





Kistik Fibrozun *Pseudomonas aeruginosa*'da Neden Olabileceği Fenotipik Değişiklikler Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının ve Antimikrobik Ajanlara Yanıtsızlığın Önemli Bir Belirleyicisi Olabilir

Cystic Fibrosis-Modulated Phenotypic Changes of Pseudomonas aeruginosa May Be a Critical Determinant for Respiratory Infections and Unresponsiveness to Antimicrobial Agents

Meryem Özlem Ersoy¹ , Serhan Sakarya² , Necati Günay³ , Özgenur Yılmaz⁴ 

¹İskenderun Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Hatay, Türkiye

²Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

³Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ankara, Türkiye

⁴Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Özet

Amaç: Kistik fibroz (KF) hastaları, çoğu biyofilm oluşturan solunum sistemi patojenleriyle karşı karşıyadır ve bu durum terapötik müdahalelerde sık sık başarısızlıklara neden olmaktadır. Bu çalışmada, KF hastalarının solunum epiteliyle *Pseudomonas aeruginosa* arasındaki etkileşim sonucu bakteride ortaya çıkan fenotipik değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: *P. aeruginosa*'nın fenotipik özelliklerinden biyofilm oluşumu, adezyon ve üreme hızının *in vitro* araştırması, normal ve KF'li bronşiyal (BEAS-2B ve IB3-1) ve trakeal (1HAEo- ve CFTE29o-) epitel hücrelerinde yapılmıştır. Deneylerde yeşil floresan protein ekspresye eden bir suş olan *P. aeruginosa* PAO1 kullanılmıştır.

Bulgular: *P. aeruginosa*'nın KF'li bronşiyal epitele adezyonunun, normal bronşiyal epitele kıyasla azaldığı ve KF'li bronşiyal epitelde biyofilm oluşturmalarının arttığı saptanmıştır. Ayrıca, *P. aeruginosa*'nın KF'li bronşiyal epitelde morfolojik değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar: Bulgularımız, KF'li solunum epitelindeki değişikliklerin, KF hastalarındaki enfeksiyonlarda bakteriyel fenotipik özellikleri doğrudan etkilediğini ve bu fenotipik değişikliklerin enfeksiyonların tedavisi sırasında antimikrobik ajanlara yanıt alınmamasının ana belirleyicisi olabileceğini düşündürmektedir.

Klinik Dergisi 2019; 32(1): 22-8.

Anahtar Sözcükler: Kistik fibroz, biyofilmler, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Objective: Cystic fibrosis (CF) patients are exposed to respiratory system pathogens mostly forming biofilms, and therefore therapeutic interventions frequently fail. In this study, we aimed to investigate the resulting phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* due to interaction between bacteria and respiratory epithelium of CF patients.

Methods: *In vitro* investigation of some phenotypic characteristics of *P. aeruginosa* such as biofilm formation, adhesion, and its growth rate was made in normal and CF bronchial (BEAS-2B and IB3-1) and tracheal (1HAEo- and CFTE29o-) epithelium. *P. aeruginosa* PAO1, a green fluorescent protein expressing strain, was used in the experiments.

Results: Adhesion of *P. aeruginosa* to CF bronchial epithelium had decreased and biofilm formation had increased in CF bronchial epithelium compared to normal bronchial epithelium. Moreover, *P. aeruginosa* was found to be the cause of morphological changes in the CF bronchial epithelium.

Conclusions: Our findings support that the changes in respiratory epithelium with CF directly affect bacterial phenotypic characteristics in infected CF patients, and these phenotypic changes may be the major determinant of unresponsiveness to antimicrobial agents during treatment of infections.

Klinik Dergisi 2019; 32(1): 22-8.

Key Words: Cystic fibrosis, biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*.

ORCID iDs of the authors: M.Ö.E. 0000-0002-7247-0517; S.S. 0000-0001-5252-9211; N.G. 0000-0003-4593-6825; Ö.Y. 0000-0002-8223-4737

Cite this article as: Ersoy MÖ, Sakarya S, Günay N, Yılmaz Ö. [Cystic fibrosis-modulated phenotypic changes of *Pseudomonas aeruginosa* may be a critical determinant for respiratory infections and unresponsiveness to antimicrobial agents]. *Klinik Derg.* 2019; 32(1): 22-8. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Serhan Sakarya, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

E-posta/E-mail: serhansakarya@yahoo.com

(Geliş / Received: 4 Ocak / January 2018; Kabul / Accepted: 7 Mayıs / May 2018)

