



***Pseudomonas aeruginosa*'DA BİYOFİLM DİRENÇ
GENLERİ ÜZERİNE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN
ETKİLERİ**

Elif ARSLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI**

2022

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Pseudomonas aeruginosa*'DA BİYOFİLM DİRENÇ GENLERİ ÜZERİNE BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN ETKİLERİ**

Elif ARSLAN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

04 / 02 / 2022

Elif ARSLAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Pseudomonas aeruginosa*'DA BİYOFİLM DİRENÇ GENLERİ ÜZERİNE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ETKİLERİ**

Elif ARSLAN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Pseudomonas aeruginosa Gram-negatif, sporsuz, hareketli, kapsülsüz, çevre koşullarına kolaylıkla uyum sağlayabilen ve aynı zamanda biyofilm oluşturma yeteneğine sahip, fırsatçı bir patojendir. Hastane ve toplum kaynaklı *P. aeruginosa* izolatları çoklu ilaç direncine ve biyofilm-spesifik antibiyotik dirençliliğine sahiptir. Bu durum tedavilerde büyük problemlere yol açmaktadır. Biyofilm-spesifik antibiyotik dirençliliği veya biyofilm dirençliliği, biyofilm içerisinde büyüyen hücrelerin antibiyotiklere 10-1000 kat daha fazla dirençli olması ile yakın ilişkilidir. Bu tez çalışmasında, *P. aeruginosa*'da çeşitli genlerin biyofilm yapısındaki hücrelerde daha fazla eksprese edilmesi sonucu oluşan biyofilm dirençliliğinin bazı antibiyotikler varlığındaki durumları incelenmiştir. İlk olarak, *P. aeruginosa* (PAO1) suşu kullanılarak, siprofloksasin, tobramisin, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerinin disk difüzyon testi yapılmış ve mikrodilüsyon testi ile minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, kristal viole (CV) testi ile minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon (MBİK) değerleri ortaya koyulmuştur. Ardından, alt-MİK konsantrasyonlarında antibiyotik uygulaması yapılarak, antibiyotiklerin hareketlilik üzerindeki etkisi incelenmiştir. Son olarak, alt-MİK konsantrasyonda antibiyotik uygulaması ile koloni biyofilm testi yapılmış ve RNA'ları izole edilmiştir. Bu RNA'lar cDNA'ya çevrilerek, RT-PCR ile *ndvB*, *tssCI*, *PA2070* ve *PA5033* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Ek olarak, planktonik kültürlerle karşılaştırması yapılmıştır. Sonuçlarımıza göre, planktonik hücrelere kıyasla, fosfomisin dışındaki antibiyotiklerin biyofilm yapısında biyofilm direnç genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı görülmüştür. Ayrıca, antibiyotik uygulanmamış biyofilm yapısına kıyasla, antibiyotik uygulama gruplarında biyofilm direnç genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış meydana geldiği bulunmuştur.

2022, 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: *P. aeruginosa*, Biyofilm, Biyofilm dirençliliği, Koloni biyofilm testi, RT-PCR

ABSTRACT

MS. Thesis

EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS ON BIOFILM RESISTANCE GENES IN

Pseudomonas aeruginosa

Elif ARSLAN

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayşenur YAZICI

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative, sporeless, motile, non-encapsulated, aerobic, opportunistic pathogen that can easily adapt to environmental conditions and also has the ability to form biofilms. Hospital and community-acquired *P. aeruginosa* isolates have multidrug resistance and biofilm-specific antibiotic resistance. This situation causes great problems in treatment. Biofilm-specific antibiotic resistance or biofilm resistance is closely related to the fact that cells growing in a biofilm are 10-1000 times more resistant to antibiotics. In this thesis, biofilm resistance, which is caused by the higher expression of various genes in the biofilm structure, in the presence of some antibiotics in *P. aeruginosa* was investigated. First, a disc diffusion test of ciprofloxacin, tobramycin, fosfomycin and piperacillin/tazobactam antibiotics was performed using *P. aeruginosa* (PAO1) strain and minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined by microdilution test. In addition, the minimum biofilm inhibitor concentration (MBIC) values were determined by the crystal violet (CV) test. Then, the effect of antibiotics on motility was investigated by applying antibiotics at sub-MIC concentrations. Finally, colony biofilm testing was performed with sub-MIC concentration of antibiotics and their RNAs were isolated. These RNAs were converted into cDNA and expression levels of *ndvB*, *tssC1*, *PA2070* and *PA5033* genes were determined by using the RT-PCR technique. In addition, planktonic cultures were used to compare each group. According to our results, it was observed that antibiotics decreased the expression levels of biofilm resistance genes in the biofilm structure compared to planktonic cells except fosfomycin. In addition, biofilm resistance was observed in the antibiotic treatment groups compared to the non-antibiotic-treated biofilm structure.

2022, 67 page

Keywords: *P. aeruginosa*, Biofilm, Biofilm resistance, Colony biofilm assay, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezinde (YÜTAM) bulunan Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Finansal desteği sağlayan ETU, Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü birimine teőkükür ederim.

Lisans hayatımdan bu güne kadar, her zaman fikirleriyle yolumu aydınlatan, tez çalıőmam boyunca da desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI' ya teőkükürlerimi sunarım.

Tez çalıőmalarım süresince ve her zaman bana destek olan, birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaőlarım őeymanur OBANOğLU ve M. Kürőat COŐKUN'a teőkükür ederim.

Ayrıca, çalıőmalarım süresince ve hayatımın her döneminde manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, annem Rabiye SANCAR, babam İsmail SANCAR, kardeőlerim Beyza SANCAR, Sami Yusuf SANCAR, babaannem Aliye SANCAR hem bilimsel hem de manevi desteklerinden dolayı eőim Mehmet Enes ARSLAN ve sabırla bekleyen kızım Mona ARSLAN'a sonsuz teőkükür ederim. Rahmetle andığım, kıymetlilerim dedem Turan ANDİÇ, anneannem Saliha ANDİÇ'e okumaya ve okuyana gösterdikleri sayęı ve desteklerinden dolayı teőkükür ederim.

Beni her zaman yüreklendiren, iyi ve kötü her anımda yanımda olan, Sena ÖNER'e, her zaman iyi ki varsınız dediğim, tez çalıőmalarımda desteklerini eksik etmeyen İlknur ILTAŐ ve Sümeyye ÖZTÜRK'e teőkükür ederim.

Elif ARSLAN

őubat 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Dirençliliği	2
1.2. Quorum Sensing.....	3
1.3. Biyofilmler	4
1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da Biyofilm Yapısı	6
1.5. <i>P. aeruginosa</i> 'da Biyofilm Spesifik Antibiyotik Dirençliliği.....	8
1.6. Biyofilme Özgü Antibiyotik Direnç Genleri.....	11
1.6.1. <i>ndvB</i> geni.....	11
1.6.2. <i>tssC1</i> geni	12
1.6.3. <i>PA1875–1877</i>	13
1.6.4. <i>PA0756-0757, PA2070</i> ve <i>PA5033</i>	13
1.7. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonları.....	13
1.8. Tedavi Stratejileri.....	16
1.9. Antibiyotikler	18
1.9.1. Siprofloksasin.....	18
1.9.2. Tobramisin	19
1.9.3. Fosfomisin.....	20
1.9.4. Piperasilin/Tazobaktam.....	21
1.10. Tez Çalışmasının Amacı	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27

3.1.1. Cihazlar	27
3.1.2. Bakteri suşları ve sarf malzemeler	28
3.1.3. Mueller-Hinton Agar.....	28
3.1.4. Mueller-Hinton Broth.....	29
3.1.5. Luria- Bertani Broth Besiyeri (% 1 agar).....	29
3.1.6. Triptik Soy Broth	29
3.1.7. Molten Agar Besiyeri.....	29
3.1.8. Antibiyotikler	30
3.1.9. %0,1'lik Kristal viyole boyası.....	30
3.1.10. %30'luk Asetik asit.....	30
3.1.11. Agaroz jel hazırlama	30
3.1.12. Primerler.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Disk difüzyon testi	31
3.2.2. Mikrodilüsyon testi	32
3.2.3. Kristal viyole testi	32
3.2.4. Planktonik <i>P. aeruginosa</i> kültürleri ve büyüme eğrisinin çıkarılması.....	32
3.2.5. Hareketlilik testleri.....	33
3.2.6. Koloni biyofilm testi	33
3.2.7. RNA izolasyonu	33
3.2.8. cDNA sentezi	34
3.2.9. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR).....	34
3.2.10. İstatistiksel Analizler.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	36
4.1. Bakteri Suşunun Çizgi Ekimi.....	36
4.2. Disk Difüzyon Testi	36
4.3. Mikrodilüsyon (MİK) Testi Bulguları	38
4.4. Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi.....	38
4.5. Planktonik <i>P. aeruginosa</i> Kültürleri ve Büyüme Eğrisi Grafiği.....	41
4.6. Hareketlilik Testleri Sonuçları	42
4.7. Koloni Biyofilm Gelişimi Sonuçları	43
4.8. RNA İzolasyonu.....	44
4.9. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları	45
4.9.1. Planktonik ve Biyofilm örneklerinde gen ekspresyonlarının karşılaştırılması	45

4.9.2. Siprofloksasin.....	46
4.9.3. Tobramisin	47
4.9.4. Fosfomisin.....	47
4.9.5. Piperasilin/Tazobaktam.....	48
4.9.6. Gen ekspresyonları değişiminde antibiyotiklerin karşılaştırılması.....	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR	54



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat derece
CFU	Koloni oluşturan birim
g	Gram
L	Litre
mm	Milimetre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

AHL	N-açıl-homoserin lakton
AI-2	Otoindükleyici-2
AMP	Antimikrobiyal peptitler
c-di-GMP	Siklik Dimerik Guanozin Monofosfat
CV	Kristal Viyole
eDNA	Hücre Dışı DNA
EPS	Ekstrapolimerik
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
GFP	Yeşil Floresan Protein
MBİK	Minumum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu
MDR	Çoklu İlaça Direnç
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NIH	Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler

PBS	Fosfat Buffer Salin
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu
PEM	Protein Epitop Mimetik
PHA	Polihidroksialkanoattan
QS	Yoğunluk Algılama
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimer Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris Asetat EDTA



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu.....	1
Şekil 1.2. QS mekanizması	4
Şekil 1.3. Biyofilm oluşum basamakları.....	5
Şekil 1.4. Biyofilm spesifik antibiyotik dirençliliği.....	8
Şekil 1.5. Siprofloksasinin kimyasal yapısı	18
Şekil 1.6. Tobramisin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 1.7. Fosfomisin kimyasal yapısı	21
Şekil 1.8. Piperasilin/tazobaktam kimyasal yapısı.....	22
Şekil 4.1. <i>P.aeruginosa</i> PAO1 referans suşunun petri görüntüsü.....	36
Şekil 4.2. Disk difüzyon testi görüntüsü.....	37
Şekil 4.3. Siprofloksasin antibiyotiğinin antibiyofilm aktivitesi	38
Şekil 4.4. Tobramisin antibiyotiğinin antibiyofilm aktivitesi.....	39
Şekil 4.5. Fosfomisin antibiyotiğinin antibiyofilm aktivitesi	39
Şekil 4.6. Piperasilin/tazobaktam antibiyotiğinin antibiyofilm aktivitesi.....	40
Şekil 4.7. Büyüme Eğrisi	41
Şekil 4.8. MA besiyerindeki kaynaşma hareketliliği	42
Şekil 4.9. Seyirme hareketliliği faz-kontrast mikroskopu görüntüleri.....	43
Şekil 4.10. Koloni biyofilm testi petri görüntüsü	44
Şekil 4.11. RNA örneklerinin jel görüntüsü	44
Şekil 4.12. Antibiyotik uygulanmamış planktonik ve biyofilm örneklerinin <i>ndvB</i> , <i>tssC1</i> , <i>PA5033</i> ve <i>PA2070</i> genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması..	45
Şekil 4.13. Planktonik ve biyofilm örneklerine siprofloksasin uygulamasında <i>ndvB</i> , <i>tssC1</i> , <i>PA5033</i> ve <i>PA2070</i> genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	46
Şekil 4.14. Tobramisin uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde <i>ndvB</i> , <i>tssC1</i> , <i>PA5033</i> ve <i>PA2070</i> genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	47
Şekil 4.15. Fosfomisin uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde <i>ndvB</i> , <i>tssC1</i> , <i>PA5033</i> ve <i>PA2070</i> genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	47
Şekil 4.16. Piperasilin/tazobaktam uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde <i>ndvB</i> , <i>tssC1</i> , <i>PA5033</i> ve <i>PA2070</i> genlerinin ekspresyon seviyeleri	48
Şekil 4.17. Planktonik gelişimde antibiyotiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi	49
Şekil 4.18. Biyofilm gelişimde antibiyotiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi ...	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

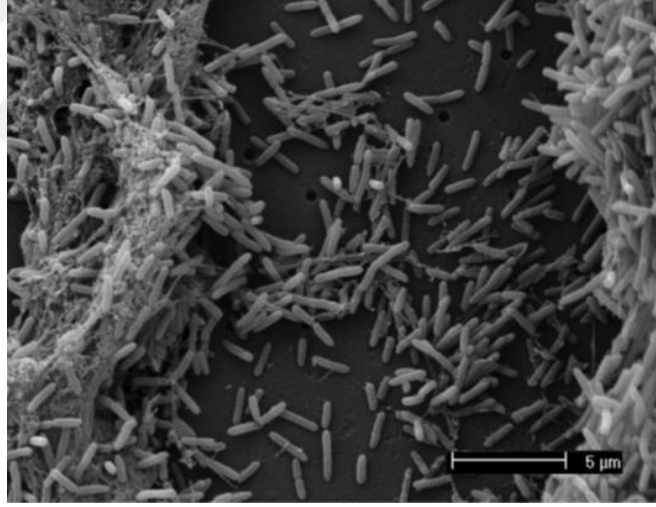
Çizelge 3.1. Cihazlar.....	27
Çizelge 3.2. Sarf malzemeler.....	28
Çizelge 3.3. Molten Agar Besiyeri.....	29
Çizelge 3.4. Primerler.....	31
Çizelge 3.5. cDNA 2X RT-Master Mix.....	34
Çizelge 4.1. Disk difüzyon zon çapları.....	37
Çizelge 4.2. MİK ve MBİK değerleri (µg/mL).....	40



1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa metabolik ve fizyolojik çeşitliliği çok yönlü olan, çeşitli ortamlarda hayatta kalabilen ve her yerde bulunabilen, *Pseudomonadaceae* familyasına ait Gram-negatif, basil şekilli bir bakteridir (Silby et al. 2011). Spor oluşturmeyen ve fermentatif olmayan özellikte olup, 1-3 µm uzunluğunda ve 0,5-1,0 µm genişliğindedir.

P. aeruginosa kolonileri, genellikle düzdür ve yayılı olarak gelişir. Çoğunlukla tırtıklı bir kenara sahiptir. Birçok *P. aeruginosa* izolatı, piyosiyenin (mavi), pyorubin (kırmızı), pyomelanin (kahverengi-siyah) ve/veya pyoverdin (sarı) gibi suda çözünür pigment üretmektedir. İndofenol oksidaz, katalaz ve arginin testlerinde kuvvetli pozitif sonuç verir. *P. aeruginosa* en iyi aerobik ortamda gelişir, ancak terminal elektron alıcısı olarak nitrat varlığında anaerobik olarak da gelişebilir. Yetiştirilmesi için en uygun sıcaklık 37°C olmasına rağmen, 42°C'de de gelişme gösterir (Causapé 2018).



Şekil 1.1. *P. aeruginosa* PAO1 suşu (Woodworth et al. 2014)

İnsanlar için fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, karmaşık ve büyük bir genom (5-7 Mb) sahiptir. Genom büyüklüğü, metabolik çok yönlülüğünü, taşıma ve salgılama sistemine dahil olan çok sayıda gen ve suşa bağımlı olarak değişen genom plastisitesini ve hemen hemen her ortama uyum sağlamasını ve kalıcı olma yeteneğini açıklamaktadır.

P. aeruginosa, dünya çapında insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde bakteriyel enfeksiyonun yaygın nedenlerinden biridir (Bradbury 2009). Bağışıklığı baskılanmış kişilerde solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili olan ciddi hastalıklara neden olmaktadır (Sadikot et al. 2005). Örneğin, genetik bir hastalık olan kistik fibroz (KF), akciğerlerde kusurlara neden olarak, KF'li hastaları kronik *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonlarına yatkın hale getirir (Şekil 1.1.) (Lyczak et al. 2002).

1.1. *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Dirençliliği

Modern tıbbın en büyük problemlerinden biri antibiyotiklere dirençli bakterilerin gelişmesidir. *P. aeruginosa* özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ve bağışıklığı zayıflamış olan hastalarda kendini gösteren, çoklu ilaca dirençli (multi-drug resistance) fırsatçı bir patojendir (Lyczak et al. 2002). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, antibiyotiğe dirençlilikte kritik seviyede olduğu belirtilmektedir (Anonymous 2019).

P. aeruginosa'da antibiyotik direnci birçok faktörden kaynaklanmaktadır. *P. aeruginosa*'nın duyarlı suşları, β -laktamlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı bazal seviyede azaltılmış duyarlılık sergilemektedir. Penisilin ve oksasilin gibi birçok β -laktam bileşiğine, aminopenisilinlere (β -laktamaz inhibitörleri olanlar dahil), 1. ve 2. nesil sefalosporinlere (örn. sefalotin, sefoksitin ve sefuroksim), bazı 3. nesil sefalosporinlere (örn. sefotaksim) ve karbapenemlerden ertapenem'e karşı spesifik duyarlılık göstermektedirler. Aminoglikozidlerden kanamisine ise doğal direnç göstermektedirler (Causapé 2018). Antibiyotiklere karşı direnç hem antibiyotik direncine hem de antibiyotik toleransına bağlanmıştır (Hall and Mah 2017; Lebeaux et al. 2014). Antibiyotik direnci genellikle çoklu ilaç akış pompalarının ekspresyonu ile ilişkilendirilir (Poole 2011; Li et al. 2015). Antibiyotik toleransı ise *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma eğilimi ile ilişkilendirilmiştir (Bjarnsholt et al. 2013; Mulchy et al. 2014; Hall and Mah 2017; Hoiby et al. 2019).

Genel olarak, *P. aeruginosa*'nın başlıca direnç mekanizmaları içsel ve adaptif direnç olarak ikiye ayrılmıştır. İçsel antibiyotik direnci, doğal yapısal veya işlevsel özellikler yoluyla belirli bir antibiyotiğin etkinliğini azaltmadaki doğuştan gelen

1. GİRİŞ

yeteneğini ifade etmektedir (Blair et al. 2015). *P. aeruginosa*'nın, dış membran geçirgenliğinin azlığı, antibiyotikleri hücre dışına pompalayan salgılama sistemleri ve β -laktamazlar gibi antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimi yoluyla çoğu antibiyotiğe karşı yüksek düzeyde içsel dirence sahip olduğu gösterilmiştir (Breidenstein et al. 2011).

