Türk Mikrobiyol Cem Derg (2010) 40 (3): 175 - 182
© 1993 Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti / Turkish Microbiyological Society
ISSN 0258-2171

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

*İntranazal ve İntraperitoneal Uygulanan *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Vahşi tip ve Mutant kökenlerin Akciğer Histopatolojisindeki Etkileri

The Effects of Intranasally and Intraperitoneally Administered Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing Wild-type and Mutant Strains on Lung Histopathology

Meral Kahraman[1], Müge Kiray[2], Alper Bağrıyanık[2], Hakkı Bahar[3]

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi [1]Multidisipliner Laboratuvarı, [2]Histoloji ve Embriyoloji ve [3]Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalları İzmir

*Bu araştırma XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur. (7-11 Kasım 2011, Girne-Kıbrıs)

ÖZET

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezinde Quorum Sensing (QS) olarak bilinen hücreden hücreye sinyal iletim sistemi önemli bir yere sahiptir. P. aeruginosa'da birbiri ile ilişkili las, rhl ve kinolon olmak üzere üç QS sistemi tanımlanmıştır. Deneysel hayvan modelleri QS sisteminin etkilerini incelemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sıçanlarda iki farklı yol ile oluşturulan enfeksiyon modelinde P. aeruginosa QS sisteminin akciğer histopatolojisindeki etkileri değerlendirilmiştir*

Gereç ve Yöntem: *P. aeruginosa PAO1 (QS wild type) ve PAO JP2 (QS mutant; ΔlasI/ΔrhlI) referans laboratuvar suşları, 230-280 gr ağırlığında Wistar albino soyu sıçanlara intranazal (n=21) ve intraperitoneal (n=21) yol ile uygulanmıştır. 24 saat sonra hayatları sonlandırılan sıçanların akciğer dokularında; kapiller konjesyon, hemoraji, polimorf çekirdekli hücre infiltrasyonu ve alveoler septumda kalınlaşma kriterleri açısından hasar skorlaması yapılmıştır.*

Bulgular: *Bakterilerin uygulanmasından 24 saat sonra akciğerlerde makroskobik ve mikroskobik düzeyde hasar oluştuğu gözlenmiştir. Her iki uygulama yolu ile de, PAO1 grubunda akciğer hasarının, kontrol ve PAO JP2 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. PAO JP2 suşunun, intranazal yol ile uygulandığında intraperitoneal uygulamaya göre daha fazla akciğer hasarına neden olduğu saptanmıştır.*

Sonuç: *Bakterinin intranazal ve intraperitoneal verilmesi ile oluşturulan akciğer enfeksiyonu modeli oldukça basit bir yöntemdir. Bu yöntem, QS sisteminin yanı sıra çeşitli virülans faktörlerinin etkilerini incelemede de yararlıdır. QS sistemi, akciğer hasarı oluşturmada her iki uygulama yolunda da belirgin rol oynamakla birlikte, QS mutant suşların da hasar oluşturması patogenezde farklı mekanizmaların varlığını düşündürmektedir.*

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa, çoğunluğu algılama, akciğer histopatolojisi*

SUMMARY

Objective: *In the pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections, cell to cell signal transmission system, known as Quorum Sensing (QS), has an important role. Three interrelated QS systems are defined in P. aeruginosa, namely las, rhl and quinolone. Experimental animal models are widely used in examining the effects of QS system. In this study, the effects of P. aeruginosa QS system on lung histopathology were assessed by two different rat infection model.*

Materials and Methods: *P. aeruginosa PAO1 (QS wild type) and PAO JP2 (QS mutant; ΔlasI/ΔrhlI) reference laboratory strains were administered to Wistar albino rats, weighing 230-280 gr, by intranasal (n=21) and intraperitoneal (n=21) routes. Rats were executed after 24 hours and lung tissue samples of rats were investigated for capillary congestion, hemorrhage, infiltration of polymorphonuclear cells and alveolar septum thickening, in terms of damage scoring.*

Results: *Macroscopic and microscopic damages were observed 24 hours after the administration of bacteria. Lung damage observed in the PAO1 group was significantly higher than the control and PAO JP2 groups for both of the administration routes. PAO JP2 was determined to cause more pulmonary damage in the infection model induced by intranasal administration compared to the intraperitoneal administration.*