DOI: 10.5152/kd.2019.07

Giriş

Mukosilyer klirens (MCC), akciğerlerde mikroorganizmalara karşı doğuştan gelen önemli bir savunma mekanizması bileşenidir (1,2). MCC'nin temel yapısını, solunum yolu epitelinin yüzeyini kaplayan hava yolu yüzey sıvısının (ASL) bileşimi ve hacmi belirler. ASL, yapışkan bir mukus tabakası ve perisilyer sıvı tabakası (PCL) olmak üzere iki farklı katmandan oluşur. PCL, epitelin mukus tabakasını fiziksel olarak ayırır ve mukus boşluğunu artıran düşük yapışkanlıkta bir ortam sağlar (3). Kistik fibroz (KF), sindirim, solunum, endokrin ve diğer birçok sistemle ilişkili, yüksek mortalite hızına sahip otozomal resesif bir genetik hastalıktır (4). KF'deki başlıca eksiklik, KF transmembran iletkenlik düzenleyicisi (KFTR)'ndeki fonksiyon bozukluğudur. KFTR, ekzokrin epitel hücrelerinin apikal membranlarında bulunan cAMP ile indüklenen klor kanalı yoluyla klor salınımını düzenlemektedir. Klor salınımindaki bozukluklar, hızla sodyum emilimine neden olmakta; buna bağlı olarak azalan PCL hacmi, MCC'ye zarar vermektedir (3,5,6). İyon değişimindeki bozukluklar, salgı ve endositoz yollarındaki organellerin pH'sini de etkilemektedir (7,8). KF'de Golgi cihazındaki yüksek pH, müsin transferaz aktivitesini etkileyerek, proteinlerin ve glikolipidlerin glikozilasyon profillerinde farklılıklara neden olmaktadır. Siyaliltransferazların optimum pH değeri, fukoziltransferaz ve sülfotransferazinkinden daha düşük olduğu için, hücrelerin yüzey yapılarında asiyalo-fukoz ve sülfat glikozilasyonu artmaktadır (9-11). Hücrenin böyle kritik değişikliklere uğrayan yüzey yapıları, çeşitli bakteriler için reseptör görevi de yapmaktadır.

Mukus yapılarındaki değişiklikler, hava yolunda mukus tıkanmalarına ve hipoksik koşulların oluşmasına neden olmaktadır (12). Bu anaerop koşullar, bakterileri biyofilm oluşumuna teşvik etmektedir. KF hastalarının balgamında biyofilm oluşmasını kolaylaştıran ramnolipidler de saptanmıştır (13,14). Biyofilm oluşumunun kronik infeksiyonlarda ciddi bir problem olduğu iyi bilinmektedir (15). Biyofilmler, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve altında mikroorganizmaların çoğaldığı ve topluluk oluşturabildiği koruyucu bir katmandır. Polimerik maddelerden oluşan bu matris içinde mikroorganizma, üreme hızına ve gen transkripsiyonuna göre değiştirilmiş bir fenotip göstermektedir (16). Mikroorganizmaların biyofilm yapısı, fagositozu zorlaştırarak (17), antibiyotiklerin etki göstermesini önlemekte (18) ve olumsuz çevre koşullarına adaptasyonu sağlamaktadır (19). Patojen mikroorganizmalar, KF hastalarının solunum yollarında çocukluk döneminde kolonize olur ve akut ataklarla birlikte hayat boyu süren kronik seyirli infeksiyonlara neden olur. Çoğu KF hastası solunum yolu infeksiyonlarından hayatlarını kaybetmektedir (20). En sık izole edilen KF patojenleri, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleksi (BCC)'dir. Bu patojenlerin prevalansı, bebeklikten yetişkinliğe doğru zamanla değişmektedir. *H. influenzae* ve *S. aureus*, çocukluk çağında; *P. aeruginosa*, erişkin dönemde daha sık karşılaşılan; BCC ise ömür boyunca görülen etyolojik ajanlardır (21).

KF hastalarında *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik infeksiyonlar, pulmoner fonksiyonları azaltırken, mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. Bununla birlikte, *P. aeruginosa*'nın KF hastalarında en sık izole edilen patojen olmasının ve ço-

ğunun biyofilm oluşturmasının nedeni tam olarak belirlenmemiştir. Bu çalışmada, KF hastalarının akciğer infeksiyonlarında, bakterinin, fenotipik yapısına göre mi seçildiğinin; yoksa infeksiyon oluştururken mi fenotipik değişikliğe uğradığının, araştırılması amaçlanmıştır. KF'li solunum epitelindeki *P. aeruginosa* infeksiyonunun oluşmasını ve persiste etmesini daha iyi anlamak için *P. aeruginosa*'nın KF'li ve sağlıklı solunum epitelinde *in vitro* biyofilm oluşturması, yapı değişimi, hücreye adezyon kapasitesi gibi fenotipik özellikleri ve üreme hızı araştırılmıştır.

Yöntemler

Epitel hücreleri ve mikroorganizmalar: Bu çalışmada KF'li ve sağlıklı bireylerin bronşiyal ve trakeal epitel hücreleri kullanılmıştır. Normal insan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) Dr. Sekhar Reddy (Illinois Üniversitesi, Chicago, IL, ABD)'den temin edilmiş; hücreler %10 fetal sığır serumu içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri (DMEM®, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)'nde üretilmiştir. KF'li bronşiyal epitel hücreleri olarak IB3-1 (ATCC® CRL-2777™), American Type Culture Collection (ATCC)'dan alınmıştır ve %5 fetal sığır serumu içeren LHC-8 bazal besiyerinde (Invitrogen, NY, ABD) üretilmiştir. Normal (1HAEo-) ve KF'li (CFTE29o-) trakeal epitel hücreleri, Dr. Dieter Gruenert (California Pasifik Tıp Merkezi Araştırma Enstitüsü, San Francisco, CA, ABD)'den temin edilmiştir. Hücreler, %10 fetal sığır serumu içeren DMEM®'de üretilmiştir. Tüm hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.

Yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden mukoid ve hareketli bir suş olan *P. aeruginosa* PAO1, Dr. Erik P. Lillehoj (Maryland Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Bölümü, Baltimore, MA, ABD)'den temin edilmiştir.

Adezyon testleri: Hücre yüzey değişikliklerinin *P. aeruginosa*'nın normal ve KF'li solunum yolu epiteline olan adezyonuna etkisini göstermek için, kalitatif ve kantitatif adezyon testleri yapılmıştır.