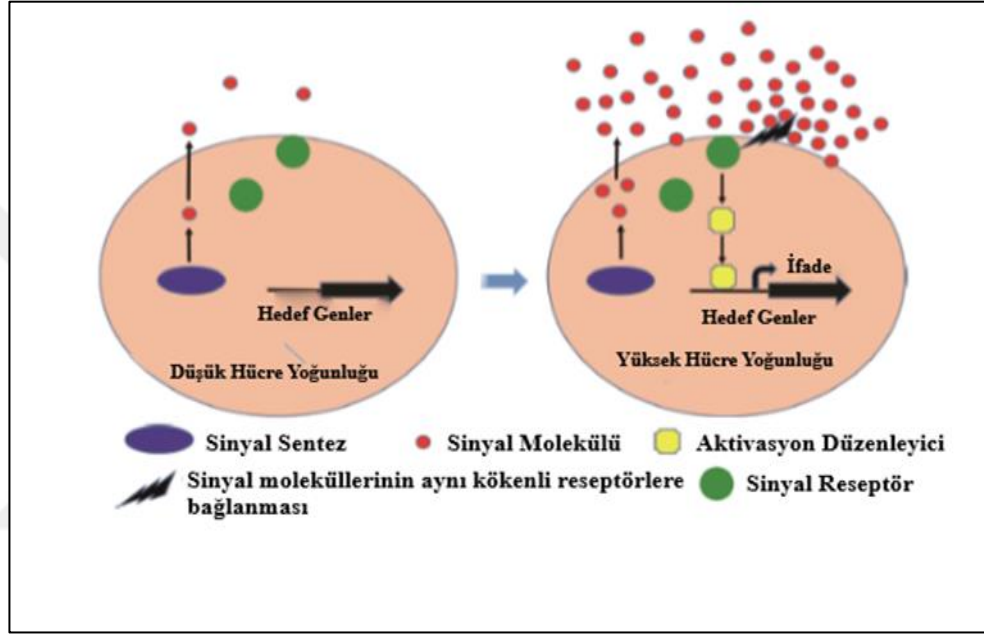
Bakteriler, mutasyonel değişiklikler, yatay gen transferi ve direnç genlerinin edinilmesi yoluyla antibiyotiklere dirençli hale gelebilirler. *P. aeruginosa*'nın yüksek düzeyde içsel antibiyotik direncine ek olarak, adaptif direnç, çoklu ilaca dirençli suşların gelişmesine büyük ölçüde katkıda bulunmuştur, bu da mikroorganizma ile mücadele etmekteki zorluğu artırır ve daha fazla kalıcı enfeksiyon vakasına yol açar. Mutasyonlarla direnç, mutasyonel değişiklikler, antibiyotik alımının azalmasına, antibiyotik hedeflerinin modifikasyonuna, salgı pompalarının ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin aşırı ekspresyonuna neden olabilir (Munita and Arias 2016).

1.2. Quorum Sensing

Bakterilerin biyofilm oluşumunu ve virülans faktörü üretimini belirleyen birçok faktör vardır. Bu sistem, hücre-hücre iletişimi olarak da bilinen yoğunluk algılama (QS) olarak adlandırılır. QS, bakterilerin popülasyon yoğunluğu veya çoğalma nedeniyle genlerini ifade etme şeklini düzenlediği bir araçtır (Hocquet et al. 2003). QS, düşük moleküler kütleli sinyal bileşikleri aracılığıyla bakteri popülasyonunda bir hücreden diğer hücreye sinyalleşmedir (Şekil 1.2.). Örneğin, N-açıl-homoserin lakton (AHL), peptid bazlı ve Gram-negatif ile ilişkili otoindükleyici-2 (AI-2), Gram-pozitif ve sırasıyla hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler, mikroorganizmaların mikrobiyal popülasyon hakkında iletişim kurmasına ve gen ekspresyonlarını buna göre senkronize etmesine izin verir (Whitehead et al. 2001; Wright 2005). QS ilk olarak deniz mikroorganizması olan *Vibrio fischeri*'de bulunmasına rağmen, diğer mikroorganizmalar üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. *P. aeruginosa*, AHL sentaz enzimlerinden birden fazla gen sorumlu olduğu için farklı tipte QS sinyal molekülleri ve algılama mekanizmalarına sahiptir (Nealson and Hastings 1979; Fuqua et al. 2001). *P. aeruginosa*'nın QS sistemindeki, Las, Rhl ve PQS sistemleri, biyofilm gelişimine etkisi olan fonksiyonel elementlerin üretiminde önemli roller oynamaktadır. Bunlar rhamnolipid, pyoverdine, pyocyanin, Pel polisakkaritleri ve lektinleri içerir. Rhamnolipid,

1. GİRİŞ

mikrokoloniler arasındaki gözenekleri ve kanalları koruma işlevi gören, sıvı ve besinlerin olgun biyofilmler içinde geçişini sağlayan ramnoz içeren bir glikolipidik bileşiktir. Pyoverdinin, ortamdaki demiri toplar ve biyofilm gelişimi için temel bir bileşen olarak hücreye iletebilir. Demirin sınırlı olduğu bir ortamda, seğirme motilitesi sabit büyümeden daha fazla tercih edilir ve bu nedenle biyofilm oluşumunu engeller (Jaurin and Grundstron 1981; Ouellette et al. 1987; Shaw et al. 1993; Livermore 1995; Masuda et al. 1999; Weldhagen 2004; Pamp and Nielsen 2007; Radjen et al. 2009; Rawat and Nair 2010).



Şekil 1.2. QS mekanizması (Lin et al. 2019)

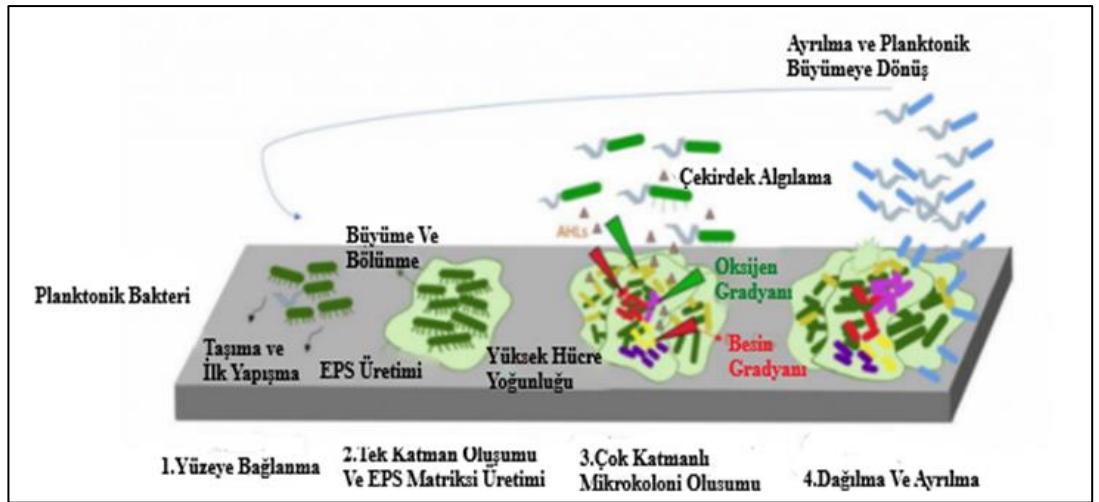
1.3. Biyofilmler

Bakteriyel biyofilm ilk kez 1978'de bir yüzeye yapışan ve hücre dışı bir polisakkarit matrisi üreten yapılandırılmış bir mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmıştır (Costerton et al. 1978). Keşfi, 1684 yılında diş plağı üzerinde bakteri kümelerini gözlemleyen Antoni Van Leeuwenhoek'e atfedilmiştir. Biyofilm, biyolojik veya biyolojik olmayan bir yüzeye yapışık olan ve ekstrapolimerik bir madde (EPS) ile çevrelenmiş bir bakteri popülasyonudur (Costerton 1995). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), tüm mikrobiyal ve kronik enfeksiyonların sırasıyla %65 ve %80'in biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Jamal et al. 2018).

1. GİRİŞ

Biyofilmler, genel olarak 4 aşamalı bir süreçte oluşur. İlk aşama planktonik haldeki hücrelerin yüzeylere temas ve tutunmalarının gerçekleştiği aşamadır. İkinci aşamada, yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan hücreler EPS moleküllerinin salınımını gerçekleştirir ve bu hücreler mikrokoloni oluştururlar. Sonra, QS mekanizmalarının devreye girmesi ile mikrokoloni gelişimi ve çoğalması gerçekleşir. Hücreler arasında besin ve su taşınımı için mikrokanallar oluşur. Son aşama olarak mikrokoloniden kopmalar meydana gelir (Ciofu et al. 2015). Çevresel ve genetik sinyallerin etkisi ile oluşan biyofilmler, heterojen yapıdadır ve insan sağlığına olumsuz etkileri vardır. Biyofilmlerin klinik açıdan en önemli özellikleri, planktonik haldeki hücrelere kıyasla antibiyotiklere karşı 10-1000 kat daha fazla dirençli olmalarıdır (Şekil 1.3.).

Biyofilmin, yüzeye yapışma ve büyüme yeteneği, bir hayatta kalma stratejisidir (Lebeaux and Ghigo 2012). Bakteriler, toprak ve su sistemleri de dahil olmak üzere birçok yüzeye tutunur. Orta kulak, dış kulak, akciğerler, kalp kapakçıkları, cerrahi implantlar, diş minesini ve tıbbi cihazlar üzerine de tutunabilirler (Donlan 2001). Hücreler tarafından üretilen AHL, biyofilm oluşumuna katkıda bulunan spesifik gen ekspresyonuna da yol açar. Diğer sinyaller, QS moleküllerinden gelir. Bu moleküller, hücreden hücreye sinyalleşmeye yardımcı olur ve *las* ve *rhl* gibi genler, bu moleküllerin bazılarının *Pseudomonas sp.*'de ifadesinden sorumludur (McKnight et al. 2000).



Şekil 1.3. Biyofilm oluşum basamakları (Li et al. 2022)

1.4. *P. aeruginosa*'da Biyofilm Yapısı

P. aeruginosa, iyi bilinen bir biyofilm oluşturunucudur ve bu da onu biyofilm oluşumunu incelemek için mükemmel bir model yapar (Thi et al. 2010). *P. aeruginosa* biyofilm matriksi polisakkaritleri, lipidleri, proteinleri ve hücre dışı DNA'yı (eDNA)'yı, içermektedir (Ghafoor et al. 2011).

Matriks, biyofilm biyokütlesinin %90'ından fazlasından sorumludur. Biyotik ve abiyotik yüzeylere yapışma için bir iskele görevi yaparak zorlu çevre koşullarında bakteriler için barınak görevi görür. Ayrıca, biyofilm yapısında ki hücreler için temel besinleri, sitozolik proteinleri, enzimleri ihtiva eder ve hücreden hücreye iletişimi kolaylaştırır (Thi et al. 2010). Üç ekzopolisakkarit olan Psl, Pel ve aljinat, biyofilm yapısının yüzey bağlanması, oluşumu ve stabilitesinde anahtar rol oynamaktadır (Ghafoor et al. 2011; Strempe et al. 2013).

Polisakkarit sentez lokusu *PA2231-2245*'den kodlanan Psl ekzopolisakkariti, bakteri hücrelerinin bir alt tabakaya yapışması ve biyofilm yapısını koruması için gereklidir (Matsukawa and Greenberg 2004; Friedmen and Kolter 2004; Ma et al. 2006). Psl, tipik olarak d-glukoz, d-mannoz ve l-ramnoz kısımları içeren nötr bir pentasakkarittir (Ma et al. 2009).

Psl, c-di-GMP (bis-(30 -50)-siklik dimerik guanozin monofosfat) üretimini teşvik eden bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir. c-di-GMP seviyesi yükselirse, daha kalın ve daha sağlam biyofilmler oluşur (Irie et al. 2012). Psl, biyofilm yapısı içinde bulunan bakterileri nötrofil fagositozundan ve antimikrobiyalardan koruyarak kalıcı enfeksiyon elde etmek için güçlü bir savunma sağlar (Mishra et al. 2012; Billings et al. 2013).

Pel, kısmen deasetillenmiş N-asetil-d-glukozamin ve N-asetil-d-galaktozaminin katyonik bir polisakkarit polimeridir. Psl gibi, Pel de mukoid olmayan *P. aeruginosa* suşlarında biyofilmin temel matriks bileşenidir. Biyofilm bütünlüğünün korunmasının

1. GİRİŞ

yanı sıra yüzey yapışmasının başlatılmasında rol oynamaktadır (Jennings et al. 2015). Pel, statik et suyu kültürünün hava-sıvı arayüzünde oluşan pelikül biyofilminden sorumludur. Psl ve Pel sentezi suşa özgüdür ve çevre koşullarına cevap olarak değiştirilebilir (Friedman and Kolter 2004). Pel, biyofilme gömülü bakterilerde aminoglikozit antibiyotiklere toleransı desteklemektedir (Colvin et al. 2011).

Aljinat, mannuronik asit ve guluronik asit kalıntılarından meydana gelen, negatif yüklü asetillenmiş bir polimerdir (Ertesvåg 2015). Aljinat, *mucA22* alelindeki bir mutasyon sonucu mukoid *Pseudomonas* suşlarının biyofilminde ağırlıklı olarak üretilir. Mukoid fenotipler çoğunlukla KF izolatlarında bulunur ve bu da akut enfeksiyondan kronik enfeksiyona dönüşümü gösterir (Folkesson et al. 2012; Ciofu et al. 2015). Aljinatın biyofilm olgunlaşması, opsonizasyondan korunma, fagositoz ve biyofilm yoluyla antibiyotiklerin difüzyonunun azalması gibi çok çeşitli önemli işlevleri bulunmaktadır (Hay et al. 2010; Tseng et al. 2013).

1996 yılında Palmgren ve Nielsen, aktif çamur ve saf kültürden izole edilen *Pseudomonas putida*'nın EPS matriksinde hücre dışı DNA'nın (eDNA) varlığını göstermişlerdir. eDNA, çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri türlerinde önemli bir biyofilm bileşeni olarak kabul edilmektedir. Örneğin fırsatçı insan patojeni *P. aeruginosa*'da eDNA, biyofilm oluşumu, yapının stabilitesi ve antibiyotiklere karşı koruma için gereklidir (Whitchurch et al. 2002). Hücre lizisi ile DNA çevreye salınır. Hücre lizisi hem biyofilmlerin erken gelişiminde hem de hücre duvarının yapısal hasarından dolayı çubuk şeklindeki bakterilerin şeklinin bozulmasına sebep olur. Hücre dışına salınan eDNA, sitozolik proteinler ve RNA, parçalanmış hücrelerden kaynaklanan zar parçaları yoluyla oluşturulan zar kesecikleri içine bulunur (Turnbull et al. 2016). eDNA çeşitli süreçlerde yer alır. Bunlar;

- Biyofilmdeki bakteri hücreleri için besin kaynağı olmak.
- Dış zar üzerinde bulunan iki değerlikli katyonlar (Mg^{2+} ve Ca^{2+}) ile etkileşime giren ve daha sonra konakçı içinde virülans faktörlerini yayan tip VI salgılama sistemini aktive eden bir katyon şelatörü olmak.
- Seğirme motilitesi yoluyla hücrel organizasyonu ve hizalamayı desteklemek.

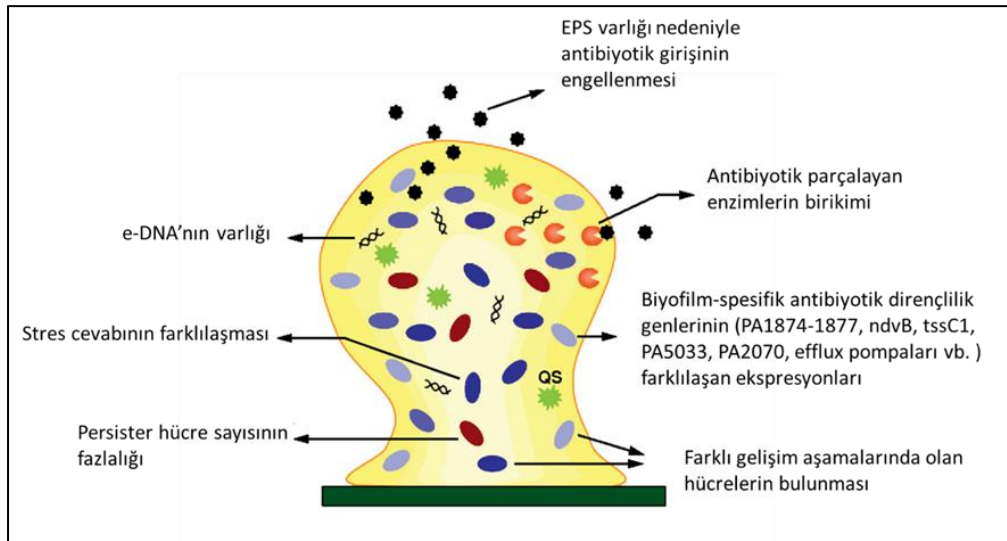
1. GİRİŞ

- eDNA'nın hücre dışında birikmesi, biyofilm ortamının ve enfeksiyon bölgesinin asidik hale gelmesini sağlayarak olarak antimikrobiyallerin penetrasyonunu sınırlamak.
- *P. aeruginosa* biyofilmlerinde, nötrofil tarafından aktive edilen inflamatuvar süreci etkileyebilmek. (Fuxman Bass et al. 2010; Wilton et al. 2016).

Biyofilm matriksinde doğrudan yapısal bir rol oynamayan, fakat biyofilm içindeki hücrelerde üretilen hücre içi biyopolimer olan polihidroksialkanoat (PHA) mevcuttur. Karbon ve enerji depolama polimeri olan PHA, abiyotik yüzeylere bağlanmanın yanında stres toleransı ile ilişkilendirilmiştir (Moradaly et al. 2017; Moradaly and Rehm 2020).

1.5. *P. aeruginosa*'da Biyofilm Spesifik Antibiyotik Dirençliliği

1990'ların sonlarına doğru, araştırmacılar biyofilm oluşumunun moleküler mekanizmalarına odaklanmışlardır ve biyofilm oluşumu için önemli olan genlerin sistematik karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir (Toole et al. 2000). Antibiyotik direnci genellikle bakterilerde kalıcı bir değişiklik, örneğin mutasyon veya yatay gen transferi yoluyla kazanılan direnç nedeniyle bir antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerindeki artış anlamına gelir. Bunun aksine, antibiyotik toleransı, hücrelerin geri dönüşümlü bir fenotipik duruma bağlı olarak bir antibiyotiğin etkisinden sağ çıkma yeteneğidir (Olsen 2015).



Şekil 1.4: Biyofilm spesifik antibiyotik dirençliliği (Fuente et al. 2013)

Biyofilmlerdeki antibiyotik direnci karmaşıktır ve içsel, kazanılmış ve uyarlanabilir mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. En önemlisi, çoklu gen ağlarının farklı ekspresyonu, hücre dışı matriks ve bir biyofilm kolonisi içindeki alt popülasyonların metabolik heterojenliği gibi biyofilme özgü özellikler, antibiyotik direncine büyük katkıda bulunur (Anderl et al. 2000; Walters et al. 2003). Biyofilmlerde antibiyotik direncine büyük ölçüde katkıda bulunan içsel ve adaptif mekanizmaların sinerji içinde çalışmasıdır. Biyofilm büyüme durumundaki *P. aeruginosa* hücreleri, planktonik duruma göre antimikrobiyal ajanlara karşı önemli ölçüde daha dirençlidir (Taylor et al. 2014).

P. aeruginosa'nın planktonik hücreleri dışı membran geçirgenliği, enzimatik inaktivasyon ve ilacın dışarı geri pompalanması gibi iç yollarla direnç gösterirler. Antibiyotiklere karşı biyofilm direnç mekanizmaları ise biyofilme antimikrobiyal penetrasyonun önündeki fiziksel veya kimyasal difüzyon engellerini, besin sınırlaması nedeniyle biyofilmin yavaş büyümesini, genel stres tepkisinin aktivasyonunu ve biyofilme özgü bir fenotipin ortaya çıkmasını içermektedir (Şekil 1.4.) (Mah and O'Toole 2001). Biyofilme özgü direnç veya tolerans mekanizmaları, biyofilmler içindeki yabancı tip genlerin ifadesinin sonucudur. Başka bir deyişle, biyofilme özgü antibiyotik direnci, mutasyonların sonucu değildir. Biyofilmlerin heterojen doğası göz önüne alındığında, genel olarak yüksek bir direnç seviyesi sağlamak için birden fazla direnç ve/veya tolerans mekanizmasının birlikte hareket etmesi gerekmektedir (Mah 2012). Biyofilmlerdeki direnç mekanizmaları şunları içerir:

1. Antibiyotiklerin biyofilme nüfuz etmemesi: Antimikrobiyallerin, bir bariyer görevi gören matriksi ile biyofilme nüfuz etmesi önlenir.