Conclusion: *Experimental lung infection model, induced by intranasal and intraperitoneal administration of bacteria, is a very simple method to apply. It would be useful in examining the effects of various virulence factors, as well as QS system. Although QS system has a significant role in the pathogenesis of the lung damage induced by the two application methods, damage caused by QS mutant strains suggests that different mechanisms that funtion in pathogenesis should be further addressed.*

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa, quorum sensing, pulmonary histopathology*

GİRİŞ

Fırsatçı bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* ürettiği çeşitli virülans faktörleri ve sürekli artan antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek bir enfeksiyöz ajandır (1,2).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezinde, bakteriyel popülasyonlara kendi hücre yoğunluklarını algılayarak çevresel koşullara göre davranış sergileme imkanı veren ve "Quorum Sensing"(QS) olarak adlandırılan sistem anahtar rol oynamaktadır. Vibrio, Agrobacterium, Erwinia ve Yersinia gibi birçok bakteri türünde de bulunan bu mekanizmayla bakteriler bulundukları ortamda birbirleriyle iletişim kurabilmekte, çevresel koşulları algılayabilmekte ve konakta enfeksiyon oluşturabilecek gerekli hücre yoğunluğuna ulaşıncaya kadar immun sistem tarafından fark edilmeden yaşamını sürdürebilmektedir (3,4).

P. aeruginosa'da birbiri ile ilişkili las, *rhl* ve kinolon (*Pseudomonas* quinolone signal; PQS) olmak üzere üç QS sistemi tanımlanmıştır (5,6). Bunlardan *las* sistemi; sinyal molekülü olarak uzun zincirli AHL'yi (3-oxo-C12-HSL-L) kullanarak biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotoksin A gibi diğer hücre dışı virülans faktörlerinin üretimini kontrol etmektedir (7). Sinyal molekülü olarak kısa zincirli AHL'yi (C4-HSL) kullanan ve *rhl* AB operonunun yapımını kontrol eden *rhl* sistemi ise, ramnolipid üretimi için gerekli olan "rhamnosyl transferase" enziminin sentezlemesini ve Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyanin, siyanid ve alkalen proteazın üretimini düzenlemektedir (8,9). PQS molekülünün üretimi *lasR* sistemi tarafından kontrol edilmektedir ve ekzojen PQS, elastaz B'nin ve RhlI'nin ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarmaktadır (6). Bu üç sistem

arasında *las* sistemi anahtar rol oynamakta ve diğerleri las ile hiyerarşik bir işleyiş içinde bulunmaktadır. *las* QS sistemi, *rhl* QS sistemini kontrol etmekte aynı zamanda *lasR* QS, PQS üretimini düzenlemektedir. PQS ise *rhlI* ve *rhlR* ekspresyonunu artırdığından PQS etkinliği *las* ve *rhl* QS sistemleri arasında düzenleyici bağlantı rolü oynamaktadır (10,11).

Kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında bakteri biyotik ve/veya abiyotik bir yüzeye tutunduğunda konak hücre yanıtından kaçmak ve değişen çevre şartlarında canlı kalmak için biyofilm (ekzopolisakkarid ile çevrili mikrokoloniler) içerisinde yaşamını sürdürmektedir. Biyofilm içerisinde üreyen bakteriler, planktonik olarak üreyenlere göre antibiyotiklere daha dirençlidir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu QS sisteminin kontrolündeki sinyallerle düzenlenmektedir (12,13). Benzer şekilde QS sistemi tarafından düzenlenen elastaz ve ramnolipid üretiminin, özellikle pulmoner enfeksiyonların gelişmesinde ve mikroorganizmanın yayılmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (14). *P. aerugiosa* enfeksiyonlarında QS sistemi ve bu sistemin kontrolü altındaki virülans faktörlerinin etkilerinin anlaşılmasında, QS vahşi tip ve QS sisteminin sinyal molekülü üreten genleri mutasyona uğratılmış suşlarla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar oldukça değerli bilgiler sunmaktadır. *P. aeruginosa*'nın patojenitesinde QS sisteminin önemi gerek farklı hücre dizilerini içeren ex-vivo modeller, gerekse deneysel hayvan modellerinin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (15-18). Deneysel hayvan modelleri arasında ise akciğer enfeksiyonu modeli ön plana çıkmaktadır. *P. aeruginosa* kaynaklı deneysel akciğer enfeksiyonu modelinin oluşturulmasında, agar içine emdirilmiş bakteri süspansiyonlarının trakeaya inokule edilmesi oldukça kabul görmüş bir modeldir. Bu modelde agar içine *P. aeruginosa*'nın emdirilmesi ile biyofilm oluşumunu taklit etmek, bakterinin hava yollarında varlığını sürdürmesine ve kronik akciğer enfeksiyonu başlatmasına zemin hazırlamak amaçlanmaktadır (19). Ancak bu modelde hayvanlarda mekanik tıkanıklığa bağlı olarak yüksek oranda ölümlerin görülmesi ve modelin el becerisi gerektirmesi uygulamayı kısıtlamaktadır. Bakterinin sistemik yollarla verilmesi sonucunda da akciğer enfeksiyonu modeli oluşturulabildiği gösterilmiştir. İntranazal ya da intratrakeal yol ile bakteri süspansiyonunun verilmesi bu yöntemler arasındadır. Çalışmamızda, *P. aeruginosa* QS vahşi tip ve QS mutant suşların intranazal uygulaması ile gerçekleştirilen akciğer enfeksiyonu ve intraperitoneal uygulaması ile gerçekleştirilen sepsis modellerinde QS sisteminin akciğer histopatolojisindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada konvansiyonel şartlarda yetiştirilmiş, 230-280 gram ağırlığında Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmış ve çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayı (HADYEK NO:32/2010) ile etik kurallara uygun olarak yürütülmüştür.

