

GENTAMİSİN VE İMİPENEM ETKİSİNDE PSEUDOMONAS AERUGINOSA QUORUM SENSİNG YANITLARI VE BİYOFİLM ÜRETİMİ: İN-VİVO MODELLEME*

Meral KARAMAN*, Osman YILMAZ*, Vahide BAYRAKAL**, İ. Hakkı BAHAR**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, İZMİR

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa ciddi solunum yolu infeksiyonlarından sıklıkla soyutlanan fırsatçı bir patojendir. İnfeksiyonların patogene- zinde; biyofilm, elastaz, alkalen proteaz, piyosiyenin, fosfolipaz ve ekzotoksin A gibi çeşitli virülans faktörlerinin üretimini düzenleyen, quorum sensing (çoğunluğu algılama) olarak adlandırılan hücreden hücreye iletişim sistemi sorumlu tutulmaktadır. *P.aeruginosa* AHL (acylhomoserine lactone) temelli ve birbiri ile ilişkili üç quorum sensing sistemine sahiptir; las, rhl ve kinolon. Bu sistem ile bakteri, bulundu- ğu ortamda kendi popülasyon yoğunluğunu algılayabilmekte ve sinyal molekülleri eşik değere ulaştığında belirli virülans faktörlerinin üretimini düzenleyebilmektedir. Bakterinin in-vitro ve in-vivo davranışlarının karşılaştırılması, bakteri, konak ve antibakteriyeller arasında- ki etkileşimin açıklanmasında hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, fenotipik ve genotipik özellikleri bilinen *P.aeruginosa* PAO1 (Wild type) ve PAO JP2 (Δ lasI/ Δ rhlII) referans laboratuvar suşları ile sıçanlarda kronik akciğer infeksiyonu modeli oluşturulmuştur. Bu model için suşların emdirildiği agar boncuklar sıçanlara intra- trakeal yol ile uygulanmıştır. On dört günlük infeksiyon sürecinin sonunda sıçanların BAL ve akciğer dokularından soyutlanan suşların gentamisin ve imipenem için MİK değerleri, bu antibiyotiklerin etkisinde quorum sensing yanıtı ve biyofilm üretimindeki değişiklikler araştırılmıştır. Quorum sensing yanıtı "mikro AHL", biyofilm üretimleri "kristal viyole boyama" yöntemi ile belirlenmiştir.

Konakçı ile karşılaşma sonrası bu referans laboratuvar suşlarının MİK aralıklarının ve quorum sensing aktivitelerinin değiştiği, genel olarak gentamisin ve imipenemin MİK düzeylerinde biyofilm üretimi gözlenmezken, sub-MİK yoğunluklarında biyofilm üretiminin olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, *P.aeruginosa* suşlarında in-vivo şartlarda, gentamisin ve imipenemin düşük yoğunluklarında biyofilm üretiminin indüklendiğini göstermektedir. Bu çalışma ile *P.aeruginosa*'ya ait virülans faktörlerinin ve quorum sensing sistemlerinin anlaşılmasında hayvan modellerinin önemli bir kez daha ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: agar boncuk yöntemi, biyofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing Responses and Biofilm Production under the Influence of Gentamicin and Imipenem: In Vivo Modelling

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen isolated frequently from serious upper respiratory tract infections. In the pathogenesis of these infections, cell to cell communication system of the bacteria, known as quorum sensing system, is held responsible for regulating production of various virulence factors such as biofilm, elastase, alkaline protease, pyocyanin, phospholipase and exotoxin A. *P.aeruginosa* possesses AHL (acylhomoserine lactone) mediated and interrelated three quorum sensing systems; las, rhl and quinolone. *P. aeruginosa* perceives local density of their population by quorum sensing system and as the concentration of the signalling molecules passes a threshold, bacteria regulate production of certain virulence factors. Experimental animal models are widely used in comparison of in vitro and in vivo behaviours of the bacteria, in displaying interactions between bacteria, host and antimicrobials.

In our study, we developed a chronic pulmonary infection model in rats using *P.aeruginosa* PAO1 (Wild type) and PAO JP2 (Δ lasI/ Δ rhlII) reference laboratory strains whose phenotypic and genotypic properties are well known. Intratracheal inoculation of rats with bacterial strains embedded in agarose beads was used as the experimental model. Following fourteen days of infectious period, we investigated gentamicin and imipenem MIC values of the strains that were isolated from BAL and pulmonary tissue samples of rats, also quorum sensing responses and changes in the biofilm production of the strains under the influence of these antibiotics, as well. Quorum sensing responses were determined by "micro AHL" method, biofilm formation by "crystal violet staining" method.