2. Yavaş büyüme oranı: Biyofilmlerde heterojen bakteri popülasyonu mevcuttur. Bu heterojen popülasyon ortamında biyofilmin iç kısmında anoksik ve asidik bölgelere neden olan lokal difüzyon gradyanları geliştirilir (De Beer 1997; Hall-Stoodley et al. 2004). Besin sınırlaması bir biyofilmdeki hücrelerin büyük bir kısmında yavaş büyümeye veya durağan faz varlığına yol açarak, antimikrobiyal duyarlılıklarını azaltır (Brown et al. 1988).

3. Değişen metabolizma: Biyofilmlerdeki bakterilerin farklı fizyolojik aktivitesi, biyofilmle ilişkili antimikrobiyal toleransın altında yatan bir neden olabilir. *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine yapılan çalışmalar, metabolik aktivitenin biyofilmin dış kısmında yüksek, iç kısmında ise düşük olduğunu göstermektedir (Werner et al. 2004; Pamp et al. 2008; Ciofu and Tolker Nielsen 2019). Biyofilmlerin iç kısmında yer alan düşük metabolik aktiviteye sahip biyofilm bakterilerinde, artan antimikrobiyal tolerans meydana gelmektedir (Ciofu et al. 2015).

4. Oksijen gradyentleri: Biyofilm derinliğindeki oksijen miktarı düşüktür. *P. aeruginosa*'da hipoksi, salgı pompalarının kompozisyonunu değiştirerek antibiyotik direncini artırmaktadır (Schaible et al. 2012).

5. Persister hücreler: Mikrobiyal popülasyonlarda rastlantısal olarak oluşan ve antibiyotiklere karşı oldukça toleranslı olan normal hücrelerin uykuda olan (metabolizması yavaşlamış olan) varyantlarıdır. Bakterisidal bir antibiyotik ile tedavi ediniminde normal hücreler ölür, persister yani kalıcı hücreler hayatta kalır (Lewis 2010). Persister hücreler, antibiyotik tedavisini takiben yeniden aktif hale geçebilir ve büyüyen bir duruma geri dönebilir, böylece enfeksiyonun nüksetmesine neden olabilir (Olsen 2015).

6. eDNA: hücre dışı matriks büyük miktarda eDNA içerir. eDNA ölü hücrelerden, dış zar veziküllerinden ve DNA'nın QS ile düzenlenmiş salınımından kaynaklıdır (Whithchurch et al. 2002). Enfeksiyon bölgelerindeki polimorfonükleer lökositlerden eksojen olarak türetilir (Allesen-Holm et al. 2006). eDNA'nın kaynağının endojen veya eksojen olup olmadığına bakılmaksızın eDNA, belirli antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direncini artırır. Eksojen kaynaklardan *P. aeruginosa* biyofilmlerine eklenen DNA, biyofilm matriksine dahil edilebilir, bu da tobramisin için 3 kat ve gentamisin için 2 kat artan direnç seviyesi ile sonuçlanır (Chiang et al. 2013). eDNA, *P. aeruginosa*'dan aktif olarak salgılanır, biyofilmin ilk oluşumu için gereklidir ve artan viskozite sağlar (Apse et al. 2012). Mulcahy ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *P. aeruginosa*'nın planktonik kültürüne DNA eklenmesinin büyüme üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu ve beraberinde eDNA'nın bakteri hücre zarlarını bozan ve hücre lizisine neden olan katyonları şelatladığını göstermişlerdir (Mulcahy et al. 2008).

7. Matriks: Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, kendi yakın çevrelerini oluşturan hidratlı hücre dışı polimerik maddeleri (EPS) ürettikleri bir matrikste yaşarlar. EPS temel olarak polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipidleri içerir. Matriks, biyofilmler için yapısal görev görür, hücelere koruma sağlar, hücre dışı enzimleri hücelere yakın tutarak, çözülmüş, kolloidal ve katı biyopolimerleri metabolize etmelerini sağlayan harici bir sindirim sistemi görevi görür (Flemming and Wingender 2010). Matriks, antibiyotikler gibi antimikrobiyal maddelere karşı bir bariyer görevi görebilir, bu bileşikler matriksin bileşenleri tarafından bağlanır. Bu özellik, matriksin tipine, antimikrobiyal ajanın tipine ve biyo-filmin yaşına göre değişir (Suci et al. 1994).

8. Stres: Evrensel stres genleri, kalın bir biyo-filmin yüzeyinde daha yüksek oranda eksprese edilirken, biyo-filmin derinliklerinde yavaş büyüyen hücreler, muhtemelen uzun süreli anoksili ortam nedeniyle, hipoksi ile düzenlenen genlerin çok az ekspresyonuna maruz kalır (Williamson et al. 2012). Örneğin; bölünen hücreler, tobramisin ve siprofloksasin tarafından öldürülmeye daha duyarlıyken, biyo-filmin derinliklerindeki hücreler yaşayabilir ancak antibiyotiğe toleranslı yavaş büyüme durumunda kalırlar (Van Acker et al. 2014).

1.6. Biyo-filme Özgü Antibiyotik Direnç Genleri

Direnç genleri sıklıkla, transpozonlar ve integronlar gibi mobil genetik elemanlarla birlikte bulunur ve bu şekilde DNA molekülleri arasında, örneğin farklı R plazmitleri arasında ve plazmit ve kromozom arasında bir blok olarak hareket ederler. Son araştırmalar, biyo-filme özgü antibiyotik toleransı ve direncine doğrudan dahil olabilecek genleri tanımladı. Bu genlerin, biyo-film özelliklerini etkileyen fenotipik faktörlerden daha güçlü olabileceği düşünülmektedir. Bu genlerin birçoğu, planktonik hücrelerdeki ekspresyonlarına kıyasla biyo-filmde yüksek oranda eksprese edilir (Olsen 2015).

1.6.1. *ndvB* geni

P. aeruginosa'nın *ndvB* gen ürünü, *Bradyrhizobium japonicum ndvB* ile %37 özdeş ve %58 benzerdir. *B. japonicum*'a olan bu dizi benzerliğine dayanarak, periplazmik

β -(1→3)-siklik glukanların sentezini katalize eden bir glukoziltransferaz enzimi *ndvB* genini kodladığı öngörülmüştür. Glukanların, periplazmadaki antibiyotikleri hücrel hedeflerinden uzaklaştırarak aminoglikozit direncini arttırdığı düşünülmektedir (Mah 2011; Hall et al. 2018). Aynı zamanda *ndvB*, etanol oksidasyonunda yer alan genlerin biyofilme spesifik ekspresyonu için, karakterize edilmemiş bir mekanizma yoluyla gereklidir. Bu *ndvB* tarafından düzenlenen genler, biyofilm direncinde de bir rol oynayabilir (Beaudoin et al. 2012). *P. aeruginosa* siklik glukanlar, β -(1,3) bağlarıyla bağlanan ve fosfogliseroil ile modifiye edilen 12-16 glikoz molekülünden oluşur. *P. aeruginosa* glukanları aminoglikozidlerle etkileşime girer, glukanlar bu antibiyotikleri periplazmada toplayarak ve dolayısıyla hücrel hedeflerinden uzaklaştırarak antibiyotiklere direnç kazandırır (Mah 2003; Sadovskaya et al. 2010).

1.6.2. *tccCI* geni

tssCI, tip VI salgılanmasında (T6S) yer alan bir gen, biyofilme özgü antibiyotik direnç genlerinin taranmasıyla tanımlanmıştır (Mah 2012). İlk tip VI salgılama (T6S) sistemi 2006 yılında *Vibrio cholera*'da karakterize edilmiştir. O zamandan beri, *Francisella tularensis*, *Burkholderia türleri*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* dahil olmak üzere birkaç ek patojenik organizmada T6S sistemleri tanımlanmıştır (Bingle et al. 2008; Pukatzki et al. 2009). T6S sistemleri biyofilm oluşumu, toksin iletimi, virülans ve kronik enfeksiyonda uygunluk gibi çeşitli farklı süreçlerde yer almıştır. *P. aeruginosa* genomu, HSI-I, HSI-II ve HSI-III olarak adlandırılan üç T6S lokusu içerir. Standart laboratuvar suşu PAO1'de HSI-I lokusu, PA0071 ila PA0091'i kapsar ve PA14_01020'nin ortologu olan PA0084'ü içerir. Bu gen, T6S gen kümeleri arasında yüksek oranda korunmuştur ve *tssCI* olarak adlandırılmıştır. HSI-I kümesindeki genler, birkaç kronik virülans faktörünün ifadesini de kontrol eden RetS tarafından negatif olarak düzenlenir (Zhang et al. 2011). Yapılan son çalışmalar HSI-I'nin bakterilere bir toksin salgılanmasında rol oynadığını göstermektedir (Hood et al. 2011). T6S sistemi, biyofilm büyümesi sırasında indüklenir. Bu salgılama sisteminin temel bir bileşeni olan *tssCI*'in biyofilmlerde antibiyotik direncini desteklediğini gösterilmiştir. Biyofilmlerdeki bakteriler yakın temas halinde olduklarından, biyofilmlerdeki bakteriler arasında bir efektör salgılanması antibiyotiğe dirençli duruma yol açabilmektedir (Zhang et al. 2012).

1.6.3. PA1875–1877

Bu üç genli operon, sırasıyla bir dış zar proteinini (OpmL), bir ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısını ve bir zar füzyon proteinini (HlyD homologu) kodlar (Zhang et al. 2018). Yapılan çalışmalarda, bu dışa salgı pompasını kodlayan genler silindiğinde, hücreler mutant biyofilme büyürken, tobramisin, gentamisin ve siprofloksasine karşı biyofilm duyarlılığında bir artış olmuştur. Dolayısıyla bu lokusun, klinikte görülen çoklu ilaç direncine katkıda bulunan RND taşıyıcılarına benzeyen çok bileşenli bir salgı kompleksi oluşturabildiği düşünülmektedir. Genler, biyofilm yapısındaki hücrelerde, planktonik hücrelere göre daha fazla ifade edilmiştir. Ayrıca planktonik hücrelerdeki ifadeleri, antibiyotiklere direnci artırmıştır (Mah 2012).

1.6.4. PA0756-0757, PA2070 ve PA5033

PA0756-0757, biyofilme özgü antibiyotik direnci için önemli olduğu bulunan ilk iki bileşenli düzenleyici sistemdir. PA2070 ve PA5033'ün, fonksiyonları bilinmeyen varsayımsal proteinleri kodladığı tahmin edilmektedir. PA0756-0757, PA2070 ve PA5033 operonları, biyofilme artan ekspresyon gösterir. Biyofilme özgü antibiyotik direncinde ve in vivo kalıcılıkta rolleri vardır. Bakterilerde, iki bileşenli düzenleyici sistemler, ortamdaki hücreye bilgi iletmek üzere hareket eder, dolayısıyla bu iki bileşenli düzenleyici sistemin, biyofilm hücrelerine yönelik potansiyel bir tehdidi gösteren sinyallere yanıt vermesi mümkündür.

PA2070'in transmembran taşıyıcı aktiviteye sahip varsayımsal bir proteini kodladığı tahmin edilmektedir. PA5033'ün, tahmin edilen tip 1 salgılama sinyali ile bilinmeyen fonksiyona sahip bir proteini kodlaması tahmin edilmektedir. PA2070/PA5033 genleri ile biyofilm ile ilişkili direnç arasında pozitif bir korelasyon vardır (Aghamali et al. 2018).

1.7. *P. aeruginosa* Enfeksiyonları

Gram-negatif patojen bir bakteri türü olan *P. aeruginosa* özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir enfeksiyon etkenidir. Kısıtlı şartlarda

1. GİRİŞ

çoğalması, virulans faktörlerinin çeşitli olmasının yanı sıra, direnç mekanizmaları sürekli geliştirebilmesi gibi özellikleri nedeniyle önemli enfeksiyonel ajandır (Heydarlou ve İbrahim 2020).

P. aeruginosa hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Toplum kaynaklı enfeksiyonlar arasında ülseratif keratit, otitis eksterna (tipik olarak diyabetes mellituslu olanlar gibi bağışıklığı baskılanmış konaklarda), cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır (Bonten et al. 1999; Pirnay et al. 2003). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlar; yanık yaralanmalarında pnömoniler, idrar yolu enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları ve cilt enfeksiyonları ve kistik fibrozlu (KF) hastalarda kronik sinopulmoner kolonizasyon ve *P. aeruginosa*'dan tekrarlayan enfeksiyonlardır (Driscoll 2007). Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *P. aeruginosa* sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonların %23'ünün nedeni olmaktadır (Magill et al. 2014).

P. aeruginosa, eş zamanlı olarak ifade edilebilen çeşitli direnç mekanizmalar yoluyla karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozitler gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirme kapasitesine sahiptir (O'Donnell 2020). *P. aeruginosa* suşları arasında çoklu ilaç direncinin olduğu bilinmektedir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi' nin (ECDC) verilerine göre, 2015 yılında *P. aeruginosa* izolatlarının %13,7'sinin en az üç antimikrobiyal gruba ve %5,5'inin en az beş antimikrobiyal gruba karşı dirençli olduğunu belirtmiştir (Anonymous 2015).

Son yıllarda, çoklu ilaca dirençli veya geniş ölçüde ilaca dirençli (MDR/XDR) *P. aeruginosa*'nın yüksek riskli klonlarının dünya çapında yayılması, bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir (Horcajada et al. 2019). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2019'de yayımlanan rapora göre yeni antibiyotiklere acil olarak ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir. Aynı raporda, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* yeni antibiyotiklerin acilen gerekli olduğu "kritik" grupta listelenmiştir (Anonymous 2019). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça zor ve karmaşıktır. Antibiyotiklere doğal direncinin yanısıra, tedavi sırasında da direnç kazanabilmektedirler (Corehtash et al. 2015). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotik grupları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- **β -laktam antibiyotikler:** Bakteri hücre duvarı sentezinde görev alan penisilin bağlayan proteinler (PBP)'in transpeptidaz aktivitesini bloke ederek hücre duvarının peptidoglikan tabakası sentezini bozarlar ve bu durumda mikroorganizma duvar sentezini tamalayamadığı için lizise olur (Poole 2014). β -laktamlar bakterisidal etki gösterirler. Bu grupta, uygulanan geniş spektrumlu antibiyotikler, sefolosporinlerden seftazidim, sefepim ile birlikte piperasilin/tazobaktam, karbapenemler sınıfında bulunan imipenem, meropenem antipseudomonal β -laktamların önemli bir grubudur. Meropenemin Gram-negatif, imipenemin ise Gram-pozitif etkinliği kısmen daha fazladır (Lambert 2002; Meletis et al. 2012; Morita et al. 2014).
- **Florokinolonlar (FQ):** *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotik sınıflarından biridir. Kinolonların hedef bölgesi DNA giraz ve topoizomerez IV enzimleridir. Bu enzimleri kodlayan bölgede meydana gelen mutasyonlar direncin oluşmasından sorumludur (Meletis et al. 2012). Büyük ölçekli sürveyans çalışmaları, *P. aeruginosa*'nın klinik izolatları arasında artan bir FQ direnci oranı bildirmiştir (Kriengkauykiat et al. 2005; Askoura et al. 2011).
- **Aminoglikozidler:** Bakterilerin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanır ve protein sentezini inhibe eden antibiyotik grubudur (Davis 1987). Gentamisin, kanamisin, amikasin, tobramisin, streptomisin, neomisin aminoglikozid grubu antibiyotiklerdir (Morita et al. 2014).
- **Polimiksinler:** Polimiksinler, *Bacillus polymyxa* tarafından ribozom dışı üretilen siklik yapıya katyonik polipeptit antibiyotiklerdir. Kimyasal olarak beş farklı bileşikten (polimiksin A-E) oluşur. Klinikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır (Vaara 2010). Katyonik bir polipeptit olan kolistin, Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan ve anyonik yapıda olan lipopolisakkaritlere bağlanır. Lipopolisakkarit moleküllerini bir arada ve stabil halde tutan divalent katyonların (Ca^{+2} , Mg^{+2}) yerini değiştirerek, dış membranda bozulma ve permeabilite artışı sonucu hücre içeriğinin boşalmasına ve bakterinin ölümüne neden olur (Yahav et al. 2012).

1.8. Tedavi Stratejileri

P. aeruginosa enfeksiyonları genellikle antibiyotiklerle tedavi edilir. Tedavide kullanılan antibiyotikler bakteriyel büyümeyi azaltır veya hücre ölümüne neden olarak bakteriyostatik ve bakteriyosidal etki gösterirler (Clatworthy et al. 2007). Antibiyotiklerin tedavide çeşitli etki mekanizmaları vardır. Bunlar; hücre duvarı sentezini inhibe etmek, protein sentezi ve nükleik asit sentezinin inhibisyonu ve ayrıca bakteriyel metabolizmayı etkileme veya hücre ile etkileşimi içeren beş ana etki mekanizması vardır (Finch et al. 2010). Bu mekanizmaların en az biriyle etki eden ve tedavide kullanılan antibiyotikler mevcuttur. Günümüzde özellikle aminoglikozidler, florokinolonlar, polimiksinler ve β -laktam grubu antibiyotikler sefalosporinler, karbapenemler, penisilinler, β -laktamaz inhibitörleri ve monobaktam, aztreonam olmak üzere *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Gaspar et al. 2013; Wagner et al. 2016). Tedavi için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi çok sınırlı ve zaman alıcıdır. Son 10 yıldır *P. aeruginosa* enfeksiyon tedavileri için yeni tedavi yaklaşımları gerekmektedir. Antibiyotiklerin tek ve kombinasyonel kullanımlarının yanında ek birkaç strateji önerilmektedir. Bunlar; QS inhibisyonu, lektin inhibisyonu, demir şelasyon, faj tedavisi, aşı stratejisi, nanopartiküller, antimikrobiyal peptitlerdir (Pang et al. 2019). Bu mekanizmalar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- **QS inhibisyonu:** Bu yaklaşım, biyofilm oluşumunu önleyebilir veya azaltabilir, bakteriyel virülansı azaltabilir ve antibiyotik direnci geliştirme riski düşüktür. Dar spektrumlu olması sebebiyle yararlı bakteriler üzerinde etki göstermez (Rasmussen and Givskov 2006; Reuter et al. 2016).
- **Lektin inhibisyonu:** *P. aeruginosa* yapışmasına, lektinler dahil olmak üzere birçok adezin içeren bir glikanik tanıma modeli aracılık eder. Galaktoz ve furukozu spesifik olarak bağlayan iki çözünür lektin, LecA (PA-IL) ve LecB (PA-IIL), *P. aeruginosa*'nın sitoplazmasında tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu lektinler bakterinin dış zarında büyük miktarda bulunur ve lektinler bakterinin yapışmasında rol alır. Ayrıca lektinler virülans faktörlerle de ilişkilidir (Chemani et al. 2009). Konakçı hücre yüzeylerine lektin bağlanması, lektin inhibitörleri tarafından bloke edilebilir. Glikol eterler, glikopolimerler ve glikodendrimerler

gibi inhibitörler, lektinler için yüksek bağlanma afinitesi gösterir ve işlevlerini engeller (Grishin et al. 2015).