Deneysel enfeksiyon modeli: Çalışmada enfeksiyon modelleri için *P. aeruginosa* PAO1 (QS Wild Type) ve PAO JP2 (QS mutant; *ΔlasI*/*ΔrhlI*) referans laboratuvar suşları kullanılmıştır. Her bir uygulama yönteminde 21 tane olmak üzere toplam 42 sıçan kullanılmış olup, gruplar PAO1 (WT) (n=7), PAO JP2 (*ΔlasI*/*ΔrhlI*) (n=7) ve kontrol (n=7) olarak düzenlenmiştir.

İntranazal uygulama ile akciğer enfeksiyonu modeli için; bakteriler Luria Bertoni (LB) (Conda, İspanya) agarda 37°C'da bir gece inkübe edildikten sonra LB sıvı besiyerinde 660 nm'de

optik dansitesi bir olacak şekilde ayarlanıp 37°C'da bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün, steril fosfat tampon ile 660 nm'de optik dansitesi 0.5 olacak şekilde ayarlanan bakteri süspansiyonundan 20µl sıçanların her iki burun deliğinden verilmiştir (20).

İntraperitoneal uygulama ile sepsis modeli için, bakteriler LB agarda 37°C'da bir gece inkübe edildikten sonra oluşan koloniler beyin kalp infüzyon sıvı besiyerine (Conda, İspanya) alınmıştır. 37°C'da 16-18 saatlik bekletildikten sonra bu suspansiyon 1000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş, üst faz uzaklaştırılmıştır. Pellet steril serum fizyolojik ile $2x10^{10}$ yoğunluğa getirilmiş, bu süspansiyondan sıçanlara gruplarına göre 0.5 ml intraperitoneal yol ile verilmiştir (17).

Her iki uygulama modellerdeki kontrol gruplarına ise bakterisiz serum fizyolojik verilmiştir.

İnokulasyon sonrası tüm sıçanlar; 21-22°C ısıda, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda, serbest su ve gıda sağlanarak, stres ve gürültüden izole bir şekilde barındırılmıştır. İnokulasyondan 24 saat sonra intraperitoneal yol ile 100 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer) verilerek hayatları sonlandırılan sıçanların akciğer dokuları histopatolojik inceleme için %10 formalin içine alınmıştır.

Histopatolojik İnceleme: Akciğer örnekleri oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit edildikten sonra, artan oranda alkol serilerinden geçirilmiştir. Dokular, şeffaf kılmak amacıyla, üç değişim ksilole tabi tutulduktan sonra parafin içine gömülmüştür. Mikrotom (Leica RM2255) yardımıyla bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama uygulanmış, hazırlanan preparatlar Olympus BX-51 model ışık mikroskobu ve video kameradan (Olympus DP71) oluşan görüntü analiz sistemi (DP Controller Olympus Corp. 3.1.1.267) aracılığıyla bilgisayar ekranında kaydedilmiştir. Histopatolojik değişimler; kapiller konjesyon, hemoraji, polimorf çekirdekli hücre infiltrasyonu ve alveoler septumda kalınlaşma olarak değerlendirilmiştir. Oluşan hasarın derecesi; 0: hasar yok, 1: hafif derecede hasar 2: orta derecede hasar, 3: şiddetli hasar ve 4: maksimal hasar olarak skorlanmıştır (21). Tüm preparatlar farklı iki göz tarafından değerlendirilmiş ve değerlendirmeyi yapan araştırmacılar çalışma grupları konusunda bilgilendirilmemiştir.