Kalitatif adezyon testinde hücreler 9 cm²'lik doku kültürü plaklarına ekilmiş ve konflüans gösterinceye kadar inkübe edilmiştir. Son konsantrasyonu 10⁷ CFU/ml olacak şekilde bir bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve bu bakteri süspansiyonunun 1 ml'si tüm plağı kaplamış olan hücrelerle 37°C'de 2.5 saat inkübe edilmiştir. Her bir plak fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile üç kez yıkanmış, üzerlerine Mounting Medium (Daco, Copenhagen, Danimarka) damlatılarak lamelle kapatıldıktan sonra floresan mikroskop (Olympus, Tokyo, Japonya)'la incelenerek fotoğraflanmıştır.

Kantitatif adezyon testinde hücreler 24 kuyucuklu kültür plaklarına (Costar, Cambridge, MA, ABD) 1 ml besiyeri/kuyucuk içerisinde 0.5×10⁵ hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültürü besiyeri içerisinde son konsantrasyonu 10⁷ CFU/ml olacak şekilde *P. aeruginosa* süspansiyonu hazırlanmış ve kuyucuklara 1 ml süspansiyon eklenerek hücrelerle 2.5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, hücreler PBS ile üç defa yıkanmış; 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve %1 nonident P-40 içeren 200 µl buzda soğutulmuş lizis tamponuyla parçalanmıştır. Her lizattaki protein konsantrasyonu, bikininik asid yöntemiyle Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak belirlenirken, kalan 100 µl li-

zat, 96 kuyucuklu floresan plakta florometrik olarak okutulmuş ve floresans ünitesi belirlenmiştir (ex 485 nm/em 530 nm). Adezyon gösteren bakteri, 1 mg hücre proteini başına düşen floresans ünitesi olacak şekilde standardize edilmiştir.

Üreme ve biyofilm oluşturma hızlarını belirleme yöntemi: Normal (BEAS-2B ve 1HAEo-) ve KF'li (IB3-1 ve CFTE29o-) solunum epiteli hücreleri 24'lü plağın birer kuyucuğuna ekilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası süpernatantlar başka bir 24 kuyucuklu plağa alınmıştır. Hücrelerin üzerine tekrar taze besiyeri eklenirken sonra, her bir kuyucuğa hücrelerin ürettiği besiyeri içinde hazırlanmış 10⁵/ml bakteri süspansiyonundan 500 µl eklenmiştir. Florometre, 37°C'de inkübasyonda 485-535 nm dalga boyunda 16 saat süreyle 30 dakikada bir kinetik moda okuma yapacak şekilde ayarlanmıştır. Okuma sonrasında plak, biyofilm oluşumunu belirlemek için 48 saat inkübasyonda bırakılmıştır. Üreme hızları için 0., 6., 8., 12. ve 16. saatlerdeki floresans değerleri karşılaştırılmıştır.

Biyofilm oluşturma hızları için inkübasyon sonrasında kuyucukların içi boşaltılmış ve iki kez yıkanmıştır. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl %1 kristal viyole eklenerek boyanması için 15 dakika beklenmiştir. İçerik boşaltılmış ve iki kez PBS ile yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20)'la çözdürülmüştür. Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak 595 nm dalga boyunda okunmuş ve optik dansitesi 1'den büyük olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edilmiştir.

Her çalışma, her bir örnek en az üç kez kullanılarak en az üç kez tekrar edilmiştir.

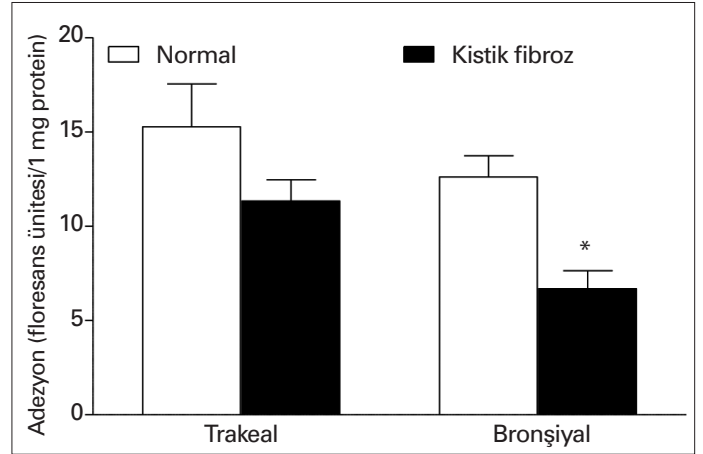
İstatistiksel analiz: Biyofilm oluşumu, deney ve kontrol grup ortalamaları, tek yönlü ANOVA kullanılarak; adezyon değerleri, *t*-testiyle değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak *p*<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Verilerin analizinde Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) programı kullanılmış ve program özelliği olarak *p*<0.05 altında olan veriler, *p*<0.01 veya *p*<0.001 şeklinde belirtilmiştir.

Bulgular

***Pseudomonas aeruginosa*'nın normal ve KF'li epitel adezyonu:** *P. aeruginosa*'nın, KF'li bronşiyal (IB3-1) epitel hücrelerine adezyonu, normal (BEAS-2B) epitel hücrelerinden daha az olmuştur (*p*<0.05). *P. aeruginosa*'nın, KF'li trakeal (CFTE 29o-) epitel hücrelerine adezyonu da normal trakeal (1HAEo-) hücrelerden daha az olmuştur; ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 1). IB3-1 hücreleriyle inkübe edilen bakterilerde çomak yapısında uzama şeklinde morfolojik değişiklikler gözlenmiştir (Resim 1).