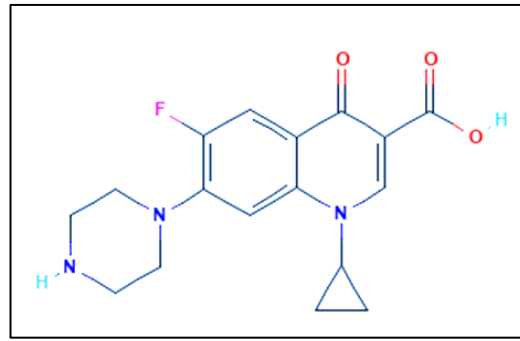
- **Demir şelasyonu:** Demir, bakteriyel büyüme için gerekli olup enerji üretimi, DNA replikasyonu ve elektron taşınması gibi çeşitli hücrel süreçlerde yer almaktadır. *P. aeruginosa* hücre dışı ortamdan demir elde etmek için pyoverdine ve pyochelin sideroforlarını kullanmaktadır ve hücre dışı demir konsantrasyonunu sınırlamak veya *P. aeruginosa* tarafından demir alımını bozmak, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı yeni bir tedavi stratejisi olmaktadır (Pang et al. 2019).
- **Faj tedavisi:** Bakteriyofajlar hücre lizisine neden olarak bakteriyi öldürmektedir (Clokie et al. 2011). Faj tedavisi enfeksiyon bölgesinde, kommensal florayı etkilemeden patojen bakterileri hedefler ve antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı bakterisidal etki sağlar (Ly-Chatain 2014). Fajlar ile tedavinin en büyük avantajlarından biri, fajların genetik olarak tasarlanarak, bakteriyeye antimikrobiyal ajan verilip tedavi etkinliğinin artırılmasıdır (Westwater et al. 2003).
- **Aşı Stratejisi:** Aşı stratejisi, enfeksiyonun yerleşmeden önce önlenmesini hedefler. Aşıların geliştirilmesi, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını önlemeyi ve azaltmayı amaçlar. Fakat bu patojene karşı henüz lisanslı bir aşı bulunmamaktadır (Prieb and Golberg 2014). Mevcut aşular, bu patojenin değişken çevresel koşullarda fenotipik değişikliklere uğrama yeteneğinden dolayı klinik deneylerde düşük verimlilik göstermektedir (Döring and Pier 2008).
- **Nanopartiküller (NP):** Nanomalzemeler, nanometre ölçeği (1-100 nm) aralığında olan malzemelerdir. Özellikle NP hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel özellikler göstermiştir. Nanoteknoloji, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde özellikle avantajlı olabilir. Antimikrobiyal aktiviteleri için kullanılan nanopartiküller, bakteri zarlarına yüksek penetrasyon kabiliyetine sahiptir, biyofilm oluşumunu bozabilir, çoklu antimikrobiyal mekanizmalara sahiptir ve iyi antibiyotik taşıyıcılarıdır (Wang et al. 2017).

- **Antimikrobiyal peptitler (AMP):** AMP'ler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, mantarlar ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteler gösterir. Birçok AMP MDR bakterilere karşı etkilidir (Seo et al. 2012). AMP'ler geniş antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteye sahiptir, immünomodülatör etkili ve geniş spektrumludur (Pang et al. 2014).

1.9. Antibiyotikler

1.9.1. Siprofloksasin

Siprofloksasin, 1987'den beri çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için başarıyla kullanılan florokinolon sınıfı antibiyotiklerin bir üyesidir ve WHO'nun temel ilaçlar listesine dahil edilmiştir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı en etkili florokinolon grubu antibiyotiktir ve tedavide kullanımı çok yaygındır. Bakteriyemi, osteokondrit kulak, göz enfeksiyonları ve habis eksterna otitis dahil olmak üzere çeşitli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmıştır ve ayrıca KF'li çocuklarda ve yetişkinlerde *P. aeruginosa* tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinikte kullanımıyla birlikte *P. aeruginosa* izolatları siprofloksasine dirençlilik kazanmaya başlamıştır (Şekil 1.5.) (Rehman et al. 2019).



Şekil 1.5. Siprofloksasinin kimyasal yapısı (Anonymous 2022)

Kinolon grubu antibiyotiklerin etki bölgesi DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleridir. Bu enzimleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar direnç gelişimine sebep olmaktadır. DNA giraz enziminin alt birimleri *gyrA* ve *gyrB*'dir ve bu enzim tetramerik yapıdadır. DNA giraz, *gyrA* alt birimi aracılığıyla DNA molekülünün fosfat grupları ile

1. GİRİŞ

kovalent bağ oluşturur. Topoizomeraz IV, kinolon grubu antibiyotiklere DNA giraz kadar duyarlı değildir. Bu nedenle de florokinolonların Gram-negatif bakterilerde ikincil hedef bölgesidir. *ParC* ve *ParE* iki alt biriminden meydana gelen topoizomeraz IV'de tetramerik bir enzimdir. Moksifloksasin ve trovafloksasin gibi yeni kuşak florokinolonlar hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV enzimini eş zamanlı olarak inhibe ederek etki gösterirler. Böylece florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün oluşturduğu kırılmaları durdurarak DNA'nın sentezlenmesini baskılar (Kato et al. 1992; Hooper 1999; Hopkins et al. 2005; Intorre et al. 2007).

P. aeruginosa'da *gyrA* ve *gyrB*, sırasıyla *ParC* ve *ParE* ile sırasıyla %33 ve %32 amino asit dizisi özdeşliğine sahiptir (Rehman et al. 2019). *P. aeruginosa*'da iyi çalışılmış iki temel siprofloksasin direnci mekanizması vardır. Bunlar; hedef bölge modifikasyonu ve akış pompalarının yukarı regülasyonudur. Bu *gyrA*, *gyrB* ve *parC*, *parE* genlerindeki hedef mutasyonları DNA giraz veya topoizomerazın siprofloksasine afinitesini azaltmaktadır. Akış pompalarının aşırı ekspresyonu ve düzenleyici genlerdeki mutasyonlar siprofloksasinin *P. aeruginosa* hücrelerinden atılmasını artırır (Breidenstein et al. 2008; Zhang et al. 2015).

1.9.2. Tobramisin

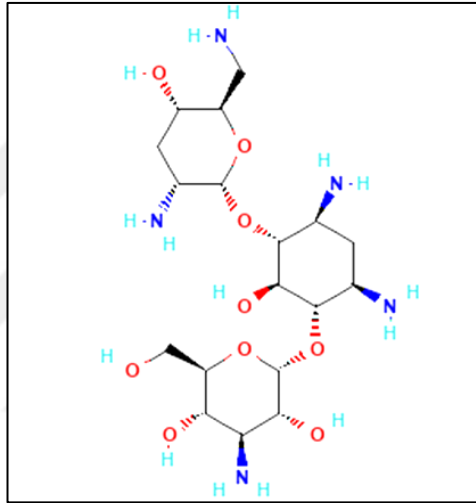
Tobramisin, aminoglikozitler olarak bilinen geniş spektrumlu antibiyotik sınıfına aittir. Streptomisin, 1944'te geliştirilen ilk aminoglikozit grubu antibiyotiktir (Mingeot Leclercq et al. 1999). Aminoglikozitler, çeşitli amino ve hidroksi işlevlerine sahip çok işlevli hidrofilik şekerlerdir (Şekil 1.6.). Polikasyonik olduklarından nükleik asitlere bağlanma afinitesi gösterirler. Tobramisin, bakteriyel 30s ribozomal biriminin 16s ribozomal RNA'sına bağlanır ve translasyonun başlangıç adımını engeller. (Kotra et al. 2000). Aminoglikozitler prokaryotik ribozomlara bağlanma yoluyla bakteriyel protein sentezini bozarak etki eder. Polar yapıdaki bu moleküllerin dış zardan geçişi, lipopolisakkarit molekülleri arasındaki Mg^{+2} moleküllerinin ilaca bağlı olarak bozulmasıyla gerçekleşir (Vaara 1992).

Tobramisin, Ribozomun A bölgesine bağlanarak yanlış çeviriye neden olur ve kodonun transfer RNA tarafından yanlış okunmasına neden olarak aminoaçil birimlerinin

1. GİRİŞ

yanlış verilmesine neden olur. Yanlış sentezlenmiş proteinler hücre içinde birikir, hücre zarını ve çeşitli hücresel süreçleri bozar ve tobramisin bakterisidal bir ajan olarak belirler (Davis et al. 1986; Davis 1987).

Ribozomal bağlanma bölgelerinin değiştirilmesi, sadece streptomisine karşı önemli bir direnç nedeni olmaktadır. Diğer direnç mekanizmaları ise; (i) ilacın bakterilerde alımının ve/veya birikiminin azalması ve (ii) antibiyotiği modifiye eden ve böylece onu inaktive eden enzimlerin bakteriyel ekspresyonudur (Mingeot-Leclercq et al. 1999).



Şekil 1.6. Tobramisin kimyasal yapısı (Anonymous 2022)

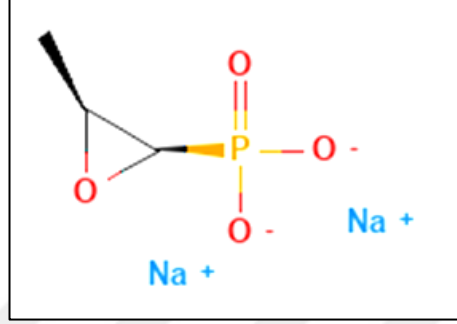
1.9.3. Fosfomisin

Fosfomisin, ilk olarak 1969'da İspanya'da tanımlanan doğal bir fosfonik antibiyotiktir. Günümüzde, sentetik olarak üretilmesine rağmen, çeşitli *Streptomyces* suşlarının fermentasyon sıvılarından izole edilmiştir (Raz 2012).

Peptidoglikan öncülü üridin difosfat N -asetilmuramik asidin (UDP-MurNAc) oluşumunu bozarak antimikrobiyal etki göstererek, peptidoglikan sentezinin azalması, büyümenin azalması ve nihayetinde hücre lizisine sebep olmaktadır. MDR suşları dahil birçok Gram-negatif ve pozitif bakteriye karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir. *P. aeruginosa* suşlarına karşı belirgin bir etkisi olmamakla birlikte, genellikle başka bir

1. GİRİŞ

antibiyotik grubuyla kombinasyon halinde kullanılır. Bilinen diğer antibiyotiklerle yapısal bir ilişkisi yoktur, kendi antibiyotik sınıfını temsil eder ve diğer antimikrobiyallerle çapraz direnç göstermez (Hendlin et al. 1969; Kahan et al. 1974). Fosfomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus sp.* ve vankomisine dirençli *Enterococcus sp.* gibi Gram-negatif ve Gram-pozitif organizmalar dahil olmak üzere çok çeşitli aerobik ve anaerobik bakterilere karşı aktiftir (Şekil 1.7.) (Raz 2012).



Şekil 1.7. Fosfomisinin kimyasal yapısı (Anonymous 2022)

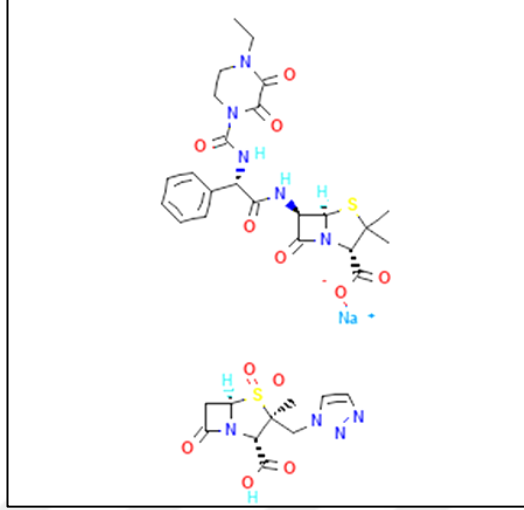
1.9.4. Piperasilin/Tazobaktam

Piperasilin/tazobaktam, birçok *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram-negatif bakterileri içeren geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir. Dirençli suşlar arasında *Enterobacter spp.* *P. aeruginosa* piperasilin/tazobaktama duyarlıdır. β -laktamaz inhibitörü olan tazobaktamın üreidopenisilin, piperasilin ile birleştirilmesi β -laktamaz üreten bakterilere karşı piperasilinin aktivite göstermesini sağlar. Piperasilin β -laktam grubu antibiyotiktir (Şekil 1.8.). β -laktam antibiyotikler, peptidoglikan oluşturmak üzere çapraz bağlanan peptidlerde yer alan transpeptidazı açılıyarak peptidoglikan sentezindeki son adımı engeller. β -laktam antibiyotiklerin hedefleri, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) olarak bilinir. Bu bağlanma, sırayla, terminal transpeptidasyon sürecini kesintiye uğratar ve ayrıca bakteri hücresi içindeki otolitik süreçler yoluyla canlılık kaybına ve hücre lizisine neden olur (Eckburg et al. 2019).

Tazobaktam, Richmond ve Sykes tip II, III, IV ve V β -laktamazlara, stafilokokal penisilinaz ve geniş spektrumlu β -laktamazlara karşı iyi bir inhibitör aktiviteye sahiptir. Tazobaktamın ana β -laktamaz yapısal sınıflarına karşı geri dönüşümsüz bağlanır. Piperasilin-tazobaktam, Gram-pozitif ve negatif aerobik ve anaerobik bakterileri içeren

1. GİRİŞ

geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip bir β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonudur (Gin et al. 2007). *P. aeruginosa* bu antibiyotiğe duyarlıdır (Bryson and Brogden 1994).



Şekil 1.8. Piperasilin/tazobaktamın kimyasal yapısı (Anonymous 2022)

1.10. Tez Çalışmasının Amacı

Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyon etkenlerinde giderek artan antibiyotik direnci günümüzde önemli bir sorun haline gelmiştir. WHO'nun 2019 yılı verilerine göre, antibiyotik direnci sebebiyle yılda yaklaşık 700.000 kişi ölmekte olup, önlem alınmadığı takdirde 2050 yılına kadar bu rakamın yaklaşık 10 milyon kişiyi bulacağı tahmin edilmektedir. Aynı zamanda biyofilmlerin, tıbbi cihazlara bağlı hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %60'ından sorumlu olduğu ve ayrıca enfeksiyonların ortalama %70'inin biyofilm kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Bu duruma çözüm olarak yeni antibiyotiklerin keşfi, varolan antibiyotiklerin modifiye edilmesi ve kombinasyonel antibiyotik uygulamaları önerilmektedir. Ayrıca, antibiyotiğe dirençlilik mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve bu doğrultuda yeni çözümler geliştirmek gerekmektedir. Biyofilm oluşumunun genetik ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, kronik enfeksiyonların kontrolü ve biyofilm oluşumu kaynaklı problemler için yeni stratejiler sağlayabilir.

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında, bazı antibiyotiklerin biyofilm dirençliliğine olan etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Ayrıca, *P. aeruginosa*'nın biyofilm dirençliliğinde rolü olduğu tespit edilmiş *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi ve planktonik hücreler ile biyofilm hücreleri arasındaki farklılıkları tespit edilmesi hedeflenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

David ve arkadaşları (2001) yapmış oldukları çalışmalarda, planktonik *P. aeruginosa* hücreleri ile biyofilmleri arasındaki farkları ve biyofilmlerin antibiyotiklere karşı direncinin altında yatan mekanizmaları araştırmak için mikrodizin analizleri gerçekleştirmişlerdir. Biyofilm hücrelerindeki gen ekspresyonunun serbest yaşayan hücrelerdekine benzer olduğunu, ancak az sayıda önemli farklılık olduğunu göstermişler. Ayrıca tanımlanan genlerin antibiyotiklere karşı spesifik dirençlilikte rol alabileceğini öngörmüşlerdir (David et al. 2001).

Fonseca ve arkadaşları (2004) yapmış olduğu çalışmalarda, alt-MİK konsantrasyonda piperasilin/tazobaktamın (P/T) yapışkanlık, hücre yüzeyi hidrofobisitesi, hareketlilik, biyofilm oluşumu ve oksidatif strese duyarlılık gibi bakteriyel virülans parametrelerine etkilerini incelemiş ve 0,5 MİK P/T'nin *P. aeruginosa*'nın bakteriyel virülans parametrelerinin ekspresyonunu, adezyonu, motiliteyi, biyofilm oluşumunu ve oksidatif strese duyarlılığını etkilediğini göstermişlerdir (Fonseca et al. 2004).

Hoffman ve arkadaşları (2005) yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* ve *Escherichia coli*' de aminoglikozit grubu antibiyotiklerin alt inhibitör konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Aminoglikozit tepkisinde görevli *arr* düzenleyici geninin bu indüksiyon için gerekli olduğunu ve biyofilme özgü aminoglikozit direncinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Hoffman et al. 2005).

Zhang ve arkadaşları (2008) *P. aeruginosa*'da bir antibiyotik alt grubuna biyofilm spesifik direnç için önemli olan yeni bir salgı sistemi olduğunu öngörerek, *P. aeruginosa* PA14 ve PA14 mutant suşları ile yaptıkları çalışmada yeni bir salgı sistemini kodladığını öngördükleri PA1874 ile PA1877 (PA1874-1877) genlerinin tamamen silinmesiyle biyofilm de büyüyen mutant suşun gentamisin, tobramisin ve siprofloksasin duyarlılığında bir artış olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu genlerin, biyofilm hücrelerinde planktonik hücrelere göre daha yüksek oranda ifade edildiğini, ancak antibiyotiklere karşı planktonik direnç olmadığını göstermişlerdir (Zhang and Mah 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Babić ve arkadaşları (2010) yılında, *P. aeruginosa* strain PUPa3 suşu ile tobramisin'in alt MİK konsantrasyonunun etkilerini incelemişlerdir. 0.05 µg/mL konsantrasyonunda tobramisin uygulamasında kaynaşma oluşumu gözlenmemiştir (Babić et al. 2010).

Zhang ve arkadaşları (2011) yapmış oldukları çalışmalarda, tip VI salgılamasında yer alan (T6S) *P. aeruginosa* *tssC1* geninin biyofilmlerin bir antibiyotik alt grubuna direnci için önemli olduğunu, biyofilmlerde *tssC1* ekspresyonunun indüklendiğini ve T6S için *tssC1*'in gerekli olduğunu göstermişlerdir (Zhang et al. 2011).

Beaudoin ve arkadaşları (2012) yapmış oldukları çalışmalarda, etanol oksidasyon genlerinin *ndvB*'ye bağlı ekspresyonunu doğrulamışlardır ve ayrıca bu genlerin biyofilmlerde planktonik kültürlerden daha yüksek oranda eksprese edildiğini ve *ndvB*'nin biyofilmlerdeki birçok genin ekspresyonunu etkilediğini ve etanol oksidasyon genlerinin biyofilme özgü antibiyotik direnci ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuşlardır (Beaudoin et al. 2012).

Zhang ve arkadaşları (2013) yapmış oldukları çalışmada, hipotetik iki bileşenli bir düzenleyici sistemi kodlayan *PA0756-0757*'nin ve fonksiyonu bilinmeyen hipotetik proteinleri kodlayan *PA2070* ve *PA5033*'ün biyofilm hücrelerinde artmış ekspresyon sergilediğini ve bu genlerin biyofilm-spesifik antibiyotik direncinde rol aldığını göstermişlerdir (Zhang et al. 2013).

Walsh ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları çalışmalarda, MDR ve MDR olmayan 64 *P. aeruginosa* klinik izolatında fosfomisin'in in vitro farmakodinamik özellikleri araştırılmış ve MİK konsantrasyonlarının 1 ile 512 mg/L arasında değişmekte olduğu ve izolatların %61'inin fosfomisine duyarlı olduğu sonucunu göstermişlerdir (Walsh et al. 2015).

W. Hall ve arkadaşları (2017) yapmış oldukları çalışmada, *ndvB* geninin ifade modelini gözlemek ve biyofilme özgü ifadesinin temelini araştırmışlardır. Her iki büyüme modunda da *ndvB*'nin transkripsiyonunun, durağan faz sigma faktörü *RpoS*'ye bağlı olduğu ve *ndvB* promotöründe varsayılan bir *RpoS* bağlanma bölgesinin

2. KAYNAK ÖZETLERİ

mutasyonunun, durağan faz hücrelerinde promotörün aktivitesini ortadan kaldırdığı göstermişlerdir. Çalışmalarına ek olarak *ndvB*'nin planktonik hücrelerde durağan faza girerken yukarı regüle edildiğini bulmuşlardır (Hall et al. 2018).