We determined that, MIC intervals and quorum sensing activities have changed when the laboratory strains encountered a host, and in general, biofilm formation has been detected at sub-MIC values but not at MIC values of gentamicin and imipenem.

Our results indicate that in vivo biofilm formation in *P. aeruginosa* strains can be induced at low gentamicin and imipenem concentrations. With this study, the importance of animal modelling in the experimental studies conducted to understand *P.aeruginosa* virulence factors and quorum sensing systems is revealed once more.

Keywords: agarose beads method, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing

İletişim adresi: Meral Karaman. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, İZMİR

Tel.: (0232) 412 46 53, GSM: (0532) 652 56 52

e-posta: meral.karaman@deu.edu.tr

Alındığı tarih: 04.05.2010, revizyon kabulü: 12.05.2010

*Çalışmanın bir bölümü 25. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi'nde sunulmuş (S1) ve sözel sunu ödülü almıştır (28 Nisan-02 Mayıs 2010, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti)

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa; mekanik yollarla solutulan ve immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi infeksiyonlara, özellikle kistik fibrozis olgularında kronik akciğer infeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı bir patojendir⁽³⁾. Bakterilerin konakçı ile karşılaşma sonrası, hücreden hücreye iletişim sinyalleri ile buldukları ortamdaki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirmelerine olanak sağlayan sistem, quorum sensing (QS) ya da çoğunluğu algılama olarak adlandırılmaktadır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak sinyal molekülleri ile çalışan bu sistemin, *P.aeruginosa*'nın çeşitli virulans faktörlerinin üretimini düzenlediği bilinmektedir. Bu şekilde bakteri bulunduğu ortam koşullarına göre fenotipik değişiklikler gösterebilmektedir⁽²⁵⁾.

P.aeruginosa'da birbiri ile ilişkili ve sinyaller ile düzenlenen *las*, *rhl* ve kinolon olmak üzere üç QS sistemi tanımlanmıştır⁽¹¹⁾. *Las B* elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de *las* sistemi olarak adlandırılan birincil sistem; *las I* (3-oxo-C12-HSL-L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI sentaz geni) ve *las R* ("transcriptional activator" proteini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve *Las B* elastaz, *Las A* proteaz, ekzotoksin A gibi diğer hücre dışı virulans etmenlerinin üretimini en uygun düzeyde kontrol etmektedir^(16,21). İkincil QS sistemi olan *rhl* ise; *rhl I* (C4-HSL, AI sentaz geni, kısa zincirli AHL) ve *rhl R* ("transcriptional activator" proteini kodlayan gen)'den oluşur. *Rhl AB* operonunun (operon: yönetici DNA bölgesi) yapımını kontrol eden bu sistemin, ramnolipid üretimi için gerekli olan "rhamnositransferaz" enziminin sentezlenmesini düzenlemesinin yanı sıra, *Las B* elastaz, *Las A* proteaz, piyosiyanın, siyanid ve alkalin proteazın üretimini de düzenlediği bilinmektedir⁽⁷⁾.

P.aeruginosa infeksiyonlarında bakteri konak hücre yanıtından kaçmak için biyofilm içerisinde yaşamını sürdürmektedir. Biyofilm oluşum sürecinde yüzeye tutunan bakterilerde ekzopolisakkarit sentezi ile ilgili enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin ve değişen mikro çevreye uyumda etkin olan proteinlerin yapımı

nın artması ile biyofilm yapısındaki bakterilerin fenotipleri, planktonik bakterilerden farklı bir fenotipe dönüşmektedir^(10,18,20). Biyofilm içerisinde üreyen bakterilerin, planktonik olarak üreyenlere göre antibiyotiklere daha dirençli olduğu bilinmektedir.

QS sistemleri tarafından düzenlenen çeşitli virulans faktörleri ile *P.aeruginosa*'nın artan antibiyotik direnç oranları, mortalite ve morbiditesinin yüksekliği açıklanmakla birlikte, bakteri-konakçı ve antibakteriyel ajanlar arasındaki etkileşim tam anlamıyla açıklanamamaktadır. Bu konuda özellikle deneysel hayvan modellerinin yol gösterici olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, genotipik ve fenotipik özellikleri bilinen *P.aeruginosa* PAO1 (Wild type; WT) ve PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhlI$) referans laboratuvar suşları kullanılarak sıçanlarda deneysel kronik akciğer infeksiyonu modeli oluşturulmuş, suşların gentamisin ve imipenem etkisinde QS yanıtları ve biyofilm üretimi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmada fenotipik ve genotipik özellikleri bilinen *P.aeruginosa* PAO1 (WT) ve PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhlI$) referans laboratuvar suşları kullanılmıştır.