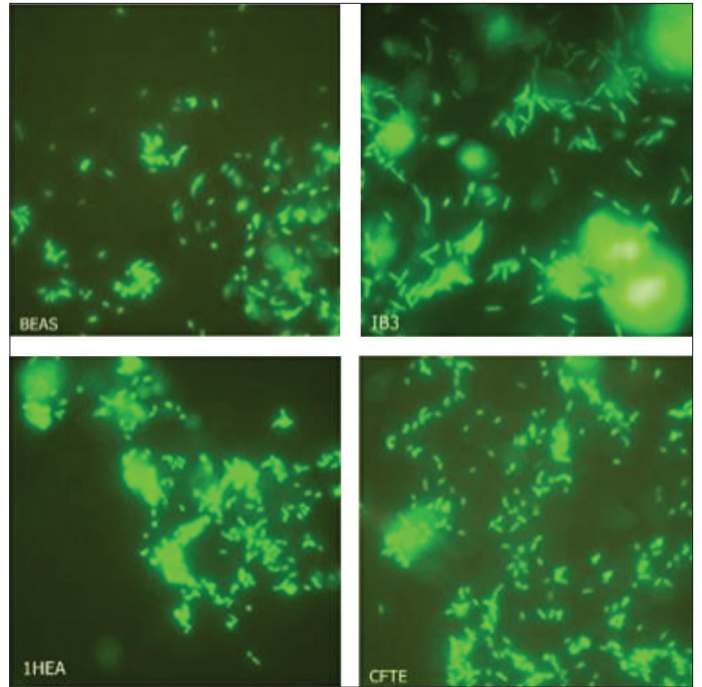
***Pseudomonas aeruginosa*'nın normal ve KF'li epiteldeki üreme hızları:** Üreme hızları 16 saat süreyle hücrelerin ve hücre süpernatantlarının varlığında belirlenmiştir. Hücrelerin üreme hızlarının 6., 8., 12. ve 16. saatlerde değerlendirilmesi sonucunda, kontrol, normal ve KF'li hücre grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 2).

Normal ve KF'li epitelin *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmaya etkisi: *P. aeruginosa*'nın biyofilm



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın normal ve kistik fibrozlu (KF'li) bronşiyal ve trakeal epitel hücrelerine adezyonu.

*KF'li bronşiyal epitele adezyonun, normal bronşiyal hücrelere kıyasla anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (*p*<0.05).

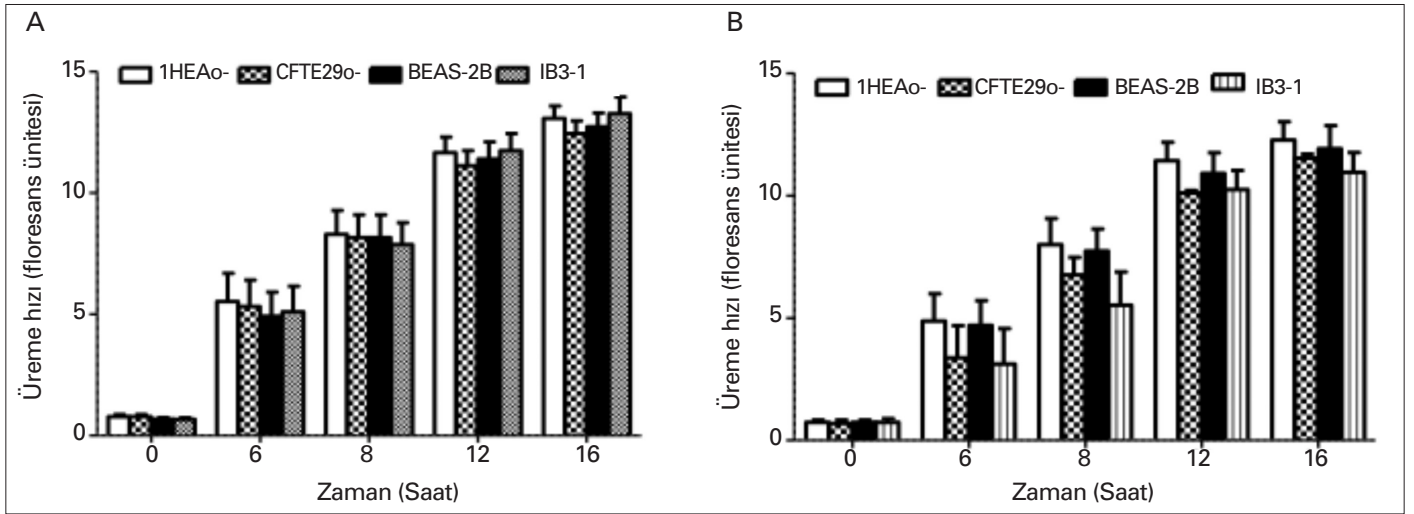


Resim 1. Normal (BEAS-2B ve 1HAEo-) ve kistik fibrozlu (KF'li) (IB3-1 ve CFTE 29o-) epitel hücreleriyle 24 saat inkübasyon sonrası *Pseudomonas aeruginosa*'nın floresan mikroskopideki görüntüsü. KF'li bronşiyal (IB3-1) hücrelerle olan inkübasyonunda uzamış ve genişlemiş çomak şekli görülmüştür.