Marco ve arkadaşları (2017)'de propolis ve kavak reçinelerinin hareketlilik üzerine etkilerini incelemişlerdir. Propolis ve kavak reçinesi yüzme hareketliliğini azaltırken, kaynaşma ve seğirme üzerine pozitif yönde etki gösterdiğini bulmuşlardır (De Marco et al. 2017).

Aghamali ve arkadaşlarının (2018) yapmış oldukları çalışmada, *PA2070* ve *PA5033* genlerinin, *P. aeruginosa*'nın biyofilme özgü antibiyotik direnci üzerindeki rolünü araştırmış ve 100 klinik *P. aeruginosa* izolatında gen ekspresyon analizleri yaparak planktonik hücrelere kıyasla biyofilm yapısında ki hücrelerde *PA2070* ve *PA5033* genlerinin aşırı ekspresyonunu ortaya çıkarmışlardır (Aghamali et al. 2018).

Manohar ve arkadaşları (2018) yapmış oldukları çalışmalarda, 24 *P. aeruginosa* klinik izolatında 6 biyofilm üreten suşun siprofloksasin ve gentamisin'e dirençli, dokuz ve dördü sırasıyla meropenem ve kolistine dirençliyi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca biyofilm spesifik antibiyotik dirençlilik genlerinden *PA0756-0757*'ün 10 suшта, *PA5033*'ün 6 suшта ve *PA2070*'ün 9 suшта bulunduğunu ve bu genlerin önemini göstermişlerdir (Manohar et al. 2018).

Selvaraj ve arkadaları 2020'de bisiklik monoterpen olan myrtenol'ün *A. baumannii* üzerinde hem kaynaşmayı hem de seğirmeyi inhibe ettiğini göstermişlerdir (Selvaraj et al. 2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm cihazlar, Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (YUTAM) bünyesinde bulunan Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunmaktadır. Kullanılan tüm cihazların listesi, Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazlar

Cihazlar	Marka-Model
Buzdolabı +4 °C	Edesa, Turkey
Buzdolabı -20 °C	Tempow, Singapore
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2101C
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Faz-Kontrast Mikroskobu	Leica
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Homojenizatör	Qiagen TissuLyser LT
Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini	Esco Class II
Mikropipetler	Corning Costar, İsolab
Mini santrifüj	WiseSpin
Otoklav	JSR, JSAC-60
PCR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
qRT-PCR	Rotor Gene, Qiagen
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q3W

3.1.2. Bakteri suşları ve sarf malzemeler

Bu tez çalışmasında, biyofilm çalışmalarında model olarak *P. aeruginosa* PAO1 suşu kullanılmıştır. Tez hazırlama sürecinde kullanılan sarf malzemeler ise Çizelge 3.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Marka
Agaroz	Isolab
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems
Etidyum Bromür	Sigma
Fosfomisin Sodyum	Koçak Farma
İzopropanol	Isolab
Kongo Kırmızısı	Aromel
Luria-Broth	Conda- Pronadise
Mueller-Hinton-Agar	Oxoid- Cm0337
Piperasilin/Tazobaktam	Tüm Ekip İlaç A.Ş
Polikarbonat Filtre	Whatman
RT-PCR kiti	EvaGreen® qPCR Supermix
Siprofloksasin %98	Acros Organics
Sodyum Klorür	Honeywell
Tobramisin	Sigma
TRIZOL™ Reagent	Thermo Fisher Scientific
Tripton	Oxoid
Tripton-Soy-Broth	Lab-M

3.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA)

MHA besiyeri, antimikrobiyal testlerde kullanılan besiyeri türüdür. 36 g tartılarak, 1 L’de çözülmüştür. Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

3.1.4. Mueller-Hinton Broth (MHB)

MHA besiyerinin agar eklenmemiş halidir. Bu besiyeri Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesinde “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) tarafından önerilen besiyeridir. Ticari formülasyondan 26,5 g MHB tartılarak 1 L distile suda çözülmüş ve otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

3.1.5. Luria-Bertani (LB) Broth (%1 agar)

25 g LB broth besiyeri ve 10 gram agar 1 L distile suda eritilmiştir. 121 °C’da 15 dakika otoklav ile sterilize edilir. 50 °C’ye kadar soğumadan kullanılmıştır.

3.1.6. Triptik Soy Broth (TSB)

30 g TSB besiyeri tartılarak 1 L distile suda çözülmüş ve otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir.

3.1.7. Molten Agar

Çizelge 3.3’ de verildiği içerikte hazırlanmıştır. Otoklav ile 121 °C’de 15 dakika steril hale getirilmiştir. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, 90 mm petri kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Molten Agar Besiyeri

İçerik	Miktar
Tripton	%1
Sodyum Klorür	%0,5
Agar	%0,5

3.1.8. Antibiyotikler

Kullanılan antibiyotikler; ticari olarak satın alınan siprofloksasin, tobramisin, fosfomisin ve piperasilin / tazobaktam antibiyotikleridir. Konsantrasyonları, Siprofloksasin 10 µg, fosfomisin 50 µg, tobramisin 10 µg, ve piparezin/tazobaktam 110 µg, olacak şekilde disklere eklenmiştir. Yayma plak yöntemi ile hazırlanan petrilere antibiyotik eklenmiş diskler yerleştirilmiş bir gün boyunca 37 °C’de statik inkübasyon sonucunda zon çapları ölçülmüştür. Zonlar, “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.1.9. %0,1’lik Kristal viyole boyası

Kristal viole (CV) boyasından 0,05 g olarak tartılarak 35 ml %99’luk etil alkolde çözülmüştür. Üzerine 15 ml saf su eklenmiş ve 24 saat inkübe edilerek sonunda 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

3.1.10. %30’luk Asetik asit

35 ml saf suyun üzerine %99,9’luk asetik asitten yavaş yavaş 15 ml ilave edilmiştir.

3.1.11. Agaroz jel hazırlama

İzole edilen RNA ve DNA’ların görüntülenmesi için %1,5’luk agaroz jel hazırlanmıştır. 1,5 g agaroz tartılıp 100 ml TAE içerisinde çözülmüştür. İçerisine 2 µl etidyum bromür eklenmiştir.

3.1.12. Primerler

Primerler, Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. firmasında (Ankara/Türkiye) sentezlenmiştir. Bu diziler, Çizelge 3.4’de verilmiştir. Sentez skalası 50 nmol olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Primerler

Genler	Primerler	Referanslar
<i>ndvB</i>	F: ACAAGGGCTTCTTCCACATC R: TCTTCGGTGATGCACCATTC	Hall et al. (2018)
<i>PA2070</i>	F: CTCCGCGGTGGATCTCAACA R: GTCGAAGCGGCCTTCGTTCA	Zhang et al. (2013)
<i>tssC1</i>	F: CTCCAACGACGCGATCAAGT R: TCGGTGTTGTTGACCAGGT	Zhang et al. (2011)
<i>PA5033</i>	F: GCGTTCTGGTAGGAACCTG R: AGACCACGTTGCCGAAGCTG	Zhang et al. (2013)
<i>rhoD</i>	F: CATCCGCATGATCAACGACA R: GATCGATATAGCCGCTGAGG	Beaudoin et al. (2012)

3.2. Yöntem

Çalışma kapsamında PAO1 suşu ile klinikte kullanılan çeşitli antibiyotikler ile (Siprofloksasin, Tobramisin, Fosfomisin ve Piperasilin/Tazobaktam) disk difüzyon testi yapılmıştır. Antibiyotiklerin PAO1 suşuna karşı etkilerini analiz etmek için mikrodilüsyon testi, kristal viyole testi ve hareketlilik testleri yapılmıştır. Planktonik ve biyofilm hücre kültürleri ¼ MİK konsantrasyonda antibiyotiklere maruz bırakılarak, RNA'ları izole edilmiş ve cDNA oluşturulmuştur. Bu örneklerden, RT-PCR ile biyofilm spesifik antibiyotik dirençlilik genleri olan *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070*'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

3.2.1. Disk difüzyon testi

Disk difüzyon testi, klinikte kullanılan kontrol antibiyotik disk konsantrasyonlarında antibiyotik uygulaması ile yapılmıştır. Siprofloksasin 10 µg, tobramisin 10 µg, fosfomisin 50 µg ve piperasilin/tazobaktam 110 µg, konsantrasyonlarda disklerle eklenmiştir. Yayma plak yöntemi ile hazırlanan petrilere diskler yerleştirilerek, 24 saat 37 °C'de statik inkübasyon sonunda zon çapı ölçümü yapılmıştır. Zonlar, "European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) verileri ile karşılaştırılmıştır (Balouiri et al. 2016).

3.2.2. Mikrodilüsyon testi

MİK belirlenmesinde, EUCAST protokolleri uygulanmıştır. 96 kuyulu plaklara 0,5 McFarland konsantrasyonunda bakteri hücrelerinden 100 µl, antibiyotiklerden ise (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 µg/µl) artan konsantrasyonlarda ekleme yapılarak toplam hacim 200 µl'ye ayarlanmıştır. Pozitif kontrol antibiyotik eklenmemiş grup, negatif kontrol olarak hücre eklenmemiş bir gruplar kullanılmıştır. 37 °C'de, 24 saatlik inkübasyonun ardından, gelişmenin olmadığı konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenmiştir (Balouiri et al. 2016).

3.2.3. Kristal viyole testi

Kısaca, 96 kuyulu plaklara, 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmış bakterilerden 100 µl ve 100 µl steril MHB besiyeri içerisinde (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 µg/µl) konsantrasyonlarda ayarlanmış antibiyotikler eklenmiş ve 37°C'de 48 saat statik inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda besiyeri içeriği atılarak, 3 kez PBS ile kuyular yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücreler %0,1'lik CV ile 20 dakika boyama yapılmıştır. Süre sonunda boyanın fazlası musluk suyu ile temizlenip, %30 asetik asit ile fikse edilerek ve OD₅₉₀ nm'de ölçüm alınmıştır. Biyofilmin oluşmadığı konsantrasyon değeri, MBİK (Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak kaydedilmiştir (Schillaci et al. 2014).

3.2.4. Planktonik *P. aeruginosa* kültürleri ve büyüme eğrisinin çıkarılması

P. aeruginosa PAO1 hücreleri, MHB besiyerinde 24 saat süresince 37°C'de ve 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Testlerin yapılacağı TSB besiyerlerine ¼ MİK konsantrasyonunda antibiyotik uygulaması yapılarak deney gerçekleştirilmiştir. Planktonik hücrelere, ¼ MİK konsantrasyonlarında antibiyotik eklenmesinin ardından, 0,2,4,6,8,12,16 ve 24. saatlerde gelişimleri OD₆₀₀'de ölçülerek, büyüme grafiği oluşturulmuştur (Datta et al. 2016).

3.2.5. Hareketlilik testleri

Kaynaşma hareketliliğinin incelenmesi için *P. aeruginosa* PAO1 hücreleri MHB sıvı kültürde 24 saat geliştirilmiştir. MA besiyerine ¼ MİK konsantrasyonunda fosfomisin, siprofloksasin, tobramisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotikleri eklenmiştir. Antibiyotikli besiyeri içeren petrilere sıvı kültürden 5 µl damlatılıp 24 ve 48 saatlik statik inkübasyona bırakılmıştır. Hareketlilik incelenip sonuçlar kaydedilmiştir.

Seğirme hareketliliği; *P. aeruginosa* PAO1 hücreleri, MHA katı kültürde 24 saat geliştirilmiştir. Slayt üzerine siprofloksasin, fosfomisin, tobramisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerini içeren LB agar besiyeri damlatılmış ve yayılmıştır. Üzerine tek bir noktaya gelecek şekilde gelişen bakteri kolonisi eklenmiş ve diğer slayt ile kapatılmıştır. 3 saat 37 °C’de inkübe edilmiş ve faz-kontrast mikroskobu ile görüntüsü alınmıştır (Kumar et al. 2013).

3.2.6. Koloni biyofilm testi

P. aeruginosa hücreleri 5 mL kültürde 24 saat inkübe edilmiş ve sonunda bakteri kültürü OD₆₀₀’de 0,08-0,1 olarak ayarlanmıştır. 0,22 µm gözenek boyutuna sahip 25 mm polikarbonat membran 10 dakika UV’ de steril edilmiştir. Ardından filtreler besiyerlerine yerleştirilerek tekrar sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. 0,5 McFarland konsantrasyonuna ayarlanmış bakterilerden, 5 µl membran üzerine bırakılmıştır. Petriler 24 saat boyunca 37 °C’de statik olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda membran kaldırılıp, yeni agar petriye yerleştirilmiştir. 48 saat sonunda membran, 1 ml PBS içeren tüplere aktarılarak vorteks yapıp hücreler memrandan alınmış ve moleküler analizler için kullanılmıştır (Merritt et al. 2011).

3.2.7. RNA izolasyonu

RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde Trizol® yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, 48 saatlik antibiyotik uygulaması yapılmış ve yapılmamış olan biyofilm ve planktonik hücreleri santrifüj ile çöktürülerek 1 ml trizol ile muamele edilip, 10 dk maksimum hızda homojenizatörde parçalama işlemi yapılmıştır. Örnekler, 4 °C’ 12.000

rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ve üst sıvı steril tüpe alınmıştır. Eşit hacimde fenol: kloroform (125:24) eklenerek, tüp 20.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip ve üst sıvı yeni tüpe alınmıştır. Bu tüpe 500µl izopropanol eklenerek, 10 dakika 4 °C'de inkübe edilip, 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, RNA'ların çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra üst sıvı atılıp RNA pelletlerinin %75'lik soğuk etanol ile yıkaması gerçekleştirilmiştir. Santrifüjle etanol uzaklaştırmasının ardından pellet havada kurutularak -80°C'de saklanmıştır.

3.2.8. cDNA sentezi

İzole edilen mRNA örneklerinin konsantrasyonları ölçülmüş ve 1 µg mRNA örnekleri, ticari olarak satılan cDNA sentez kiti yardımıyla, cDNA'ya çevrilmiştir. Kısaca, Çizelge 3.5'te belirtilen karışım hazırlanıp üzerine konsantrasyon eşitlemesi yapılan RNA örneklerinden 10 µl ekleyip reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları ise, 25°C 10 dk, 37°C 120 dk ve 85°C 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar kullanılabildiği kadar -20'de saklanmıştır.

Çizelge 3.5. cDNA 2X RT-Master Mix

İçerik	Miktar (µl)
10X-RT Buffer	2
25X DNTP Mix (100m M)	0,8
10X-RT Random Primer	2
Revers transkriptaz	1
RNase İnhibitör	1
TOTAL	10

3.2.9. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR)

4 µl RT-PCR master mix, 0,5 µl primerler, 2 µl cDNA ve 3 µl dH₂O ile hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, 95°C, 2 dk; 60°C, 1 dk; 72°C, 30 sn ve 40 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR esnasında oluşan ct değerleri, housekeeping gen (*rhoD*) ile normalize edilerek hedef genlerin mRNA düzeylerindeki değişiklikleri belirlenmiştir. Sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ yöntemine göre hesaplanmıştır.

3.2.10. İstatistiksel analizler

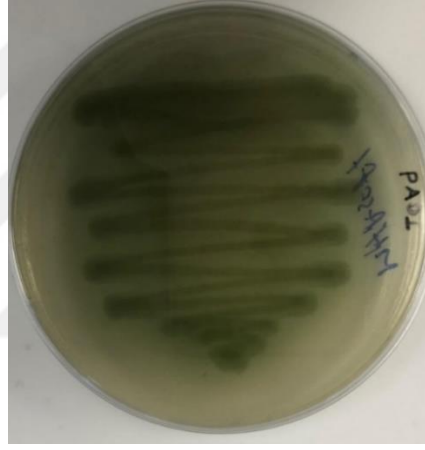
Deneyler, 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. qRT-PCR deneyleri ise 4 tekrarlı olarak yapılmıştır. qRT-PCR analizleri ve MBİK değerleri, one way ANOVA metodu ile incelenerek, $p < 0,0001$ (p değeri) anlamlı olarak değerlendirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bakteri Suşunun izgi Ekimi

P. aeruginosa PAO1 referans suşunun, steril koőullar altında MHA besiyerine çizgi ekimi yapılmıştır. Hücre ekili olan petri 37°C de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. MHA besiyeri, yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde, klinik olarak önemli patojenler ve antibiyotiğe karşı duyarlılığı belirlemek için kullanılan katı besiyeridir. PAO1 suşu inkübasyon sonucunda mavi-yeşil pigment üreterek geliŐmiŐtir. *P. aeruginosa* petri görüntüsü Şekil 4.1.' de verilmiştir.



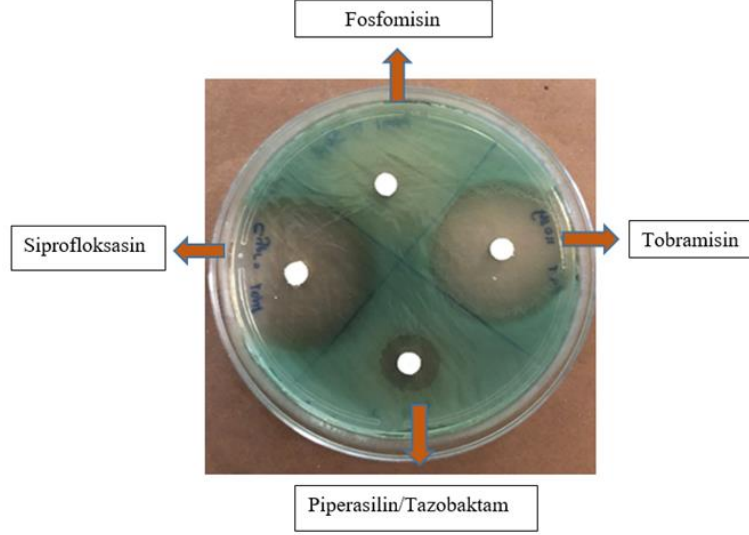
Şekil 4.1. *P. aeruginosa* PAO1 referans suşunun Petri görüntüsü

4.2. Disk Difüzyon Testi

Yayma plak yöntemi kullanılarak hazırlanan MHA besiyerine diskler yerleştirilerek etkinliğini araŐtırdıĐımız antibiyotikler EUCAST kriterlerinin belirlediği konsantrasyonlara göre; siprofloksasin 10 g, tobramisın 10 g, fosfomisin 50 g ve piperasilin/tazobaktam 110 g, olacak Şekilde disklere emdirilmiŐtir. Aynı zamanda, ampisilin, imipenem, cefepime ve tetrasiklin antibiyotiklerinin diskleride kontrol amacıyla yayma plak yöntemiyle hazırlanan MHA besiyerlerine yerleştirilerek petriler 37°C de 24 saat statik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda, antibiyotiklerin zon çapları ölçülüp, değerler EUCAST'ın yayınlamıŐ olduğu sınır değer tablosu ile

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

karşılaştırılmıştır (EUCAST 2021). Disk difüzyon testi görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. PAO1 suşuna karşı yapılan disk difüzyon testi görüntüsü

PAO1 suşuna karşı, siprofloksasin için inhibisyon zon çapı 38 mm olarak ölçülmüştür ve sonuç duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Fosfomisin için inhibisyon zon çapı 0 mm olarak ölçülmüştür, herhangi bir zon oluşumu gözlenmediği için PAO1 suşunun, fosfomisin antibiyotigine karşı dirençli olduğu değerlendirilmiştir. Piperasilin/tazobaktam için inhibisyon zon çapı 15 mm olarak ölçülmüş ve bu antibiyotiğe dirençli olarak değerlendirilmiştir. Tobramisin için inhibisyon zon çapı 30 mm ölçülmüş ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Disk difüzyon zon değer tablosu Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Disk difüzyon zon değer tablosu

Antibiyotikler	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Zon Çapı (mm)
Siprofloksasin	10	38
Tobramisin	10	30
Piperasilin /Tazobaktam	110	15
Fosfomisin	50	0
Cefepime	30	0
İmipenem	10	25
Ampisilin	10	0
Tetrasiklin	30	0

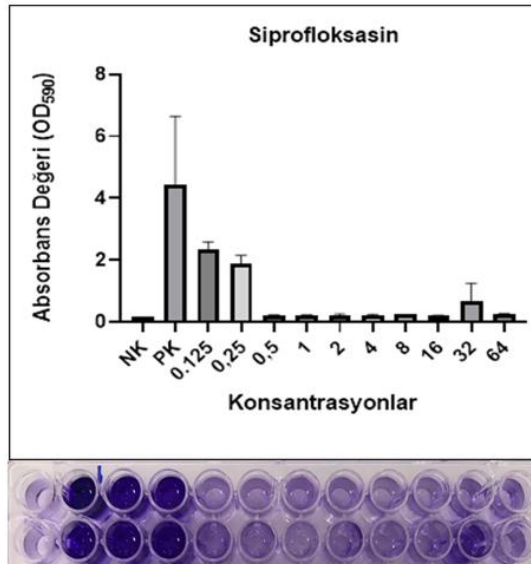
4.3. Mikrodilüsyon Testi Bulguları

Mikrodilüsyon testi EUCAST kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir. PAO1 suşuna karşı test ettiğimiz antibiyotiklerin MİK değerleri literatürde bulunan sonuçlarla uyumaktadır (Lomholt et al. 2003; Hardy et al. 2010). Sonuçlarımızdaki MİK değerleri, siprofloksasin 0,5 µg/mL, tobramisın 4 µg/mL ve fosfomisin >64 µg/mL ve piperasilin/tazobaktam 32 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.4. Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonunun (MBİK) Belirlenmesi

MBİK belirlenmesinde 48 saat statik inkübasyonun ardından kristal viyole boyaması yapıp absorbans değeri (OD₅₉₀) alınıp analizi yapılmıştır.