Deney hayvanları: Çalışma yerel etik kurulun onayı ve denetiminde konvansiyonel şartlarda yetiştirilmiş, 230-280 g ağırlığında, yedili üç grup halinde, 21 adet erkek Wistar albino sıçan ile gerçekleştirilmiştir.

Agar boncuğun hazırlanması: Deneysel *P.aeruginosa* kronik akciğer infeksiyonu modeli için Cash ve ark.⁽⁴⁾ tarafından ilk kez uygulanan ve Lesprit ve ark.⁽¹⁷⁾ tarafından geliştirilen agar boncuk yöntemi kullanılmıştır. Kısaca zenginleştirilmiş sıvı besiyerinde 37°C'de bir gece bekletilen bakteriyel suspansiyon son yoğunluğu 10⁷-10⁸ CFU/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu suspansiyon 56°C'deki agaroz ve mineral oil ile karıştırılarak soğumaya bırakılmış, aynı işlem kontrol grubu için steril serum fizyolojik ile yapılmıştır.

Deneysel infeksiyon modeli: Sıçanlara intraperitoneal ketamin (Ketalar, Pfizer) (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer) (10

mg/kg) anestezisi uygulanmıştır. Steril cerrahi şartlar altında boyun ön yüzeyine bistüri ile 1 cm kesi atılmış ve trakea diseke edilmiştir. Hayvanların trakealarına 4.5 F branül yerleştirildikten sonra 0.5 mL steril fosfat tampon solusyonu verilip geri çekilerek BAL örneği alınmıştır. Daha sonra branül çıkarılmış ve agar boncuklar intratrakeal olarak inoküle edilmiş, cerrahi alan kapatılmıştır. Kontrol grubuna bu işlemler steril serum fizyolojik içeren agar boncuk ile uygulanmıştır. İnokülasyon sonrası denekler üç ayrı gruba ayrılmış ve oda ısısında (21-22°C), 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, serbest su ve gıda sağlanarak; stres ve gürültüden izole bir şekilde 14 gün boyunca izlenmiştir.

Akciğerde bakteriyel üreme ve BAL: İnokülasyon sonrası 14. günde tüm hayvanlardan önce BAL örnekleri alınmış, daha sonra denekler toksik doz anestezik madde ile (Pentobarbital 2 mL, ip yolla) sakrifiye edilmiştir. Aseptik koşullar altında akciğer dokusu steril serum fizyolojik içinde homojenize edildikten sonra kantitatif ekim yapılmıştır. İzole edilen suşlar in-vitro profil çalışmaları için stoklanmıştır.

MİK ve sub-MİK'lerinin belirlenmesi: Sıçanlardan izole edilen suşların, aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin ve karbapenem grubu antibiyotiklerden imipenem için MİK değerleri CLSI standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁵⁾.

Biyofilm oluşumlarının değerlendirilmesi: Deneklerden izole edilen suşların 96'lık ELİSA plaklarına Muller Hinton Broth (MHB) ile gentamisin ve imipenemin MİK, % 50 MİK ve % 25 MİK yoğunluklarında inokülasyonu yapılmıştır. Biyofilm oluşumu kristal viyole ile boyama yöntemi sonrası, 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Besiyerinin iki katı absorbanlar pozitif olarak kabul edilmiştir^(2,15).

QS yanıtları: "Mikro AHL" yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kısaca; Louria Bertani Agar (LBA) dökülen 96 çukurlu ELİSA mikro plaklarına, kısa zinciri (C4-HSL) görüntülemek için Louria Bertani Broth (LBB)'da 30°C'de 18 saat inkübe edilip McFarland 0.5'e eşit bulanıkta ayarlanan *Chromobacterium violaceum* (CV026) ve

uzun zinciri (3O C12-HSL) görüntülemek için *Agrobacterium tumefaciens* (A136) tanımlayıcı suşları (reporter strains) inoküle edilmiştir. Üzerine eşit miktarda deneklerden izole edilen suşlar eklenmiş, 37°C'de inkübe edilmiştir. AHL varlığı makroskopik olarak değerlendirilmiş ve mavi-yeşil renk görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir⁽²³⁾.