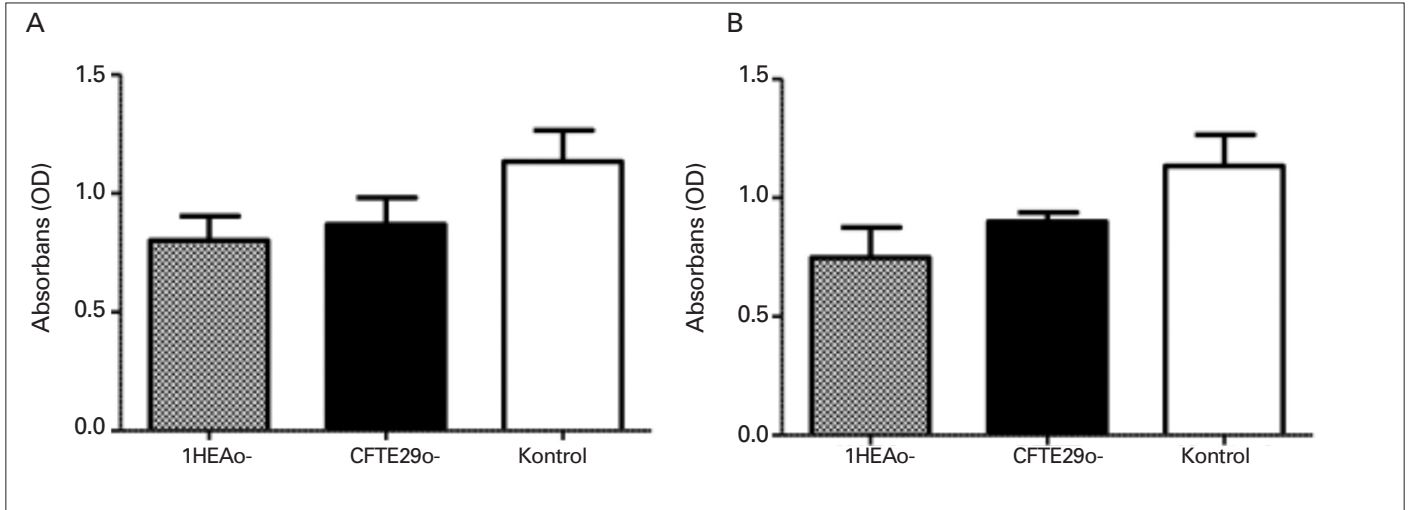
oluşturması üzerine, normal (1HAEo-) ve KF'li (CFTE29o-) trakeal hücrelerin etkisi Şekil 3'te; normal (BEAS-2B) ve KF'li (IB3-1) bronşiyal hücrelerin etkisi ise Şekil 4'te gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın KF'li hücrelerle inkübasyonu sonrasında biyofilm oluşturmaya, normal bronşiyal hücrelerle (*p*<0.001) ve besiyeri kontrolüyle karşılaştırıldığında (*p*<0.05) anlamlı miktarda artış göstermiştir.

İrdeleme

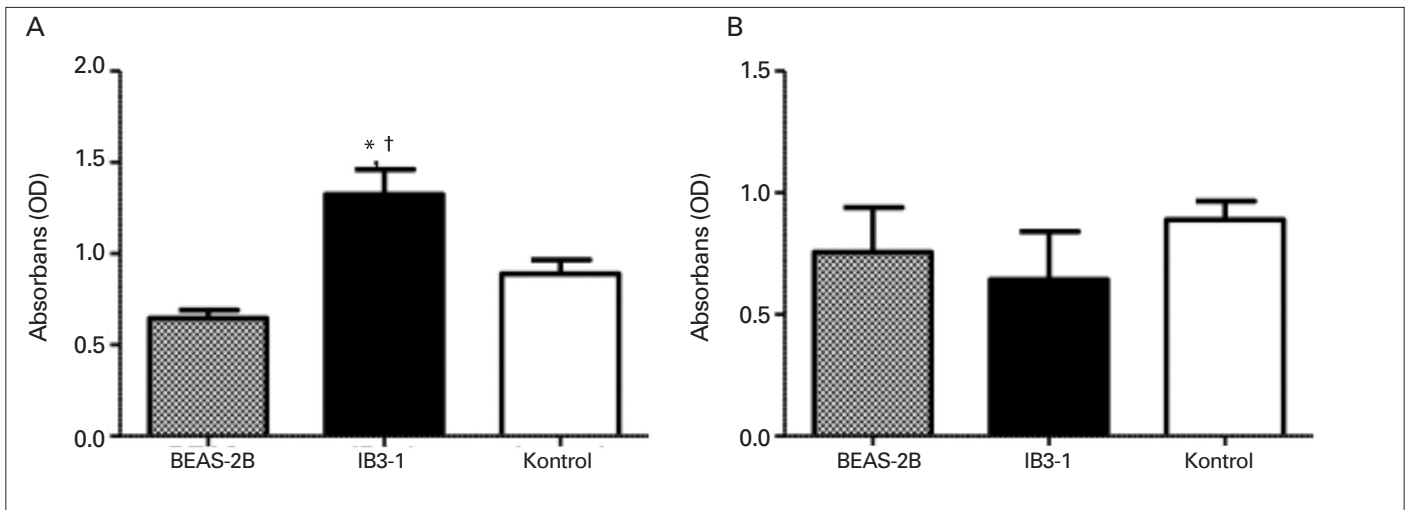
P. aeruginosa solunum yollarında yaygın bulunan bir bakteri olarak düşünülse de, KF'li hastaların yaşamlarını tehdit



Şekil 2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın normal (BEAS-2B) ve kistik fibrozlu (KF'li) (IB3-1) bronşiyal ve normal (1HEAo-) ve KF'li (CFTE29o-) trakeal hücrelerle (A) ve hücrelerin süpernatantlarıyla (B) üreme hızı.