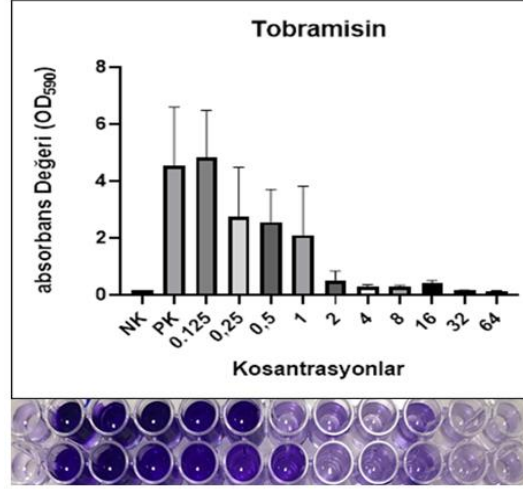
Sonuçlarımız, pozitif kontrolle karşılaştırılıp, biyofilmin oluşmadığı konsantrasyon değeri 2µg/mL olarak belirlenmiştir. MBİK belirlenirken sonuçlarımız negatif kontrolün OD değerinden çıkartılıp hesaplanmıştır. Siprofloksasin artan konsantrasyonlarda antibiyofilm aktivitesi gösterilmiş olup MBİK değerinin MİK değerine göre 4 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Siprofloksasin antibiyotığının antibiyofilm aktivitesi

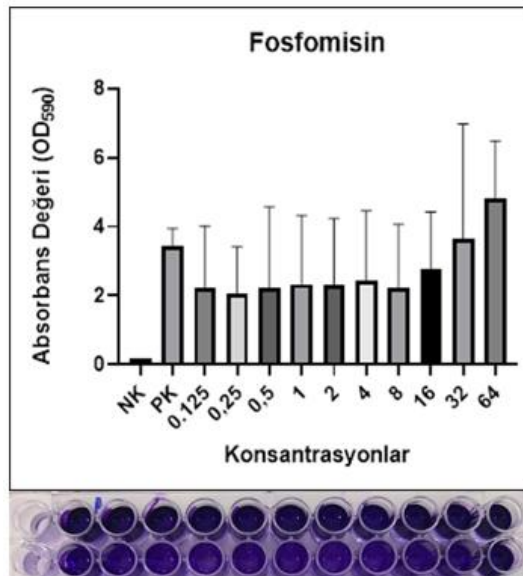
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tobramisin için, sonuçlarımız pozitif kontrol ile karşılaştırılıp, biyofilmin oluşmadığı konsantrasyon değeri 32µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu şekilde, MBİK değerinin, MİK değerine göre 8 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Tobramisin antibiyotığının antibiyofilm aktivitesi

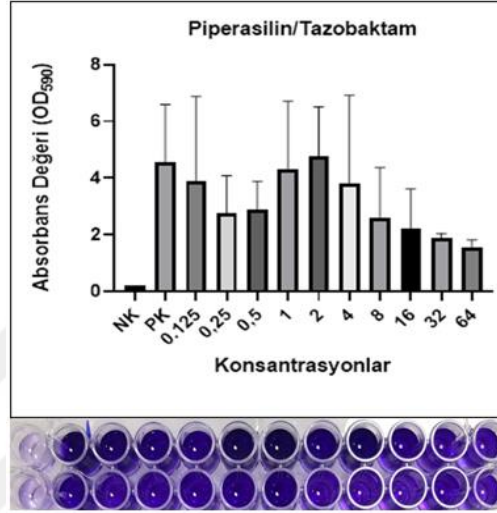
Sonuçlarımıza göre, pozitif kontrol ile karşılaştırılıp, fosfomisin biyofilm oluşumunu engellediği konsantrasyon değeri tespit edilememiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonlarda (32-64µg/mL) biyofilm oluşumu pozitif kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu durum, fosfomisin *P. aeruginosa* biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda etkili olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Fosfomisin antibiyotığının antibiyofilm aktivitesi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Piperasilin/Tazobaktam uygulamasında, biyofilmin oluşmadığı konsantrasyon değeri $>64\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunun engellenmesinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. MİK değeri ile karşılaştırdığımızda piperasilin/tazobaktam kombinasyonunun biyofilmi inhibe etme özelliğinin iyi olmadığı görülmektedir. MİK ve MBİK değerleri, Çizelge 4.2’de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.6. Piperasilin/Tazobaktam antibiyotikinin antibiyofilm aktivitesi

Çizelge 4.2. MİK ve MBİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)

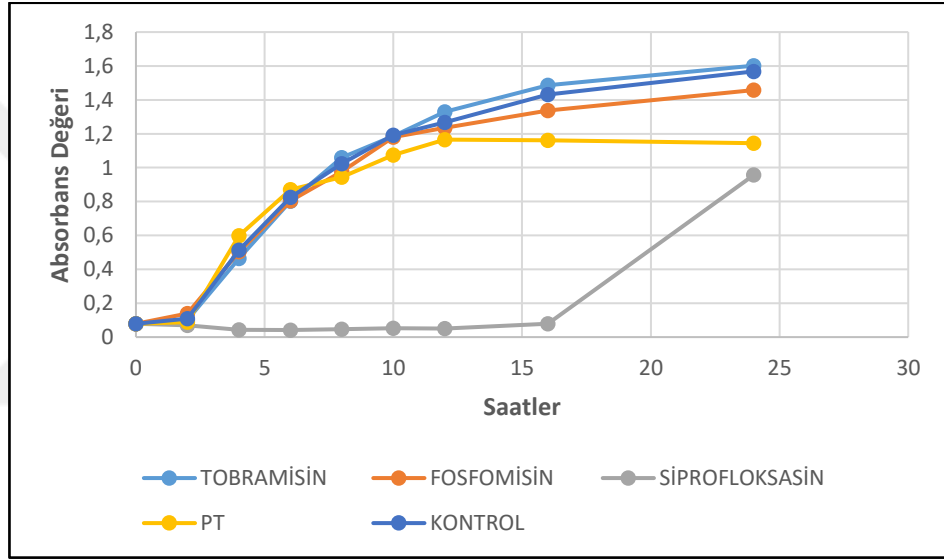
	Tobramisin	Fosfomisin	Siprofloksasin	Piperasilin/Tazobaktam
MİK	4	>64	0,5	32
MBİK	32	>64	2	>64

Sonuç olarak, yapılan analizlerde, PAO1 suşuna karşı, tobramisin antibiyotikinin MİK değeri $4\mu\text{g/mL}$ ve MBİK değeri $32\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. MİK değerinin MBİK değerinden 8 kat düşük olduğu belirlenmiştir. Fosfomisin antibiyotikinin MİK değeri $>64\mu\text{g/mL}$ ve MBİK değeri ise $>64\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, siprofloksasin antibiyotikinin MİK değeri $0,5\mu\text{g/mL}$, MBİK değeri ise $2\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. MİK değerinin MBİK değerinden 4 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. Son olarak, piperasilin/tazobaktam antibiyotikinin MİK değeri $32\mu\text{g/mL}$ ve MBİK değeri $>64\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. MİK değerinin MBİK değerinden düşük

olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak tobramisin, siprofloksasin, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerinin antibiyofilm aktivitelerinin planktonik hücreleri öldürme özelliklerine göre daha düşük olduğu gösterilmiştir.

4.5. Planktonik *P. aeruginosa* Kültürleri ve Büyüme Eğrisi Grafiği

Antibiyotiklerin MİK değerinin belirlenmesinin ardından, $\frac{1}{4}$ MİK konsantrasyonlarında antibiyotik uygulamasında gözlenen büyüme eğrileri belirlenmiştir. Şekil 4.7’de büyüme eğrisi gösterilmektedir.



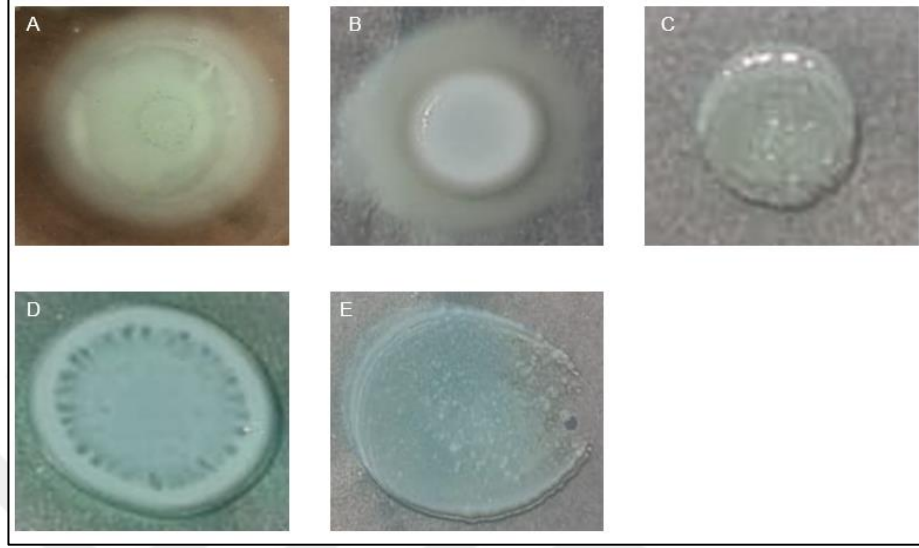
Şekil 4.7. Büyüme Eğrisi (Growth Curve). Antibiyotiklerin $\frac{1}{4}$ MİK konsantrasyonunda uygulaması ile OD₆₀₀'de alınan absorbans değerleri (PT: Piperasilin/tazobaktam).

Kontrolle kıyaslandığında fosfomisin, tobramisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerinin $\frac{1}{4}$ MİK konsantrasyonlarında hücre büyümesi üzerine önemli bir etkisi görülmemektedir. Siprofloksasin antibiyotik uygulamasında ise ilk 16 saatte hücre büyümesinin baskılandığı fakat 16. saatten itibaren artış gösterdiği anlaşılmaktadır.

4.6. Hareketlilik Testleri sonuçları

P. aeruginosa tek polar flagellumu sayesinde, sıvı ortamda yüzme ve katı ortamda küme hareketi göstermektedir. *P. aeruginosa* biyofilm oluşturmak için hücre

hareketliliğine ihtiyaç duyar. Bu hareketlilik, biyofilm yapısında en aza inmektedir (Conrad et al. 2011). Şekil 4.8'de *P. aeruginosa*'nın ¼ MİK konsantrasyonlarda MA besiyerindeki kaynaşma hareketi gösterilmiştir.

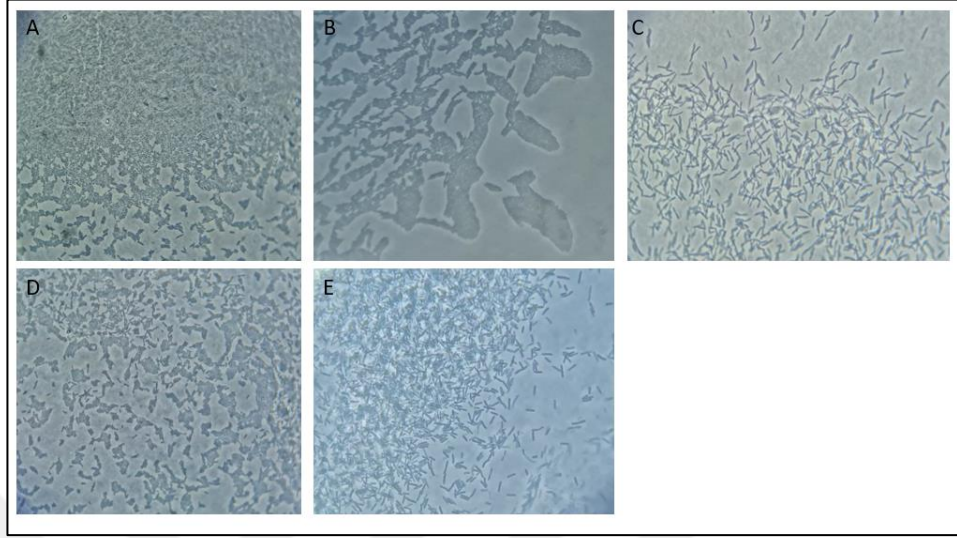


Şekil 4.8. MA besiyerindeki kaynaşma hareketliliği. A. Kontrol B. Tobramisin C. Siprofloksasin D. Fosfomisin E. Piperasilin/Tazobaktam.

Kaynaşma hareketliliği incelemesinde, zon çapı değerleri, kontrol 25 mm, tobramisin 8 mm, siprofloksasin 6 mm, fosfomisin 8 mm ve piperasilin/tazobaktam 20 mm olarak ölçülmüştür. Kontrole kıyasla, antibiyotik uygulaması yapılan grupların zon çaplarının ve hareketliliklerinin azaldığı görülmektedir. Biyofilm oluşumunda *P. aeruginosa* birçok fenotipik ve fizyolojik değişikliğe uğramaktadır. *P. aeruginosa* flagellumlarının, kaynaşma ve seğirme hareketliliği, biyofilmin başlatılması ve ilk tutunma aşamasında oldukça önemlidir. *P. aeruginosa* flagellumu, kaynaşma ve seğirme hareketliliği sergileme kabiliyeti nedeniyle biyofilm oluşumunun başlatılması için kritik öneme sahiptir (O'Toole and Kolter 1998). Bununla birlikte, yüzey yapışmasından sonra, *P. aeruginosa* kamçı ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı regüle eder ve ayrıca genetik mutasyonlar nedeniyle kamçıyı kalıcı olarak kaybedebilir. Bu durum, konakçı bağışıklık tepkisinin aktivasyonunu azaltarak *P. aeruginosa*'nın bağışıklık tepkisi ve fagositozdan kaçmasına izin verebilir (Wolfgang et al. 2004).

Biyofilm oluşumunun başlangıç aşamasında, en önemli etkenlerden biri bakterilerin hareketli olmasıdır. PAO1 suşunda seğirme hareketliliği (twitching motility) testi uygulanmıştır. Bu testte, biyofilm oluşumunda ve epitel hücrelere bağlanmada

önemli rolü olan tip IV pili'lerin antibiyotik varlığında fonksiyon gösterip göstermediği incelenmiştir. Faz kontrast mikroskobu görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

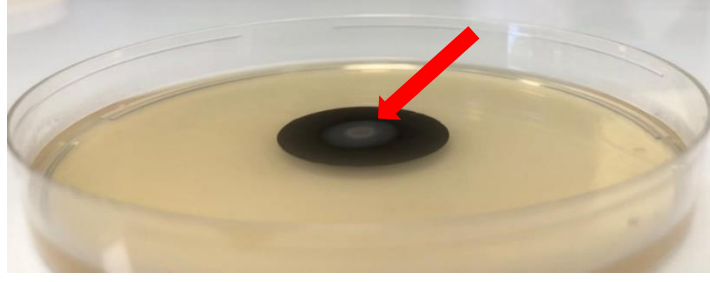


Şekil 4.9. Seğirme hareketliliği faz-kontrast mikroskobu görüntüleri, **A.** Kontrol **B.** Tobramisin **C.** Siprofloksasin **D.** Fosfomisin **E.** Piperasilin/Tazobaktam.

Kontrole göre kıyaslandığında, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam uygulamalarında benzer seğirme hareketliliği gözlenmiştir. Tobramisin uygulamasında bakteriler tek katman küme şeklinde, siprofloksasin uygulanmasında ise dağınık hareketlilik gözlenmiştir.

4.7. Koloni Biyofilm Gelişimi Sonuçları

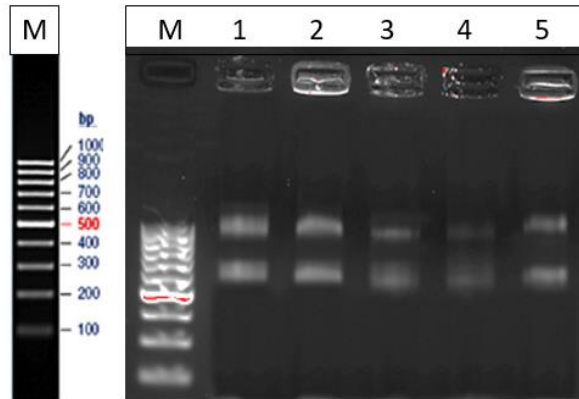
Antibiyotiklerin etkinliklerini ve dirençlilik mekanizmalarını incelemek için kullanılan yöntemlerden biri koloni biyofilm testidir (Merritt et al. 2011). Siprofloksasin, tobramisin, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerinin $\frac{1}{4}$ MİK konsantrasyonlarda uygulanan besiyerlerinde koloni biyofilmler geliştirilmiştir. Şekil 4.10.'de koloni biyofilm uygulamasına ait görüntü verilmiştir.



Şekil 4.10. Koloni Biyofilm Testi Petri Görüntüsü. Antibiyotik uygulaması yapılmamış petride filtre üzerinde gelişen PAO1 suşunun biyofilm oluşumu gösterilmektedir.

4.8. RNA izolasyonu

Koloni biyofilm örneklerinden ve planktonik hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyofilm örnekleri için RNA konsantrasyonları, kontrol 430 ng/µl, tobramisin 533 ng/µl, siprofloksasin 299 ng/µl, fosfomisin 261 ng/µl ve piperasilin/tazobaktam 430 ng/µl şeklinde ölçülmüştür. Planktonik örnekler için RNA konsantrasyonları, kontrol 432 ng/µl, tobramisin 668 ng/µl, siprofloksasin 1094 ng/µl, fosfomisin 835 ng/µl ve piperasilin/tazobaktam 119 ng/µl şeklinde ölçülmüştür. Ardından RNA örneklerinden 1 µg alınarak cDNA sentezi için kullanılmıştır. Oluşturulan cDNA örnekleri %1,5'lük agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmiştir. Elektroforez sonuçları Şekil 4.11.'de verilmiştir.