İstatistiksel analiz: Gruplar arasında BAL ve akciğer dokusunda üreyen bakteri sayıları açısından farklılık Mann-Whitney testi ile analiz edilmiş, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

P.aeruginosa kronik akciğer infeksiyonu modeli sonrası ikinci günde sıçanların klinik izleminde tüylerinin kabarıklığı, kambur bir postürde hırıltılı solunumun eşlik ettiği gözlenmiştir. İnfeksiyonun altıncı gününe kadar PAO1 (WT) ile infekte grupta dört, PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$) ile infekte grupta bir sıçan ölmüş, çalışma kontrol grubunda yedi, PAO1 (WT) grubunda üç, PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$) grubunda altı sıçan ile tamamlanmıştır. Agar boncuk inokülasyonun 14. gününde BAL ve akciğer dokularından yapılan kantitatif ekim sonucunda bakteri sayıları açısından vahşi tip suş ile infekte grupta, mutant suş ile infekte gruba göre anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. PAO1 ve PAO JP2 ile infekte gruplarda 14. günde sıçanların BAL ve akciğer doku örneklerinde kantitatif ekim sonrası bakteri miktarları.

Gruplar	Denek sayısı	Akciğer (log CFU/g)	BAL (log CFU/mL)
Kontrol	7 (0)*	-	-
PAO1 (WT)	3 (4)*	4.70 ± 0.30	4.81 ± 0.38
PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$)	6 (1)*	3.05 ± 0.32	3.35 ± 0.30
p		< 0.05	< 0.05

*() Ölen denek sayıları.

Gruplardan izole edilen suşların MİK değerlerine bakıldığında ise; PAO1 grubunda bir sıçanda hem gentamisin hem de imipeneme karşı direnç geliştiği belirlenmiştir (Tablo 2). PAO JP2 grubunda ise bir sıçanda gentamisine

direnç gelişirken, diğer beş sıçanda suşların duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

Gruplarda konakçı ile karşılaşma sonrası, gentamisin ve imipenemin etkisi altında suşların QS yanıtlarına bakıldığında; PAO1 ile infekte grupta tüm sıçanlarda, suşların orijinal suş ile aynı profilde *las(+)/rhl(+)* olduğu (Tablo 2), PAO JP2 ile infekte grupta ise konak hücre ile karşılaşma sonrası sıçanların tümünün, inoküle edilen orijinal suştan farklı olarak *rhl(+)* olduğu, iki sıçanda ise hem *rhl* hem de *las'*ın olumlu olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 2. PAO1 ile infekte gruptan izole edilen suşların gentamisin ve imipenem için MİK değerleri ve QS yanıtları.

Suşlar	Gentamisin	İmipenem	3-O-C12-HSL	C4-HSL
PAO1 (WT)	4 µg/mL	8 µg/mL	+	+
PAO1/1	16 µg/mL	16 µg/mL	+	+
PAO1/2	8 µg/mL	8 µg/mL	+	+
PAO1/3	8 µg/mL	8 µg/mL	+	+

Tablo 3. PAO JP2 ile infekte gruptan izole edilen suşların gentamisin ve imipenem için MİK değerleri ve QS yanıtları.

Suşlar	Gentamisin	İmipenem	3-O-C12-HSL	C4-HSL
PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhlI$)	8 µg/ mL	8 µg/ mL	-	-
PAO JP2 /1	16 µg/ mL	8 µg/ mL	+	+
PAO JP2/ 2	4 µg/ mL	4 µg/ mL	-	+
PAO JP2/ 3	4 µg/ mL	4 µg/ mL	+	+
PAO JP2/ 4	4 µg/ mL	4 µg/ mL	-	+
PAO JP2/ 5	4 µg/ mL	4 µg/ mL	-	+
PAO JP2/ 6	4 µg/ mL	4 µg/ mL	-	+