Şekil 3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın normal (1HEAo-) ve kistik fibrozlu (CFTE29o-) trakeal hücrelerle (A) ve hücrelerin süpernatantlarıyla (B) inkübasyon sonrası biyofilm oluşturması.



Şekil 4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın normal (BEAS-2B) ve kistik fibrozlu (KF'li) (IB3-1) bronşiyal hücrelerle (A) ve hücrelerin süpernatantlarıyla (B) inkübasyon sonrası biyofilm oluşturması. KF'li hücrelerle inkübasyon sonrasında *normal bronşiyal hücrelerle ve †besiyeri kontrolüyle karşılaştırıldığında biyofilm oluşumunun anlamlı olarak arttığı görülüyor ($p < 0.05$).

eden infeksiyonlara yol açmaktadır (20). Klinik çalışmalarda, KF'li hastaların kronik akciğer infeksiyonu sırasında, başlangıçta infeksiyon oluşturan *P. aeruginosa* suşlarının, KF'li akciğere adapte olarak, mikro-evrimle geçirdikleri genetik ve fenotipik değişimi sonucunda, motilite kaybı, mukoid yapı kazanma, antibiyotik direnci ve virülans genlerinde işlev kaybı gibi farklılaşmalar gösterdiği bildirilmiştir (22-25).

Çalışmamızda, *P. aeruginosa*'nın üreme hızı, normal ve KF'li trakeal ve bronşiyal hücrelerle veya süpernatantlarıyla etkilenmemiştir. *P. aeruginosa*'nın KF'li bronşiyal epitel hücrelerine adezyonu, normal bronş epiteline adezyonundan daha az iken; normal ve KF'li trakeal hücreler arasında adezyon yönünden herhangi bir fark saptanmamıştır. Biyofilm oluşumu, normal hücrelere oranla, yalnızca bronşiyal KF'li hücrelerde daha yüksekken, her iki hücre süpernatantlarında bir fark saptanmamıştır. Buna ek olarak, *P. aeruginosa*'nın KF'li bronşiyal hücrelerle inkübasyonu sonrasında, yapısında değişme ve uzama görünürken; biyofilm sonuçlarına benzer bir şekilde, diğer hücrelerle veya süpernatantlarıyla karşılaştırıldığında, herhangi bir yapı değişikliği görülmemiştir. Elde ettiğimiz adezyonda azalma, hücre morfolojisinde değişme ve biyofilm oluşumunda artma gibi bulgular, KF'li bronşiyal hücrelerde hücre yüzey değişiklikleri sonucu oluşan birtakım faktörlerin, *P. aeruginosa*'da fenotipik değişikliklere neden olduğunu ve ancak bu faktörlerin çözünür olmadığını düşündürmektedir.

Sodyum absorpsiyonu sırasında, su submukozaya çekilerek solunum yollarında dehidratasyon oluşmaktadır. Ayrıca, bu değişiklikler sekresyonun sülfat ve fukoz konsantrasyonlarının artışına da destek olmaktadır. Anormal glikoproteinler içeren münin salgısının viskoelastik yapısının bozulması ve ekzokrin kanalların mukusla tıkanmış olması nedeniyle mukosilyer disfonksiyon gelişmektedir. Hücre yüzeyinin mukus kompozisyonundaki değişiklikler, KF hastalarında solunum sisteminin patojenlerle kolonizasyonunu etkileyebilmektedir (26).

GalNAc1-4Gal, çeşitli asiyalillenmiş glikolipidler içinde bulunan bir disakariddir ve hem piluslar hem de flagellumlar için reseptör olarak tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan asiyalo-GM1, KF'li solunum yolu epitel hücrelerinin yüzeyi üzerinde bol miktarda bulunmaktadır (27-29). Bazı çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın normal hücrelere göre, KF'li hücrelere daha fazla adezyon gösterdiği bildirilirken (27), bazı çalışmalarda tam aksine adezyonun azaldığı bildirilmiştir (30). Bu, KF'li epitel hücreesindeki anormal fonksiyon veya siyaliltransferaz enzimlerinin dağılımıyla ilişkili olabilmekte ve KFTR gen aktarımıyla kısmen düzeltilebilmektedir (30). Bazı araştırmacılar KFTR'nin *P. aeruginosa* lipopolisakaridi için bir reseptör olduğunu ileri sürmüştür. *In vitro* verilere göre *P. aeruginosa* KFTR'den yoksun akciğer epitel hücrelerine normal epitel hücrelerine göre daha az adezyon göstermektedir (31,32). Dahası, *P. aeruginosa*'nın farklı hücrelere adezyon kabiliyetini, glikolipidlerden siyalik asidi parçalayan bir enzim olan nöraminidaz üretmesi de etkilemektedir (27). KF'li hücrelerindeki siyalilasyonun farklılıkları, bakterinin epitele olan adezyonunu etkileyebilmektedir.