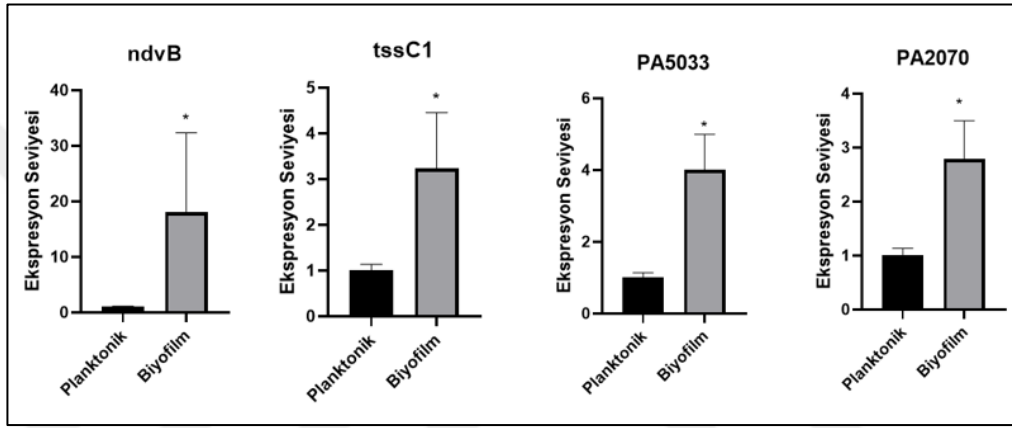


Şekil 4.11. RNA örneklerinin jel görüntüsü M: Markır; 1: Kontrol, 2: Tobramisin uygulaması, 3: Siprofloksasin uygulaması 4: Fosfomisin Uygulaması 5: Piperasilin/Tazobaktam uygulaması.

4.9. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları

4.9.1. Planktonik ve Biyofilm örneklerinde genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması

Planktonik ve biyofilm örneklerinde, antibiyotik uygulanmamış gruplar arasında biyofilm-spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.12’de ekspresyon seviyeleri farkı grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.12. Antibiyotik uygulanmamış planktonik ve biyofilm örneklerinin *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması. PAO1 planktonik ve biyofilm yapısından alınan örneklerdeki ekspresyon seviyelerinin farkı (* $p < 0,0001$), Sonuçlar, bir housekeeping geni olan *rhoD* genine göre normalize edilmiştir.

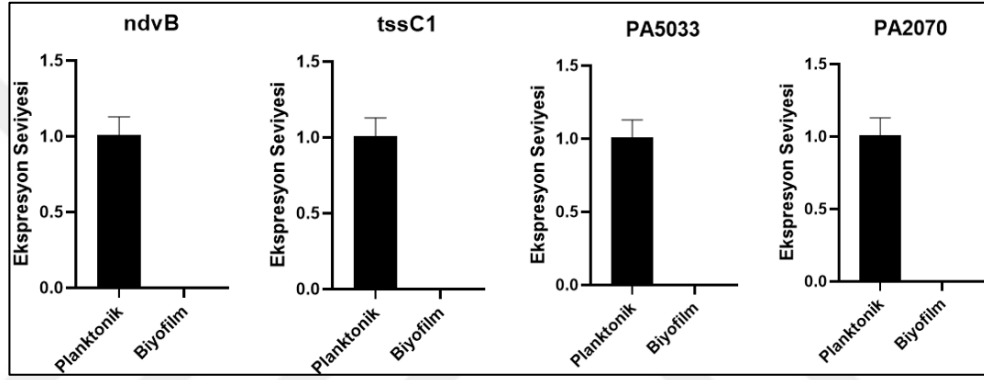
ndvB, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyelerinin planktonik gelişime göre biyofilm yapısında yüksek olması, bu genlerin biyofilm dirençliliğinde rol oynadığına işaret eder. Nitekim, Zhang ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin biyofilm yapısında planktoniklere göre daha fazla ekspresyon edildiğini göstermişlerdir (Zhang et al. 2013). Bu durum çalışmamızı desteklemektedir. Zhang ve arkadaşları aynı çalışmada, dirençlilikte rol oynayan *PA0756* geninin de biyofilmlerde daha fazla ekspresyon edildiğini bildirmişlerdir.

Aghamali ve arkadaşları 2018 yılında, 100 tane klinik *P. aeruginosa* izolatu ile yaptıkları çalışmada, biyofilm oluşturan izolatları tespit edip, bu izolatlarda *PA2070* ve *PA5033* genlerinin ekspresyon seviyelerini kantitatif RT-PCR yöntemi ile incelemişlerdir.

İzolatlarının %70'ini biyofilm üreticisi olarak belirlemişlerdir. *PA2070* geninin planktonik kültürüne göre ortalama 4,330 kat eksprese edildiğini; *PA5033* geninin ise 4,733 kat fazla eksprese edildiğini göstermişlerdir (Aghamali et al. 2018).

4.9.2. Siprofloksasin

Siprofloksasin uygulanmış olan biyofilm ve planktonik hücreler arasında biyofilm-spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.13'de ekspresyon seviyeleri farkı verilmiştir.



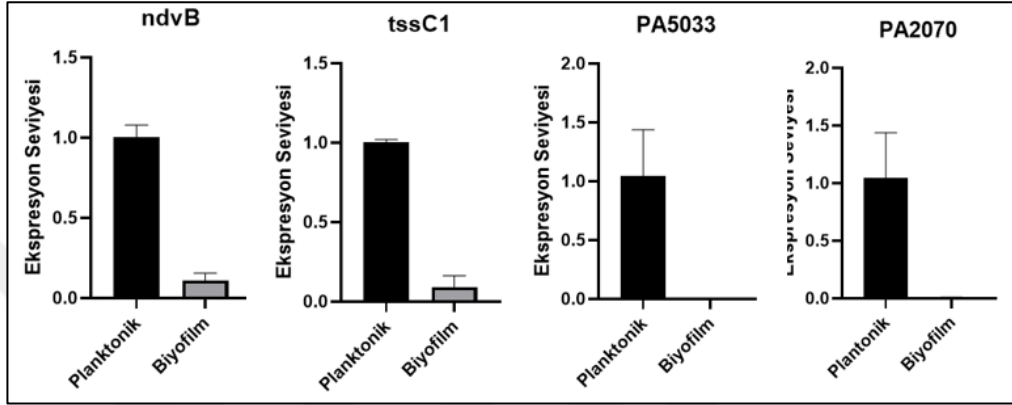
Şekil 4.13. Planktonik ve biyofilm örneklerine siprofloksasin uygulamasında *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyeleri.

Sonuçlarımıza göre, alt-MİK konsantrasyonunda siprofloksasin uygulamasında, planktonik gelişime göre, biyofilmlerde *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyonları aşağı regüle olmuştur.

Yapılan bir çalışmada, $\Delta PA5033$ ve $\Delta PA2070$ suşlarının biyofilm yapısında tobramisin ve gentamisine dirençlilikte düşüş meydana geldiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ilginç bir şekilde siprofloksasin uygulamasında biyofilm yapısında herhangi bir dirençlilik değişikliği gözlenmemiştir (Zhang et al. 2013). Bu durum, biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda, siprofloksasin uygulamasının biyofilm dirençliliğinde düşüşe neden olabileceği ve farklı direnç mekanizmaları ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır.

4.9.3. Tobramisin

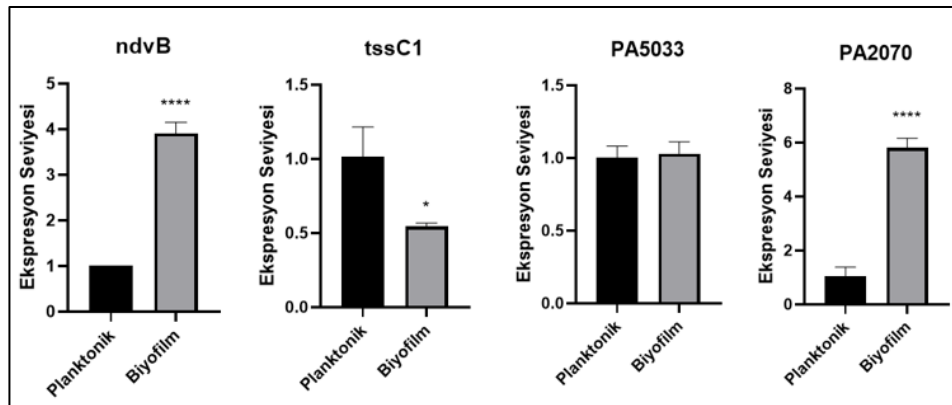
Tobramisin uygulanmış olan biyofilm ve planktonik hücreler arasında biyofilm-spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.14’de ekspresyon seviyeleri farkı grafikleri verilmiştir. Sonuçlara göre, tüm genlerin ekspresyon seviyeleri aşağı regüle olmuştur.



Şekil 4.14. Tobramisin uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyeleri.

4.9.4. Fosfomisin

Fosfomisin uygulanmış olan biyofilm ve planktonik hücreler arasında biyofilm-spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımız Şekil 4.15’de verilmiştir.

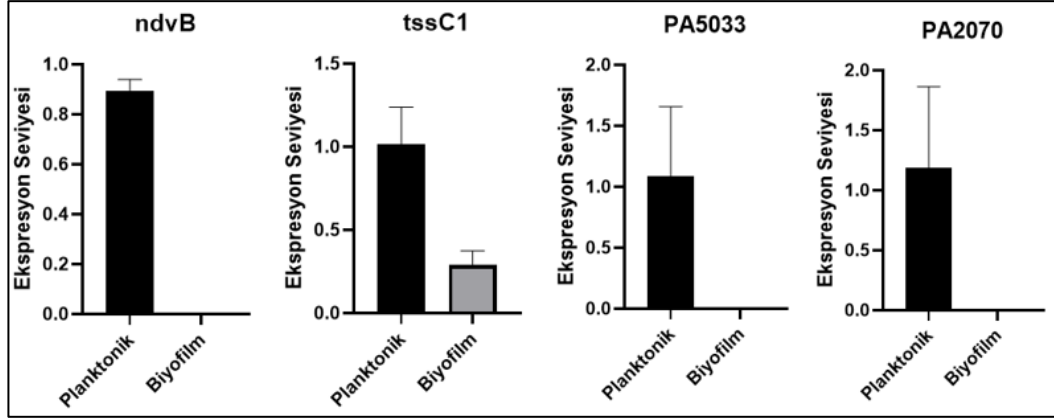


Şekil 4.15. Fosfomisin uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyeleri.

Tez çalışmasında, fosfomisin antibiyotiğinin *P. aeruginosa* biyofilmi üzerinde etkili olmadığı kristal viole testi ile belirlenmiştir. Bununla birlikte, RT-PCR sonuçlarımızda, fosfomisin *ndvB* ve *PA2070* gen ekspresyonunu arttırdığı, *PA5033* genin önemli bir değişiklik yapmadığı, *tssC1* genini ise aşağı regüle ettiği bulunmuştur.

4.9.5. Piperasilin/ Tazobaktam

Piperasilin/Tazobaktam uygulanmış olan biyofilm ve planktonik hücreler arasında biyofilm-spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.16 de ekspresyon seviyeleri farkı grafikleri verilmiştir. Sonuçlara göre, tüm genlerin ekspresyon seviyeleri aşağı regüle olmuştur.

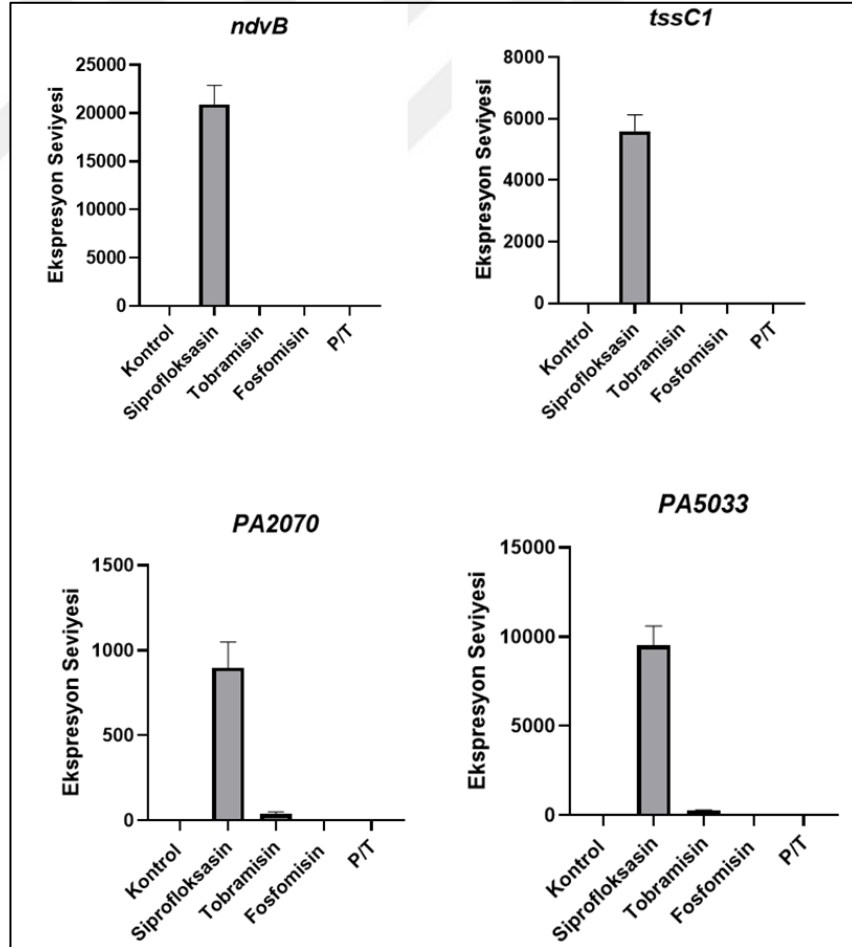


Şekil 4.16. Piperasilin/tazobaktam uygulamasında planktonik ve biyofilm örneklerinde *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyeleri.

Sonuç olarak, siprofloksasin, tobramisin ve piperasilin/tazobaktam uygulamalarında, *ndvB*, *tssC1*, *PA5033* ve *PA2070* genlerinin ekspresyon seviyeleri aşağı regüle olurken, fosfomisin uygulamasında *tssC1* geni dışında diğer genlerin ekspresyon seviyeleri yukarı regüle olmuştur. Bu durum, CV sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, fosfomisin biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda etkili olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

4.9.6. Gen ekspresyonları değişiminde antibiyotiklerin karşılaştırılması

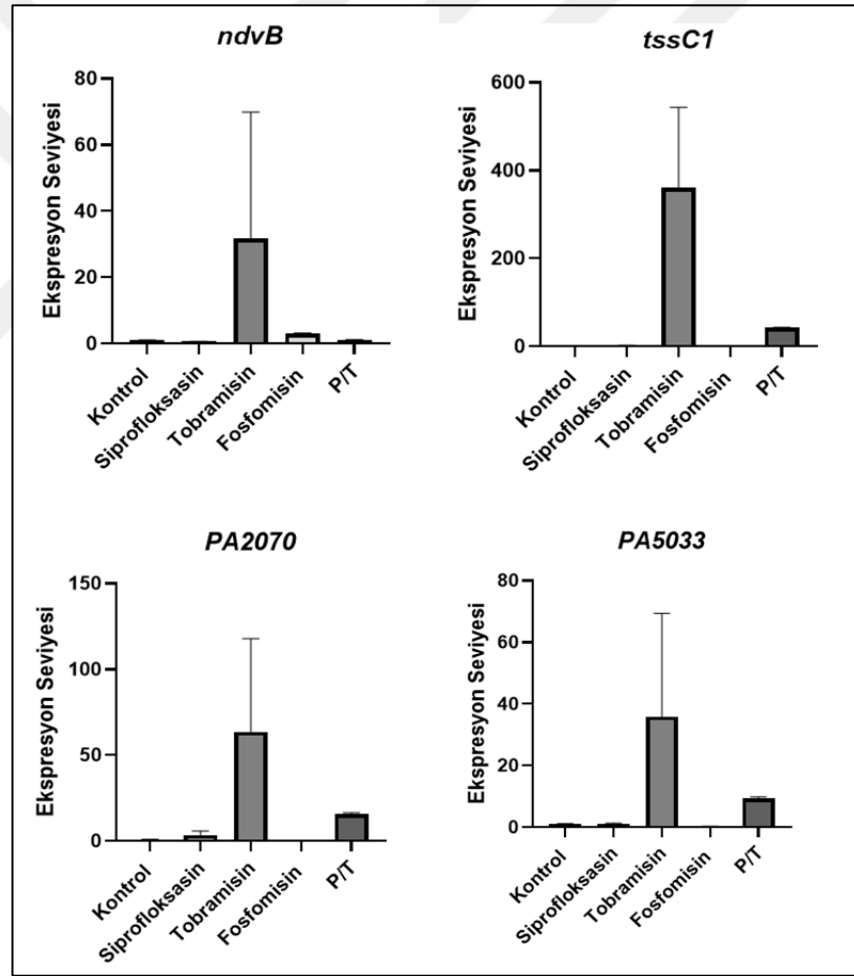
Siprofloksasin, tobramisin, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam antibiyotiklerinin planktonik hücrelerdeki gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, siprofloksasin uygulamasının *ndvB* geninin ekspresyonunu ortalama 20000 kat, *tssC1* geninin ekspresyonunu 6000 kat, *PA2070* geninin ekspresyonunu 1000 kat ve *PA5033* geninin ekspresyonunu 10000 kat arttırdığı görülmüştür. Tobramisin uygulamasının *ndvB* geninin ekspresyonunu ortalama 30 kat, *tssC1* geninin ekspresyonunu 24 kat, *PA2070* geninin ekspresyonunu 35 kat ve *PA5033* geninin ekspresyonunu 260 kat arttırdığı bulunmuştur. Fosfomisin ve piperasilin/tazobaktam uygulamalarında bütün genlerin ekspresyonları aşağı regüle olmuştur. Planktonik hücrelerdeki gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Planktonik gelişimde, antibiyotiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Biyofilm gelişiminde, antibiyotiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında ise, siprofloksasin uygulamasında *ndvB* geni aşağı regüle olurken, *tssC1* geninin ekspresyonunda 2 kat artış, *PA2070* geninin ekspresyonunda 3 kat artış görülmüştür. *PA5033* geninin ekspresyonunda ise değişiklik olmamıştır. Tobramisin uygulamasında, tüm genlerin ekspresyon seviyeleri yukarı regüle olmuştur. Fosfomisin uygulamasında *ndvB* ve *tssC1* genlerinin ekspresyonunda 3 kat artış olmuştur. Diğer genler ise aşağı regüle olmuştur. Piperasilin/Tazobaktam uygulamasında, *ndvB* geninin ekspresyon seviyesi değişmezken, *tssC1* geninde 40 kat, *PA2070*'de 16 kat, *PA5033* geninde 8 kat artış tespit edilmiştir. Biyofilm gelişimindeki gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Biyofilm gelişimde, antibiyotiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi

Zhang ve arkadaşları (2021)'de yapmış oldukları bir çalışmada, siprofloksasinin alt-MIC konsantrasyonlarda uygulanmasıyla 289 genin yukarı regüle olduğu, 206 genin ise aşağı regüle olduğu tespit edilmiştir. QS ilişkili genlerden olan *rhlI*, *rhlR*, *lasB*'nin aşağı regüle olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kontrole kıyaslandığında siprofloksasin uygulanması ile antibiyotik dirençlilik genlerinden *mexA*, *mexB*, *oprM*, *pslJ* ve *pslK*'nin ekspresyon seviyesi artış gostermiŐtir (Zhang et al. 2021).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, tobramisin antibiyotiğinin alt-MİK konsantrasyonlarda uygulanmasının diğer antibiyotiklere kıyasla biyofilm yapısında dirençliliği arttırdığı gorulmektedir. Diėer antibiyotiklerin biyofilm dirençlilik genlerine farklı Őekillerde etki etmesi, biyofilm dirençliliğinde farklı mekanizmaların gorem aldığını dűŐundurmektedir.

Gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, planktonik ve biyofilm halindeki hucrelere antibiyotiklerin farklı Şekilde etki ettiği gorulmektedir. Bu durum, biyofilm oluŐturmuş *P. aeruginosa* bakterisinin farklı antibiyotiklerle tedavi edilmesini gerekli kılmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yeni antimikrobiyal tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin bir yolu, mikroorganizmaların hastalığa yol açma mekanizmalarını aydınlatmaktadır. Günümüzün küresel problemlerinden biri olan antibiyotik dirençliliğinin yakın gelecekte büyük bir tehdit olacağı öngörülmektedir. Antibiyotik dirençliliği bakteri hücrelerinin biyofilm yapısında, planktonik hale göre 10-1000 kat fazla olabilmektedir. Bu tez çalışmasında, dört farklı antibiyotik (tobramisin, siprofloksasin, fosfomisin ve piperasilin/tazobaktom) seçilmiş, etkinlikleri *P. aeruginosa* PAO1 suşuna karşı disk difüzyon, mikrodilüsyon ve kristal viole testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, bu antibiyotiklerin varlığında seğirme ve kaynaşma hareketliliği incelenmiştir. Son olarak, antibiyotiklerin varlığında, biyofilm spesifik dirençlilik genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiş, biyofilm ve planktonik gruplar ile karşılaştırması yapılmıştır.

Siprofloksasin, tobramisin ve piperasilin/tazobaktam uygulamalarında, planktonik gruba göre biyofilm yapısında *ndvB*, *tssC1*, *PA2070* ve *PA5033* genlerinin ekspresyon seviyeleri aşağı regüle olmuştur. Fosfomisin uygulamasında ise *ndvB* ve *PA2070* genleri yukarı regüle olmuştur. Bu durum, fosfomisin uygulanmasının *P. aeruginosa*'da biyofilm dirençliliğini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Antibiyotiklerin kıyaslandığı durumda ise, planktonik hücrelere siprofloksasin uygulamasının çalışılan tüm genlerin ekspresyon seviyesini yukarı regüle ettiği görülmüştür. Biyofilm yapısında ise siprofloksasin uygulanmasında *ndvB* geni aşağı regüle olmuştur. Diğer antibiyotik uygulamalarında ise, genlerin ekspresyon seviyeleri yukarı regüle olmuştur. Bu sonuçlar, alt-MİK antibiyotik uygulanmalarının biyofilm dirençliliğine neden olacağı şeklinde yorumlanmıştır.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, ileriki çalışmalarda farklı antibiyotiklerin biyofilm dirençlilik genleri üzerine etkilerinin incelenmesini önermekteyiz.

Antibiyotiklerin biyofilmler ve biyofilm dirençliliği üzerine etkilerinin incelenmesi için aşağıda maddeler halinde verilen çalışmalar önerilmektedir:

- Klinik izolatlarda biyofilm direnç genlerinin varlığı tespit edilmelidir.
- Biyofilm dirençlilik genlerinin varlığı ile biyofilm oluşturma yeteneklerinin karşılaştırılması yapılmalıdır.
- Klinik izolatlar üzerine antibiyotik uygulanması ile biyofilm direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmelidir.
- Antibiyotik uygulamalarının Tip IV pili oluşumu ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri değerlendirilmelidir.
- Antibiyotik uygulamalarının in vivo model organizmalarla yapılan enfeksiyon modellemesinde dirençlilik genleri üzerindeki etkileri incelenmelidir.



KAYNAKLAR

- A.E.W. 1964. Antibiotic and Chemotherapy. Sexually Transmitted Infections, 40(1), 62–72.
- Aghamali, M., Ahangarzadeh Rezaee, M., Taghizadeh, S., Aghazadeh, M., Hasani, A., Rahbar, M. and Kafil, H. S. 2018. Evaluation of two novel biofilm-specific antibiotic resistance genes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Gene Reports, 13(9), 99–103.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S. and Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Molecular Microbiology, 59(4), 1114–1128.
- Anderl, J. N., Franklin, M. J. and Stewart, P. S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(7), 1818–1824.
- Anonymous. 2015 Web Sitesi: <https://www.ecdc.europa.eu/en>, Erişim Tarihi: 30.30.2021.
- Anonymous, 2022 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Erişim Tarihi: 06.01.2022.
- Anonymous. 2019 <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> Erişim Tarihi: 20.01.2022.
- Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T. and Taher, I. 2011. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. Libyan Journal of Medicine, 6(1), 1–8.
- Aspe, M., Jensen, L., Melegrito, J. and Sun, M. 2012. The Role of Alginate and Extracellular DNA in Biofilm-Meditated *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance. Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI), 16(4), 42–48.
- Babić, F., Venturi, V. and Maravić-Vlahoviček, G. 2010. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhlI/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. BMC Infectious Diseases, 10(1), 148-160.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(32), 71-72.
- Beaudoin, T., Zhang, L., Hinz, A. J., Parr, C. J. and Mah, T. F. 2012. The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Journal of Bacteriology, 194(12), 3128–3136.

- Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R. and Ribbeck, K. 2013. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003526.
- Bingle, L. E., Bailey, C. M. and Pallen, M. J. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 3–8.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M. and Høiby, N. 2013. The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*, 21(9), 466–474.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. J. V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.
- Bonten, M. J. M., Bergmans, D. C. J. J., Speijer, H. and Stobberingh, E. E. 1999. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units: Implications for infection control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(4), 1212–1219.
- Bradbury, R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* in Tasmania. Doktora Tezi, Tazmanya Üniversitesi, Menzies Araştırma Enstitüsü, Mikrobiyoloji Bölümü, 310, Hobart.
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C. and Hancock, R. E. W. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426.
- Breidenstein, E. B. M., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage, J. and Hancock, R. E. W. 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4486–4491.
- Brown, M. R. W., Allison, D. G. and Gilbert, P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(6), 777–780.
- Bryson, H. M. and Brogden, R. N. 1994. Piperacillin/Tazobactam: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential. *Drugs*, 47(3), 506–535.
- Causapé, C. L. 2018. Clonal epidemiology and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections: interpatient transmission and resistome evolution of an international cystic fibrosis clone. Doktora Tezi, Son Espases Üniversitesi, Balear Adaları Sağlık Araştırma Enstitüsü, Mikrobiyoloji Araştırma Birimi, 320, Palma de Mallorca.
- Chemani, C., Imberty, A., De Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B. P. and Faure, K. 2009. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-

induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infection and Immunity*, 77(5), 2065–2075.

- Chiang, W. C., Nilsson, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2352–2361.
- Ciofu, O. and Tolker-Nielsen, T. 2019. Tolerance and resistance of *pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10(5), 913.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H. and Høiby, N. 2015. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 85, 7–23.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. and Hung, D. T. 2007. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548.
- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V. and Heaphy, S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45.
- Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C. and Parsek, M. R. 2011. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Wiley Online Library*, 14(8), 1913–1928.
- Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A. and Wong, G. C. 2011. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100(7), 1608-1616.
- Corehtash, Z. G., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H. and Aznavah, A. M. 2015. Biofilm formation and virulence factors among *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(10).
- Costerton, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 137–140.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95.
- Datta, S., Jana, D., Maity, T. R., Samanta, A. and Banerjee, R. 2016. Piper betle leaf extract affects the quorum sensing and hence virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *3 Biotech*, 6(1), 1–6.
- Davis, B. D. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, 51(3), 341–350.
- Davis, B. D., Chen, L. and Tai, P. C. 1986. Misread protein creates membrane channels: An essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 83(16), 6164–6168.
- Dawid, I., Hammerschmidt, M., Klein, P., Ku, M., Moon, R., Rupp, R. and Mu, U. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(10), 860–864.
- De Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2), 151–158.
- De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. and Hancock, R. E. W. 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–589.
- De Marco, S., Piccioni, M., Pagiotti, R. and Pietrella, D. 2017. Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–11.
- Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392.
- Döring, G. and Pier, G. B. 2008. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 26(8):1011–1024.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L. and Kollef, M. H. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351–368.
- Eckburg, P. B., Lister, T., Walpole, S., Keutzer, T., Utley, L. and Farinola, N. 2019. Multiple ascending doses and when combined with β -Lactam antibiotics in Healthy Subjects, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63(9), 1–12.
- Ertesvåg, H. 2015. Alginate-modifying enzymes: Biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*, 6(5).
- Flemming, H. C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Hoiby, N. and Molin, S. 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: An evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 841–851.
- Fonseca, A. P., Extremina, C., Fonseca, A. F. and Sousa, J. C. 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), 903–910.
- Friedman, L. and Kolter, R. 2004a. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4457–4465.

- Friedman, L. and Kolter, R. 2004b. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(3), 675–690.
- Fuqua, C., Parsek, M. R. and Greenberg, E. P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(5), 439-468.
- Fuxman Bass, J. I., Russo, D. M., Gabelloni, M. L., Geffner, J. R., Giordano, M., Catalano, M. and Trevani, A. S. 2010. Extracellular DNA: A Major Proinflammatory Component of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6386–6395.
- Gaspar, M. C., Couet, W., Olivier, J. C., Pais, A. A. C. C. and Sousa, J. J. S. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: A review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(10), 1231–1252.
- Ghafoor, A., Hay, I. D. and Rehm, B. H. A. 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5238–5246.
- Gin, A., Dilay, L., Karlowsky, J. A., Walkty, A., Rubinstein, E. and Zhanel, G. G. 2007. Piperacillin–tazobactam: a β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(3), 365–383.
- Grishin, A. V., Krivozubov, M. S., Karyagina, A. S. and Gintsburg, A. L. 2015. *Pseudomonas Aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta Naturae*, 7(2), 29–41.
- Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B. P., Zhang, L., Nadeau, J.-P., Copeland, S. and Mah, T.-F. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance Gene *ndvB* Expression Requires the RpoS Stationary-Phase Sigma Factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02762-17.
- Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B. P., Zhang, L., Nadeau, J.-P., Copeland, S. and Mah, T.-F. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance Gene *ndvB* Expression Requires the RpoS Stationary-Phase Sigma Factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02762.
- Hall, Clayton W. and Mah, T. F. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301.
- Hay, I. D., Rehman, Z. U., Ghafoor, A. and Rehm, B. H. A. 2010. Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(6), 752–759.
- Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J. and Mochales, S. 1969. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science*, 166(3901), 122–123.

- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A. and Plésiat, P. 2003. MexXy-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1371–1375.
- Hoffman, L. R., D’Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. and Miller, S. I. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175.
- Høiby, N., Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*, 5(11), 1663–1674.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. S. and Mougous, J. D. 2011. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Toxin to Bacteria. Cell*, 7(1), 25–37.
- Hooper, D. C. 1999. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, 58(2), 6–10.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H. and Threlfall, E. J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 358–373.
- Horcajada, J., Milagro Montero, Oliver, A., Sorlí, L., Sònia Luque, Gómez-Zorrilla, S. and Grau, S. 2019. Epidemiology and treatment of multidrug-Resistant and extensively drug-resistant. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 1–52.
- Intorre, L., Vanni, M., Di Bello, D., Pretti, C., Meucci, V., Tognetti, R. and Jousson, O. 2007. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(5), 464–469.
- Irie, Y., Borlee, B. R., O’Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J. and Parsek, M. R. 2012. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20632–20636.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A. and Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I. and Parsek, M. R. 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11353–11358.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. and Kropp, H. 1974. the Mechanism of Action of Fosfomycin (Phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235(1), 364–386.

- Kato, J. I., Suzuki, H. and Ikeda, H. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 25676–25684.
- Kotra, L. P., Haddad, J. and Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides : Perspectives on Mechanisms of Ac. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249–3256.
- Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O. and Wong-Beringer, A. 2005. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 565–570.
- Kumar, L., Chhibber, S. and Harjai, K. 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*, 90(5), 73–78.
- Lambert, P. A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, Supplement, 95(41), 22–26.
- Lebeaux, D. and Ghigo, J.-M. 2012. Infections associées aux biofilms. *Médecine/Sciences*, 28(8–9), 727–739.
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. and Beloin, C. 2014. Biofilm-Related Infections: bridging the gap between Clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510–543.
- Lewis, K. 2010. Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64(3), 357–372.,
- Li, X. Z., Plésiat, P. and Nikaido, H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.
- Lin, J., Cheng, J. 2019. Quorum sensing in *pseudomonas aeruginosa* and its relationship to biofilm development. In: *Introduction to Biofilm Engineering*. Rathinam, N. K. and Sani, R. K. (1. eds) American Chemical Society, 1-16, New York.
- Livermore, D. M. 1995. B-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584.
- Lomholt, J. A. and Kilian, M. 2003. Ciprofloxacin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from keratitis. *British journal of Ophthalmology*, 87(10), 1238-1240.
- Ly-Chatain, M. H. 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5(2), 1–7.

- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 194–222.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K. and Wozniak, D. J. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3), 235-246.
- Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R. and Wozniak, D. J. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8213–8221.
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A. and Fridkin, S. K. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections, *New England Journal of Medicine* 370(13), 1198–1208.
- Mah, T. 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–1072.
- Mah, T. F. C. and O’Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39.
- Manohar, P., Shanthini, T., Philip, R. A., Ramkumar, S., Kale, M. and Ramesh, N. 2018. Role of biofilm-specific antibiotic resistance genes PA0756-0757, PA5033 and PA2070 in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv*.
- Masuda N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S. and Nishino, T. 1999. Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 400–402.
- Matsukawa, M. and Greenberg, E. P. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4449–4456.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. and Pesci, E. C. 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2702–2708.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D. and Diza, E. 2012. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303–307.
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E. and O’Toole, G. A. 2011. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1), 1B-1.
- Meskini Heydarlou, M. 2020. Dirençli pseudomonas aeruginosa suşlarının direnç mekanizmaları ve tedavi seçenekleri. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural and Medical Sciences*, 7(11), 1–2.

- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M. 1999. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 727–737.
- Mishra, M., Byrd, M. S., Sergeant, S., Azad, A. K., Parsek, M. R., McPhail, L. and Wozniak, D. J. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular Microbiology*, 14(1), 95–106.
- Moradali, M. F. and Rehm, B. H. A. 2020. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, 18(4), 195–210.
- Moradali, M. F., Ghods, S. and Rehm, B. H. A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(2), 345-356.
- Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. 2013. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4(4), 1-8.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000213.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M. and Lewis, K. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1–12.
- Munita, J. M. and Arias, C. A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 23(5), 464–472.
- Nealson, K. H. and Hastings, J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43(4), 496–518.
- O'Donnell, J. N., Bidell, M. R. and Lodise, T. P. 2020. Approach to the treatment of patients with serious multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Pharmacotherapy*, 40(9), 952–969.
- Olsen, I. 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5), 877–886.
- Ouellette, M., Bissonnette, L. and Roy, P. H. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7378–7382.
- Pamp, S. J. and Tolker-Nielsen, T. 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2531–2539.
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K. and Tolker-Nielsen, T. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to

- metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Molecular Microbiology*, 68(1), 223–240.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. and Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.
- Pirnay, J. P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Pirson, J., Struelens, M. and Vanderkelen, A. 2003. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: Persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1192–1202.
- Poole, K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17), 2200–2223.
- Poole, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(4), 1–13.
- Priebe, G. P. and Goldberg, J. B. 2014. Vaccines for *pseudomonas aeruginosa*: A long and winding road. *Expert Review of Vaccines*, 13(4), 507–519.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B. and Miyata, S. T. 2009. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 11–17.
- Rasmussen, T. B. and Givskov, M. 2006. Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects. *Microbiology*, 152(4), 895–904.
- Ratjen, F., Brockhaus, F. and Angyalosi, G. 2009. Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A review. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8(6), 361–369.
- Rawat, D. and Nair, D. 2010. Extended-spectrum β -lactamases in gram negative bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263-274.
- Raz, R. 2012. Fosfomycin: An old-new antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 4–7.
- Rehman, A., Patrick, W. M. and Lamont, I. L. 2019. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1–10.
- Reuter, K., Steinbach, A. and Helms, V. 2016. Interfering with bacterial quorum sensing. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 8(5), 1–15.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. and Prince, A. S. 2005. Pathogen-host interactions in *pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209–1223.

- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K. and Filloux, A. 2010. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: The *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology*, 20(7), 895–904.
- Schaible, B., Taylor, C. T. and Schaffer, K. 2012. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2114–2118.
- Schillaci, D. and Cusimano, M. 2014. Antimicrobial peptides from echinoderms as antibiofilm agents: a natural strategy to combat bacterial infections. *Taylor & Francis*, 81(3), 312–321.
- Selvaraj, A., Valliammai, A., Sivasankar, C., Suba, M., Sakthivel, G. and Pandian, S. K. 2020. Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
- Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T. and Lee, B. J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. *Molecules*, 17(10), 12276–12286.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. and Miller, G. H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B. and Jackson, R. W. 2011. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680.
- Strempe, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O. and Overhage, J. 2013. Human host defense peptide LL-37 Stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(12), e82240.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P. and Geesey, G. G. 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 2125–2133.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L. and Zorzet, A. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.
- Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y. and Hancock, R. E. W. 2014. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel antibiofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, 191, 121–130.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>.

- Thi, M. T. T., Wibowo, D. and Rehm, B. H. A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25.
- Toole, G. O., Kaplan, H. B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1), 49–79.
- Tré-Hardy, M., Nagant, C., El Manssouri, N., Vanderbist, F., Traore, H., Vanechoutte, M. and Dehaye, J. P. 2010. Efficacy of the Combination of Tobramycin and a Macrolide in an *In Vitro Pseudomonas aeruginosa* Mature Biofilm Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4409-4415.
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J. and Parsek, M. R. 2013. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2865–2878.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K. and Whitchurch, C. B. 2016. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7(1), 1-13.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3), 395–411.
- Vaara, M. 2010. Polymyxins and their novel derivatives. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 574–581.
- Van Acker, H., Van Dijck, P. and Coenye, T. 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*, 22(6), 326–333.
- Wagner, S., Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R. W., Empting, M. and Titz, A. 2016. Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 5929–5969.
- Walsh, C. C., McIntosh, M. P., Peleg, A. Y., Kirkpatrick, C. M. and Bergen, P. J. 2015. *In vitro* pharmacodynamics of fosfomicin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(11), 3042–3050.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. and Stewart, P. S. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323.
- Wang, L., Hu, C. and Shao, L. 2017. The-antimicrobial-activity-of-nanoparticles--present-situati. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249.
- Weldhagen, G. F. 2004. Sequence-selective recognition of extended-spectrum β -lactamase GES-2 by a competitive, peptide nucleic acid-based multiplex PCR assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3402–3406.

- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S. and Stewart, P. S. 2004. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6188–6196.
- Westwater, C., Kasman, L. M., Schofield, D. A., Werner, P. A., Dolan, J. W., Schmidt, M. G. and Norris, J. S. 2003. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: An alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1301–1307.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. and Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. and Salmond, G. P. C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 365–404.
- Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S. and Franklin, M. J. 2012. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 2062–2073.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R. and Lewenza, S. 2016. Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 544–553.
- Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R. and Lory, S. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6664-6668.
- Woodworth, B. A., Tamashiro, E., Bhargave, G., Cohen, N. A. and Palmer, J. N. 2008. An in vitro model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on viable airway epithelial cell monolayers. *American Journal of Rhinology*, 22(3), 235–238.
- Wright, G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.
- Yahav, D., Farbman, L., Leibovici, L. and Paul, M. 2012. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 18-29.
- Zhang, G., Wang, C., Sui, Z., Feng, J. 2015. Insights into the evolutionary trajectories of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(9), 2499–2506.
- Zhang, L. and Mah, T. F. 2008. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4447–4452.

- Zhang, L., Fritsch, M., Hammond, L., Landreville, R., Slatculescu, C., Colavita, A. and Mah, T. F. 2013. Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS ONE*, 8(4), 2–9.
- Zhang, L., Hinz, A. J., Nadeau, J. P. and Mah, T. F. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* tssC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5510–5513.
- Zhang, W., Yuan, Y., Li, S., Deng, B., Zhang, J., Li, Z. 2021. Comparative transcription analysis of resistant mutants against four different antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 160(11), 105166.