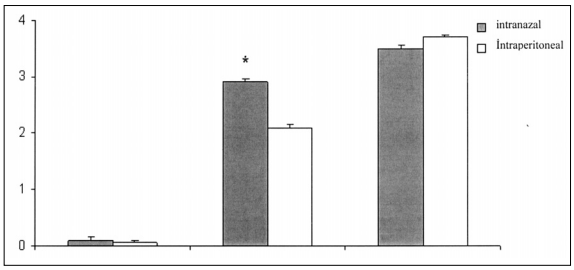
İstatistiksel Analiz: *P. aeruginosa* PAO1, PAO JP2 ve kontrol grupları, ortalama akciğer hasar skor sonuçları açısından karşılaştırılmış, veriler SPSS 15.0 istatistik programında değerlendirilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki fark Mann Whitney testi kullanılarak analiz edilmiş, $p<0.05$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

BULGULAR

Bakteri inokulasyonundan 24 saat sonra, sakrifiye edilen sıçanların göğüs kafesi açıldığında kontrol grubunda makroskobik olarak bir değişiklik gözlenmezken, diğer iki grupta her iki uygulama yönteminde de akciğerde fokal kanama odakları ve apse oluşumları gözlenmiştir. Doku kesitlerinin histopatolojik değerlendirme sonuçları ise makroskobik verileri desteklemiştir.

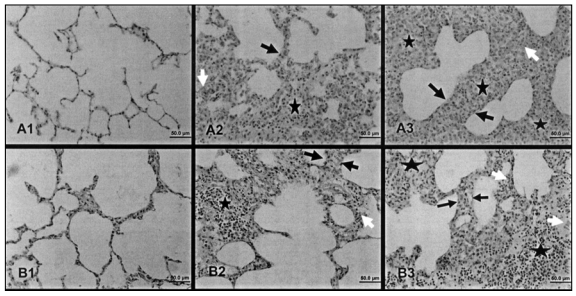
Akciğer dokusundan elde edilen H&E ile boyalı kesitlerdeki değerlendirme sonuçlarına göre; hem PAO1 hem de PAO JP2 suşunun akciğer dokusunda hasara yol açtığı, mutant suşun intranazal yol ile oluşturulan enfeksiyon modelinde yaptığı hasarın intraperitoneal yol ile oluşturulan enfeksiyon modelinden anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (Grafik 1). Intranazal uygulama ile PAO1 grubunda ortalama hasar skoru sonuçları, kontrol ve PAO JP2 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Ortalama hasar skoru kontrol grubunda 0.1 ± 0.06, PAO1 grubunda 3.5 ± 0.14 ve PAO JP2 grubunda 2.9 ± 0.1 olarak belirlenmiştir. Deneysel sepsis modelinde de, PAO1 grubunda ortalama hasar skoru sonuçlarının, kontrol ve PAO JP2 gruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar kontrol grubunda 0.05 ± 0.04, PAO1 grubunda 3.7 ± 0.09 ve PAO JP2 grubunda 2.1 ± 0.12 olarak bulunmuştur (Grafik 1).



Grafik 1. Bakteri uygulama yöntemleri göre suşların akciğerde oluşturdukları hasar skorları
*İntraperitoneal uygulama grubuna göre anlamlı farklılık

Suşların sıçanlara uygulanma yöntemine göre akciğerde oluşturdukları hasarın türüne ve hasar skoruna bakıldığında ise özellikle PAO JP2'nin intranazal uygulama ile akciğer enfeksiyonu modelinde daha fazla hasara neden olduğu, alveolar konjesyon ve septal kalınlaşma yönünden enfeksiyon modelleri arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (Tablo 1).