Vahşi tip suş ile infekte grupta sıçanlardan soyutlanan tüm suşların, gentamisin ve imipenemin % 50 ve % 25 MİK yoğunlukları etkisinde biyofilm ürettiği gözlenmiştir. Mutant suş ile infekte grupta ise bir sıçanda gentamisin ve imipenemin tüm yoğunluklarında biyofilm üretimi saptanırken, bir sıçanda gentamisin % 50 ve % 25, imipenemin ise tüm yoğunluklarında biyofilm üretimi belirlenmiştir. Genel olarak, gentamisin ve imipenemin MİK yoğunluklarında biyofilm üretmeyen suşların, düşük yoğunluklara doğru gidildikçe biyofilm ürettiği belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada vahşi tip PAO1 ve çifte mutant PAO JP2 referans laboratuvar suşları kullanılarak sıçanlarda kronik akciğer infeksiyonu modeli oluşturulmuştur. Bu modelde konvensiyonel olarak yetiştirilen normal ratlar, agar boncuklara gömülmüş bakterinin intratrakeal inoküle edilmesi ile infekte edilmiştir. Bu model ile özellikle kistik fibrozisli olgularda *P.aeruginosa*'nın neden olduğu kronik akciğer infeksiyonundaki goblet hücre hiperplazisi, fokal nekrozis, akut ve kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu, sitokin birikimi gibi histopatolojik değişikliklerin taklit edilebileceği belirtilmiştir. Deneysel modellemede agar boncuk içine *P.aeruginosa* gömülmesinin amacı bakteriyel biyofilm varlığını taklit ederek, bakterinin hava yollarında varlığını sürdürmesine ve kronik akciğer infeksiyonunu başlatmasına zemin hazırlamaktır. Ayrıca bakterinin in-vivo olarak boncuklardan göç edebileceği, bu durumda da hem biyofilm hem de planktonik durumdaki hücresel değişikliklerin karşılaştırılabileceği belirtilmiştir^(4,22).

Vahşi tip suş ile infekte grupta mortalite oranlarının yüksek olması nedeni ile çalışma bu grupta üç sıçan ile tamamlanabilmiştir. Lesprit ve ark.⁽¹⁷⁾ da aynı deneysel modellemede bu suş için % 72 mortalite oranı bildirmiştir. PAO JP2 ile infekte grupta mortalite oranlarının düşük olması, bu suşun *las* ve *rhl* defektif olması nedeni ile daha az virülan olması, dolayısıyla konak savunma sistemi tarafından etkin olarak temizlenmesinin göstergesi olabilir.

Deney sonunda sıçanlardan soyutlanan suşların, konak ile karşılaştıktan sonra fenotipik özelliklerinin ve gentamisin ve imipenem için MİK aralıklarının değiştiği belirlenmiştir. Bilindiği gibi biyofilmde üreyen bakteriler aynı izolatın planktonik olarak üreyenlerine göre antibiyotiklere daha dirençlidir⁽⁶⁾. Bu direnç oranları biyofilm evrelerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, biyofilmin yüzeyel tutunma evresinde bakteri antibiyotiklere duyarlı iken, olgunlaşma döneminde aynı antibiyotiklere direnç gösterebilmektedir⁽¹⁴⁾. Çalışmamızda her iki grupta da suşların MİK aralığının değişmesi, vahşi tip suş ile infekte grupta bir suşun hem

gentamisin hem de imipeneme direnç geliřtirmesi biyofilm evreleri ile açıklanabilir.

Literatürde *P.aeruginosa*'nın temel virülans faktörlerinden olan biyofilm yapının, antibiyotik geçişinde bariyer görevi görerek dirence yardımcı olmasının yanı sıra antibiyotik uygulamalarının da biyofilm oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Aminoglikozidlerin subinhibitör yoğunluklarının *P.aeruginosa* ve *E.coli*'de biyofilm yapıyı indüklediği, beta-laktam antibiyotik imipenemin *P.aeruginosa* ekzopolisakkarit alginat üretimini artırdığı ve biyofilm volümünde artışa neden olduğu gösterilmiştir^(1,13). Çalışmamızda genel olarak gentamisin ve imipenemin MİK yoğunluklarında biyofilm üretimi saptamazken, düşük yoğunluklara doğru gidildikçe biyofilm üretiminin belirlenmesi bu verileri desteklemektedir.