KF infeksiyonlarında biyofilmin rolü üzerine olan artan ilgiye rağmen, farklı türlere ait biyofilmlerin türler arası etkileşimleri halen anlaşılabilmiştir (33). Biyofilm oluşumu, KF ve diğer solunum yolları hastalıklarında kronik infeksiyonla-

rın ilerlemesine katkıda bulunan önemli bir bakteriyel virülans özelliği olarak ele alınmakta ve giderek daha fazla tanınmaktadır. Biyofilm oluşumunun bakterileri, doğal bağışıklık savunmalarından korumasının yanı sıra, çeşitli antibiyotik bileşiklerin etkilerinden de koruduğu düşünülmektedir (34). KF hastalarının balgamlarından izole edilen *P. aeruginosa*'nın *in vivo* biyofilm oluşturmalarının, bakterinin antibiyotik direncinde 1000 katlık bir artış ve konak savunma faktörlerinden kaçınma yetenekleri gibi morfolojik ve fizyolojik özelliklere katkı sağladığı düşünülmektedir (35-38).

P. aeruginosa, terminal elektron alıcısı olarak nitrat (NO_3^-) veya nitrit (NO_2^-) kullanarak, anaerop koşullar altında bile yeterli enerjiyi üretebilmektedir (39,40). KF'li hastaların solunum yollarındaki anormallikler sonucu oksijen potansiyelinin oldukça düşük olması (12) ve hastanın solunum yollarında büyük miktarda NO_3^- ve NO_2^- bulunması (41,42) kronik *P. aeruginosa* infeksiyonuna aşırı duyarlılığının önemli nedenlerindedir. Anaerop koşullar altında üreyen, *P. aeruginosa* PAO1 suşları antibiyotik tedavisine daha dirençli hale gelmektedir (43). Anaerop solunum sırasında *P. aeruginosa*'da spesifik olarak, pyosyanin (44) ve elastaz (45) üretiminin düşmesi, alginat salgısının artması (12), nitrik oksid (NO) üretimi (40,46,47) ve biyofilm oluşumunun artması (48,49) ortaya çıkmaktadır. Kronik anaerop infeksiyonu bulunan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatları, *lasR* geninde mutasyona sahip ve kolonize KF hastalarından veya KF'nin olmadığı pediyatrik hastalardan daha az elastaz aktivitesine sahiptir (50,51).

Normal *P. aeruginosa* PAO1 suşları anaerop solunum esnasında uzamış oldukları ve uzama kusurlu mutantların çok zayıf biyofilm oluşturdıkları gösterilmiştir. Hücrenin uzama (veya filamantasyon) göstermesinin, yüksek üreme sıcaklığında (52) ve belirli antibiyotiklerin (53) ve UV ışınlarının varlığında meydana geldiği bildirilmiştir (54). Hücrenin uzaması, mikroorganizmanın NO cevabına yanıt olarak da gelişebilmektedir. Yapılan çalışmalar, anaerop ortamda üreyen *P. aeruginosa*'nın, aerop koşullarda üreyen bakterilere kıyasla, belirgin bir şekilde biyofilm oluşturduğunu ve bu biyofilm yapının aerop koşullarda ürettiği biyofilmden daha dayanıklı olduğunu göstermiştir (48,49). Bu gözlemin klinik öneminin olabileceği; kronik KF hastalarının solunum yolunun, anormal derecede kalınlaştığı ve viskoz mukusun hava yolu epitelinin üstünü kapladığı için anaerop ortamın oluştuğu öne sürülmüştür (12).

Tüm bu bulgular, KF'li epitelin *P. aeruginosa* suşları için fenotipik seçiciliği olmadığını, ancak KF'li epitelin epitel yüzey belirleyicilerindeki yapısal değişikliklerle genetik farklılıkların indüklenmesinin, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmada ve KF'li bronşiyal epitele adezyonunda önemli etkileri olduğunu desteklemektedir. Sonuç olarak, bulgularımız, KF'li epiteldeki değişikliklerin bakterinin fenotipik özelliklerini doğrudan etkileyebileceğini; bu fenotipik değişikliklerin infeksiyonların tedavisindeki başarısızlığının ana belirleyicisi olabileceğini desteklemektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi iç araştırma projesi (BAP TPF-09018) olarak desteklenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunu sağlayan Dr. Erik P. Lillehoj (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MA, ABD)'a verdiği bu destekten dolayı teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

