *E scherichia coli* O 103: H 2 and *S almonella* ser. A gona on abiotic surfaces", *J Appl Microbiol*, c. 116, sy 2, ss. 258-268, Şub. 2014, doi: 10.1111/jam.12355.

[162] R. Kuehl *vd.*, "Furanone at Subinhibitory Concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by luxS Repression", *AAC*, c. 53, sy 10, ss. 4159-4166, Eki. 2009, doi: 10.1128/AAC.01704-08.

[163] M. Hentzer *vd.*, "Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound", *Microbiology*, c. 148, sy 1, ss. 87-102, 2002, doi: 10.1099/00221287-148-1-87.

[164] I. S. Sharafutdinov *vd.*, "Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2(5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and -Susceptible Staphylococcus aureus", *Front. Microbiol.*, c. 8, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02246.

[165] M. Hentzer *vd.*, "Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors", *EMBO J.*, c. 22, sy 15, ss. 3803-3815, Ağu. 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg366.

[166] T. H. Jakobsen, T. Bjarnsholt, P. Ø. Jensen, M. Givskov, ve N. Høiby, "Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors", *Future Microbiology*, c. 8, sy 7, ss. 901-921, Tem. 2013, doi: 10.2217/fmb.13.57.

[167] M. Manefield, M. Welch, M. Givskov, G. P. C. Salmond, ve S. Kjelleberg, "Halogenated furanones from the red alga, Delisea pulchra, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen Erwinia carotovora", *FEMS Microbiology Letters*, 2001, doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10936.x.

[168] D. D. Gür *vd.*, "Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar", *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, c. 46, s. 213, 2016.

[169] A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, ve S. C. Kang, "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug", *Bangladesh J Pharmacol*, c. 12, sy 2, s. 8, Nis. 2017, doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892.

[170] S. Foongladda, D. Roengsanthia, W. Arjrattanakool, C. Chuchottaworn, A. Chaiprasert, ve S. G. Franzblau, "Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis", *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, c. 6, sy 12, 2002.

[171] P. Tielen, H. Kuhn, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, H.-C. Flemming, ve J. Wingender, "Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of Pseudomonas aeruginosa", *BMC Microbiol*, c. 13, s. 159, Tem. 2013, doi: 10.1186/1471-2180-13-159.

[172] J. W. Costerton, P. S. Stewart, ve E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections", *Science*, c. 284, sy 5418, ss. 1318-1322, May. 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1318.

[173] K. Lee ve S. S. Yoon, "Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness", *J Microbiol Biotechnol*, c. 27, sy 6, ss. 1053-1064, Haz. 2017, doi: 10.4014/jmb.1611.11056.

[174] G. Mangiaterra *vd.*, "Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable Pseudomonas aeruginosa in an In Vitro Biofilm Model", *Antibiotics (Basel)*, c. 9, sy 7, Tem. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9070399.

[175] A. Soares, K. Alexandre, ve M. Etienne, "Tolerance and Persistence of Pseudomonas aeruginosa in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives", *Front Microbiol*, c. 11, s. 2057, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.02057.

[176] F. Soboh, A. E. Khoury, A. C. Zamboni, D. Davidson, ve M. W. Mittelman, "Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated Pseudomonas aeruginosa biofilms", *Antimicrob Agents Chemother*, c. 39, sy 6, ss. 1281-1286, Haz. 1995, doi: 10.1128/aac.39.6.1281.

[177] M. K. Dasgupta, H. Shishido, S. Salama, R. Singh, M. Larabie, ve R. G. Micetich, "The effects of macrolide and quinolone antibiotics in methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm growth", *Adv Perit Dial*, c. 13, ss. 214-217, 1997.

[178] P. Gupta, S. Chhibber, ve K. Harjai, "Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of Pseudomonas aeruginosa causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence", *Indian J Med Res*, c. 143, sy 5, ss. 643-651, May. 2016, doi: 10.4103/0971-5916.187114.

[179] L. Wang, M. Di Luca, T. Tkhilaishvili, A. Trampuz, ve M. Gonzalez Moreno, "Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Biofilms", *Front. Microbiol.*, c. 10, s. 2522, Kas. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02522.

[180] A. Abdi-Ali, S. Hendiani, P. Mohammadi, ve S. Gharavi, "Assessment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii in Tehran", *Jundishapur J Microbiol*, c. 7, sy 1, Oca. 2014, doi: 10.5812/jjm.8606.

[181] B. Cao *vd.*, "Antibiotic penetration and bacterial killing in a Pseudomonas aeruginosa biofilm model", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, c. 70, sy 7, ss. 2057-2063, Tem. 2015, doi: 10.1093/jac/dkv058.

[182] P. Castaneda, A. McLaren, G. Tavaziva, ve D. Overstreet, "Biofilm Antimicrobial Susceptibility Increases With Antimicrobial Exposure Time":, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, c. 474, sy 7, ss. 1659-1664, Tem. 2016, doi: 10.1007/s11999-016-4700-z.

[183] L. Lutz, D. C. Pereira, R. M. Paiva, A. P. Zavascki, ve A. L. Barth, "Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients in biofilm", *BMC Microbiol*, c. 12, s. 196, Eyl. 2012, doi: 10.1186/1471-2180-12-196.

[184] F. Reffuveille, C. de la Fuente-Núñez, S. Mansour, ve R. E. W. Hancock, "A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms", *Antimicrob Agents Chemother*, c. 58, sy 9, ss. 5363-5371, Eyl. 2014, doi: 10.1128/AAC.03163-14.

[185] A. R. Kayumov, I. S. Sharafutdinov, E. Y. Trizna, ve M. I. Bogachev, "Chapter 6 - Antistaphylococcal activity of 2(5H)-furanone derivatives", içinde *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*, M. K. Yadav ve B. P. Singh, Ed. Elsevier, 2020, ss. 77-89.

[186] J. Lönn-Stensrud, F. C. Petersen, T. Benneche, ve A. A. Scheie, "Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci", *Oral Microbiol Immunol*, c. 22, sy 5, ss. 340-346, Eki. 2007, doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00367.x.

[187] B. Huber, L. Eberl, W. Feucht, ve J. Polster, "Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing", *Zeitschrift für Naturforschung C*, c. 58, sy 11-12, ss. 879-884, Ara. 2003, doi: 10.1515/znc-2003-11-1224.

[188] S. Nejatbakhsh, M. Ilkhanizadeh-Qomi, M. Razzaghi-Abyaneh, ve Z. Jahanshiri, "The Effects of Ellagic Acid on Growth and Biofilm Formation of Candida albicans", *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, c. 8, sy 1, ss. 14-18, Oca. 2020, doi: 10.29252/JoMMID.8.1.14.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FURANON C30 VE ELAJİK ASİT C11'İN PSEUDOMONAS AERUGINOSA BİYOFİLMİNİN ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİNİN TOBRAMİSİNİN ETKİSİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%7	%5	%2	%4
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
6	www.renfarma.com İnternet Kaynağı	<%1
7	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Özge	**Soyadı**	AKSU
Doğ.Yeri	GİRESUN	**Doğ.Tar.**	09.01.1994
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	19891998396
Email	ozgeaksu28@gmail.com	**Tel**	05302876588

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa/Tıbbi Mikrobiyoloji	-
Lisans	İnönü Üniversitesi-Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Nihat Gürel Anadolu Öğretmen Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	Orta		YÖKDİL - 75

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	72,4	70,07	66,8
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
MS Word	İyi
MS PowerPoint	İyi
MS Excel	İyi