P.aeruginosa'da çeşitli virülans faktörlerinin üretiminin hücreden hücreye sinyal iletim sistemi QS ile kontrol edildiği belirlenmiştir^(12,19). Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak üretilen bu sinyal molekülleri içinde temel olarak *las* sistemi; *rhl* sisteminin çalışmasını uyarması ve kinolon sistemini düzenlemesi sebebi ile anahtar rol oynamaktadır⁽²⁴⁾. Ancak *las* sisteminin çalışmaması durumunda, hiyerarşik bir düzene bağlı olarak QS sistemleri kendi içinde yeniden düzenlemeye gitmekte ve ikincil sistem olan *rhl*, *las* sisteminin yerine geçebilmektedir⁽⁹⁾. Son zamanlarda Dekimpe ve Déziel⁽⁸⁾ *las* ve *rhl* düzenleyicileri arasında yeni bir yolun varlığını ortaya koymuşlardır. Buna göre rezidüel *rhlI* ve *rhlR* transkripsiyonları çevresel faktörlerle kombine olarak *rhl* düzenleyicisinin aktivasyonuna, bu da gecikmeli olmakla birlikte *las* düzenleyicisinin aktivasyonuna neden olabilmektedir. Çalışmamızda PAO JP2 ($\Delta lasI/\Delta rhlI$) ile infekte grupta konak hücre ile karşılaşma sonrası sıçanların tümünün, inoküle edilen orijinal suştan farklı olarak *rhl* (+) olması, iki sıçanda ise hem *rhl* hem de *las*'ın olumlu olması sözü edilen alternatif yol üzerinden gerçekleşmiş olabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, kronik akciğer infeksiyonu modelinde *P.aeruginosa* suşlarında in-vivo şartlarda, gentamisin ve imipenemin düşük yoğunluklarında biyofilm üretiminin indüklendiğini göstermektedir. QS sistemi üzerinden, bakteri ve konakçı arasındaki etkileşim

min aydınlatılması ve yeni tedavi hedeflerinin ortaya konmasında deneysel hayvan modellerinin önemli yol gösterici olduğunu düşünmekteyiz.

Teşekkür: Bu çalışmada kullanılan *C.violaceum* ve *A.tumafaciens* tanımlayıcı suşlarını hediye eden Scott Rice'a teşekkür ederiz (Scott Rice, PhD, Centre for Marine Bio-Innovation The School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, NSW Australia 2052).

KAYNAKLAR

1. Bagge N, Schuster M, Hentzer M et al: Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production, Antimicrob Agents Chemother 2004;48(4):1175-87.
2. Baskın H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N: Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of Escherichia coli, Int J Antimicrob Agents 2002;19(1):79-82.
3. Bjarnsholt T, Givskov M: Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? Curr Infect Dis Rep 2008;10(1):22-8.
4. Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG Jr, Bass JA: A rat model of chronic respiratory infection with Pseudomonas aeruginosa, Am Rev Respir Dis 1979;119(3):453-9.
5. Clinical Laboratory Standards Institute: Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış standart-Onaltıncı baskı, M100-S16, CLSI, Wayne, PA (2006).
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, Science 1999;284(5418):1318-22.
7. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP: The involvement of the cell-to-cell signals in the development of a biofilm, Science 1998;280(5361):295-8.
8. Dekimpe V, Déziel E: Revisiting the quorum-sensing hierarchy in Pseudomonas aeruginosa: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors, Microbiology 2009;155(Pt 3):712-23.
9. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M, Williams P: Pseudomonas aeruginosa

- quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR, *Mol Microbiol* 2003;50(1):29-43.
10. Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167-93.
 11. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA, van Delden C: Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients, *BMC Microbiol* 2007;7:33, Doi.10.1186/1471-2180-7-33.
 12. Grossi P, Dalla Gasperina D: Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in critically ill patients, *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006;4(4):639-62.
 13. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI: Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature* 2005;436(7054):1171-5.
 14. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O: Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322-32.
 15. Kanamaru S, Kurazono H, Terai A et al: Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis, *Int J Antimicrob Agents* 2006;28(Suppl 1):21-5.
 16. Köhler T, Dumas JL, Van Delden C: Ribosome protection prevents azithromycin-mediated quorum-sensing modulation and stationary-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(12):4243-8.
 17. Lesprit P, Faurisson F, Join-Lambert O et al: Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats, *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(11):1478-82.
 18. Matsukawa M, Greenberg EP: Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 2004;186(14):4449-56.
 19. Nick JA, Rodman DM: Manifestations of cystic fibrosis diagnosed in adulthood, *Curr Opin Pulm Med* 2005;11(6):513-8.
 20. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L et al: Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000;97(17):9636-41.
 21. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN: The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbes Infect* 2000;2(14):1721-31.
 22. Stotland PK, Radzioch D, Stevenson MM: Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: Models for the study of cystic fibrosis, *Pediatric Pulmonol* 2000;30(5):413-24.
 23. Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G, Villena A: Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine, *Vet Microbiol* 2004;101(3):167-76.
 24. Waters CM, Bassler BL: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:319-46.
 25. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M: Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362(1483):1119-34.