- Guggino WB. Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. *Nat Med.* 2001; 7(8): 888-9. [\[CrossRef\]](#)
- Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 2002; 109(5): 571-7. [\[CrossRef\]](#)
- Matsui H, Grubb BR, Tarran R, *et al.* Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell.* 1998; 95(7): 1005-15. [\[CrossRef\]](#)
- Kiper N, Yalçın E. Kistik fibrozis. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi.* 2003; 12(4): 131-3.
- Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature.* 2006; 440(7083): 477-83. [\[CrossRef\]](#)
- Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol.* 2001; 118(2): 223-36. [\[CrossRef\]](#)
- Barasch J, Al-Awqati Q. Chloride channels, Golgi pH and cystic fibrosis. *Trends Cell Biol.* 1992; 2(2): 35-7. [\[CrossRef\]](#)
- Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature.* 1991; 352(6330): 70-3. [\[CrossRef\]](#)
- Carter SR, Slomiany A, Gwozdziński K, Liao YH, Slomiany BL. Enzymatic sulfation of mucus glycoprotein in gastric mucosa. Effect of ethanol. *J Biol Chem.* 1988; 263(24): 11977-84.
- Prieels JP, Beyers T, Hill RL. Human milk fucosyltransferases [proceedings]. *Biochem Soc Trans.* 1977; 5(4): 838-9. [\[CrossRef\]](#)
- Takahashi K, Ikehara Y, Ogawa M, Kato K. Characterization of glycosyltransferases in the Golgi complex from rat ascites hepatoma AH-130 cells: a comparison with those from normal liver. *J Biochem.* 1982; 92(3): 737-48. [\[CrossRef\]](#)
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, *et al.* Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.* 2002; 109(3): 317-25. [\[CrossRef\]](#)
- Kownatzki R, Tümmler B, Döring G. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet.* 1987; 1(8540): 1026-7. [\[CrossRef\]](#)
- Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(17): 6664-8. [\[CrossRef\]](#)
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9): 881-90. [\[CrossRef\]](#)
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(2): 95-108. [\[CrossRef\]](#)
- Gray ED, Peters G, Versteegen M, Regelmann WE. Effect of extracellular slime substance from *Staphylococcus epidermidis* on the human cellular immune response. *Lancet.* 1984; 1(8373): 365-7. [\[CrossRef\]](#)
- Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(4): 939-41. [\[CrossRef\]](#)
- An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43(3): 338-48. [\[CrossRef\]](#)
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 194-222. [\[CrossRef\]](#)
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2004 [Internet]. Bethesda, MA: Cystic Fibrosis Foundation [erişim 4 Ocak 2018]. <http://www.muco-ucl.be/documents/pdf/E157.pdf>.
- Bianconi I, Milani A, Cigana C, *et al.* Positive signature-tagged mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa*: tracking patho-adaptive mutations promoting airways chronic infection. *PLoS Pathog.* 2011; 7(2): e1001270.
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10(12): 841-51. [\[CrossRef\]](#)
- Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology.* 2007; 153(Pt 4): 917-23.
- Lorè NI, Cigana C, De Fino I, *et al.* Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35648.
- Smith A. Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16(1): 91-5; discussion 5-6, 123-6.
- Saiman L, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest.* 1993; 92(4): 1875-80. [\[CrossRef\]](#)
- Emam A, Yu AR, Park HJ, *et al.* Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids in vitro or during type IV pili-mediated initial host cell attachment. *Microbiology.* 2006; 152(Pt 9): 2789-99.
- Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(7): 3019-23. [\[CrossRef\]](#)
- Davies JC, Stern M, Dewar A, *et al.* CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 16(6): 657-63. [\[CrossRef\]](#)
- Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(16): 8822-8. [\[CrossRef\]](#)
- Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, *et al.* CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(10): 6907-12. [\[CrossRef\]](#)
- Yang L, Liu Y, Markussen T, Hoiby N, Tolker-Nielsen T, Molin S. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 62(3): 339-47. [\[CrossRef\]](#)
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 677-701. [\[CrossRef\]](#)
- Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1980; 28(2): 546-56.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 2000; 407(6805): 762-4. [\[CrossRef\]](#)
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 27(4): 619-24. [\[CrossRef\]](#)
- Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, *et al.* Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol.* 2003; 171(8): 4329-39. [\[CrossRef\]](#)
- Van Alst NE, Wellington M, Clark VL, Haidaris CG, Iglewski BH. Nitrite reductase NirS is required for type III secretion system expression and virulence in the human monocyte cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2009; 77(10): 4446-54. [\[CrossRef\]](#)

40. Yoon SS, Karabulut AC, Lipscomb JD, *et al.* Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *EMBO J.* 2007; 26(15): 3662-72. [\[CrossRef\]](#)
41. Jones KL, Hegab AH, Hillman BC, *et al.* Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum. *Pediatr Pulmonol.* 2000; 30(2): 79-85. [\[CrossRef\]](#)
42. Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax.* 2005; 60(1): 22-6. [\[CrossRef\]](#)
43. Hill D, Rose B, Pajkos A, *et al.* Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 5085-90. [\[CrossRef\]](#)
44. Hassett DJ, Schweizer HP, Ohman DE. *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J Bacteriol.* 1995; 177(22): 6330-7. [\[CrossRef\]](#)
45. Acosta D, Adelman J, Affolder T, *et al.* Search for new physics using high-mass tau pairs from 1.96 TeV pp collisions. *Phys Rev Lett.* 2005; 95(13): 131801. [\[CrossRef\]](#)
46. Acosta D, Adelman J, Affolder T, *et al.* Measurement of bottom-quark hadron masses in exclusive J/psi decays with the CDF detector. *Phys Rev Lett.* 2006; 96(20): 202001. [\[CrossRef\]](#)
47. Hoffman LR, Richardson AR, Houston LS, *et al.* Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway. *PLoS Pathog.* 2010; 6(1): e1000712.
48. O'May CY, Reid DW, Kirov SM. Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48(3): 373-80. [\[CrossRef\]](#)
49. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell.* 2002; 3(4): 593-603. [\[CrossRef\]](#)
50. Jagger KS, Bahner DR, Warren RL. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1983; 17(1): 55-9.
51. Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros.* 2009; 8(1): 66-70. [\[CrossRef\]](#)
52. Bhatti AR, DeVoe IW, Ingram JM. Cell division in *Pseudomonas aeruginosa*: participation of alkaline phosphatase. *J Bacteriol.* 1976; 126(1): 400-9.
53. Rolinson GN. Effect of beta-lactam antibiotics on bacterial cell growth rate. *J Gen Microbiol.* 1980; 120(2): 317-23.
54. Burton P, Holland IB. Two pathways of division inhibition in UV-irradiated *E. coli*. *Mol Gen Genet.* 1983; 190(1): 128-32. [\[CrossRef\]](#)