Resim 1. A: İntranazal uygulama (A1; kontrol, A2; PAO JP2, A3; PAO1)
B: İntraperitoneal uygulama (B1; kontrol, B2; PAO JP2, B3; PAO1)
(★): PMN infiltrasyonu; siyah oklar: septal kalınlaşması; beyaz oklar: hemoraji odaklar

Gruplara ait akciğer doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri Resim 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Son zamanlarda, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında, bakteri, konak ve antibakteriyeller arasındaki etkileşimi açıklamak ve QS sisteminin enfeksiyon patogenezi üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla deneysel hayvan çalışmaları ağırlık kazanmıştır. *P. aeruginosa* QS vahşi tip

Tablo 1. Bakteri uygulama yöntemleri ve değerlendirme kriterlerine göre suşların akciğerde oluşturdukları hasar kriterleri ve skorları

Akciğer Hasar Skoru Kriteri	Deney Grupları	İntranazal Uygulama	İntraperitoneal uygulama	p
Alveolar Konjesyon	Kontrol	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.00
	PAO1 (WT)	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.3	0.421
	PAO JP2	2.8 ± 0.2*	1.6 ± 0.2	0.016
Hemoraji	Kontrol	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.00
	PAO1 (WT)	3.0 ± 0.3	4.0 ±0.0*	0.032
	PAO JP2	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.31
PMN infiltrasyonu	Kontrol	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.69
	PAO1 (WT)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	1.00
	PAO JP2	3.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2	0.095
Septal kalınlaşma	Kontrol	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	1.00
	PAO1 (WT)	3.6 ± 0.4	3.8 ± 0.2	1.00
	PAO JP2	2.8 ± 0.2*	2.0 ± 0.0	0.032

p: Uygulama yolları arasındaki farklılığın anlamlılığı; *p<0.05 anlamlı

ve QS mutant suşlarla yapılan çalışmaların ortak noktası genel olarak hayvan deneylerinde vahşi tip suşların daha virülan olduğu yönündedir (12,18). Deneysel modellemeler arasında ise Cash ve arkadaşları (19) tarafından ilk kez uygulanan, agar içine emdirilmiş bakteri süspansiyonlarının trakeaya yerleştirilmesi ile gerçekleştirilen kronik akciğer enfeksiyonu modeli kabul görmüş bir modeldir. Özellikle bakterilerin önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilm oluşumunun taklit edilmek istenildiği çalışmalarda tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemin uygulamasının tecrübe gerektirmesi ve uygulama sırasında hayvanlarda mekanik tıkanıklığa bağlı olarak yüksek oranda ölümlerin görülmesi yöntemin kullanılabilirliğini etkilemekte, araştırmacıları alternatif enfeksiyon modellerine yönlendirmektedir. Çalışmamızda sıçanlara intranazal ve intraperitoneal uygulama ile *P. aeruginosa* PAO1 (QS WT) ve PAO JP2 (QS mutant; *ΔlasI*/*ΔrhlI*) referans laboratuvar suşları verilmiş, bu uygulamalar sonucunda akciğer dokusundaki histopatolojik değişikliklere QS sisteminin etkisi araştırılmıştır. Enfeksiyon modellerinin oluşturulmasından 24 saat sonra sıçanların göğüs kafesi açıldığında gözlenen fokal kanama ve apse odakları makroskobik olarak akciğer hasarının oluştuğunu göstermiş ve akciğer doku kesitlerinde histopatolojik olarak yapılan hasar skorlaması bu veriyi desteklemiştir. Skorlama için literatürde önerilen; kapiller konjesyon, hemoraji, polimorf çekirdekli hücre infiltrasyonu ve alveoler septumda kalınlaşma kriterleri kantitatif olarak değerlendirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır (21). Analiz sonucunda her iki uygulama yönteminde de, daha önce agar boncuk yöntemini uyguladığımız çalışmamızda saptadığımız (18) histopatolojik değişikliklerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular ışığında akciğer enfeksiyonu modellerinin oluşturulmasında, eğer biyofilm oluşumu taklit edilmek istenmiyorsa uygulaması kolay olan bu iki deneysel modelin, araştırılacak konu da dikkate alınarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak burada dikkat edilmesi gereken bir nokta değerlendirmenin bakteri uygulamasından 24 saat sonra yapılmış olmasıdır. Bu uygulama yöntemlerinde, bakteri doğrudan vücudun savunma sistemi ile karşılaştığından varlığını sürdüremeyebileceği bildirilmektedir (19). Bu konuda, bakteri uygulamasından sonra farklı zaman dilimlerinde hayvanların hayatlarının sonlandırılması ve akciğer hasar skorlarının değerlendirilmesi fikir verebilir.

Çalışmamızda gerek intranazal gerekse intraperitoneal bakteri uygulaması sonucu akciğerde oluşan hasara bakıldığında, literatürle uyumlu olarak vahşi tip suşun hasar skorunun mutant suşa göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun QS mutant suşların bu sistemin kontrolü altındaki virülans faktörlerinden yoksun olması dolayısıyla daha az virülan olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Suşların uygulama yöntemine göre davranışlarına bakıldığında ise; vahşi tip suşun intraperitoneal uygulama yönteminde daha fazla hemorajiye neden olduğu, diğer değerlendirme kriterleri açısından bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Mutant suşun intranazal uygulama yönteminde daha fazla akciğer hasarına neden olduğu, kriterlere tek tek bakıldığında ise akciğer dokusunda alveolar konjesyon ve septal kalınlaşmanın belirgin olarak arttığı görülmüştür. Uygulama yöntemlerine göre oluşan bu farklılığın nedeni "tek hava yolu" prensibi ile açıklanabilir (23). Bu prensibe göre solunum sistemi mukozası birbirinin devamıdır; burundan başlar ve alveollere kadar uzanır. Dolayısıyla intranazal uygulanan suşun intraperitoneale göre hasar skorlarının daha yüksek olması bakterinin doğrudan akciğere ulaşması ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda, QS sistemi mutant köken de, vahşi tip kökene göre daha az olmakla birlikte belirgin bir akciğer hasarı oluşturmuştur. Karatuna ve arkadaşları (24) da *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum sistemi enfeksiyonlarında, QS anahtar rol oynamakla birlikte, QS mutant suşların da antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığının düşük olabildiğini ve bu suşların enfeksiyona neden olabildiklerini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada sıçanlara intranazal ve intraperitoneal yol ile verilen *P. aeruginosa*'nın 24 saat içinde akciğerde makroskobik ve mikroskobik düzeyde hasar oluşturduğu gösterilmiştir. Uygulaması kolay olan bu yöntemler QS sisteminin yanı sıra çeşitli virülans faktörlerinin etkilerini incelemede de yararlı olacaktır. Her iki uygulama yönteminde de akciğer hasarında QS sistemi önemli rol oynamakla birlikte, QS mutant suşların da hasar oluşturması patogenezde farklı yönlerin de olduğunu düşündürmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan referans laboratuvar suşları için Prof Dr Hüseyin Baskın'a teşekkür ederiz.

İletişim / Correspondence
Meral Kahraman
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarı, İzmir
e-mail: meral.karaman@deu.edu.tr

Kaynaklar

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect 2000; 2:1051-60.
2. Crouch BS, Wunderink RG, Jones CB. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 1996; 109:1019-29.
3. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 1994;176:269–75.
4. 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; 362:1119-34.
5. 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; 18:33.
6. McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2000; 182:2702–8.
7. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase production. J Bacteriol 1991; 173:3000–9.
8. Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1994; 176:2044–54.
9. Duan K, Surette MG. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. J Bacteriol 2007; 189:4827-36.
10. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. The *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; 50:29-43.
11. Wilder CN, Diggle SP, Schuster M. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. ISME J 10.1038/ismej.2011.13
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318-22.
13. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2:1-11.

14. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol 1997; 179:5756-67.
15. Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Deneysel mikroçevre modelleme çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*'nın farklı hücre dizilerinde çoğunluğu algılama ve biyofilm yanıtları. Turkiye Klinikleri 2009; 29:637-42.
16. Tang HB, DiMango E, Bryan R et al. Contribution of specific *P. aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. Infect Immun 1996; 64:37-43.
17. Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F et al. Efficacy of colistin/rifampin combination in experimental rat models of sepsis due to a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. Crit Care Med 2007; 35:1717-23.
18. Karaman M, Yılmaz O, Bayrakal V, Bahar İH. Gentamisin ve imipenem etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: in vivo modelleme. ANKEM Derg 2010; 24:76-81.
19. Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG, Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am Rev Respir Dis 1979; 119: 453–9.
20. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. J Bacteriol 2002; 184:1132-9.
21. Jerng JS, Hsu YC, Wu HD et al. Role of the renin-angiotensin system in ventilator-induced lung injury: an in vivo study in a rat model. Thorax 2007;62:527–35.
22. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *P. aeruginosa*. J Bacteriol 1997; 179:3127–32.
23. Volcheck GW. Does rhinitis lead to asthma? Evidence for the one-airway hypothesis. Postgrad Med 2004; 115:65-8.
24. Karatuna O, Yağcı A. Analysis of the quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1770-5.