

YABANCI CİSİMLERDE BİYOFİLM GELİŞİMİ ENGELLENEBİLİR Mİ? BİR MULTİDİSİPLİNER ARAŞTIRMA GRUBU MODELİ*

Canan AĞALAR

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE
agalar@yahoo.com

ÖZET

Mikroorganizmaları ortamdaki olumsuz koşullardan koruyan bir büyüme biçimi olan biyofilm gelişimi bir çok infeksiyon patogeneğinde önemli rol oynar. Günümüz tedavi metodları arasında yabancı cisim kullanımı yer aldığı sürece önemi giderek artacaktır. Biyofilmin önlenmesinde patolojik mekanizmalar ve olayın diğer yönlerinin anlaşılmasındaki gelişmelere rağmen, gelinen noktanın yeterli olmadığı açıktır. Günümüz tıp biliminde biyofilm ilişkili infeksiyonların önlenmesi çok önem arz etmektedir.

Anahtar sözcükler: *aderans, biyofilm, yabancı cisim infeksiyonu*

SUMMARY

Can Biofilm Formation on Foreign Bodies be Preventable? A Multidisciplinary Resarch Group Model

Biofilm formation, which is a different form of defensive growth of bacteria, is an important protection mechanism of most of the microorganisms. It plays an important role in the pathogenesis of foreign body infections. The problem will certainly increase with more liberal use of foreign bodies. Despite recent advances in understanding the pathologic mechanisms and other consequences and developments in the prevention of biofilm formation, more research endeavor are needed. The prevention of biofilm related infections is vital in today's medical science.

Keywords: *adherans, biofilm, foreign body infection*

Biyofilm korunmalı bir çoğalma biçimidir. Korunma değişen çevre koşullarına (pH, hipoksi, besin), dezenfektanlara, antibiyotiklere ya da konak savunma mekanizmalarına karşı sağlanır. Biyofilm üç basamakta gerçekleşir.

1. Tutunma (adezyon),
2. Formasyon (intersellüler adezyon, çok tabakalı hücre salkımları, slaym (slime glikokaliksi) biyofilm oluşumu,
3. Süreklilik.

Ekstrasellüler kolonizasyon ve bakteri internalizasyonu için aderans gereklidir. Adezin: adezyonda rol alan mikroorganizmaya ait protein yapısındaki moleküllerin genel adıdır. Adezin Gram negatif bakterilerin yüzeyinde bulunan ve bakterinin konak dokusuna yapışmasını sağlayan fimbrial yapıda olabildiği gibi nonfimbrial de olabilir. Nonfimbrial olanlar bağlı veya ser-

best adezinler (bilinmeyen bir mekanizma ile salınır ve bakteri yüzeyine yeniden tutunarak aktif-fonksiyonel protein haline dönerler) halinde olabilirler. Yabancı cisim yüzey özellikleri önemlidir. Plastik yapıda yabancı cisimlerde primer adezyon saniyeler içinde olur, spesifik değildir, fizikokimyasal olaylar etkilidir. Ancak olayın gelişmesinde diğer önemli bir unsur da bakteriyel esas unsurlardır. Bunlar: hidrofobisite, lipoteikoik asit ile ilişkili olarak yüzey elektrik yükü, yüzey proteinlerine bağlanmada azalma ve fimbria benzeri polimerler olarak sayılabilir⁽¹⁾.

Konak proteinleri ile kaplı materyale tutunma daha kolaydır. Çünkü, yüzey düzensizliği gelişir ve konak kökenli maddelerle (fibronektin, kollojen, laminin, vitronektin, fibrinojen, fibrin trombusü, aktive trombositler) bazı prote-

*26. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Kahvaltılı Oturum-4 sunumundan (18-22 Mayıs 2011, Kızılbaş/Manavgat)

inler (fibrinojen bağlayan protein, peptidoglikan bağlayan bazı yüzey proteinleri, nonkovalan bağlı yüzey proteinleri) bağlanma sürecini hızlandırır. Slaym denilen yapının kompozisyonunu teikoik asit, bakteriyel proteinler, konak proteinleri, PIA (Polisakkarit İntersellüler Adezin) oluşturur. Biyofilmde sürekliliğin sağlanması bakterinin varlığı açısından önem taşır. Yabancı cisim üzerindeki bakteri sayısının azalmamasına bazı yollarla neden olur. Yabancı cisim üzerinde kemotaktik indeks düşüktür, fagositoz engellenir, hücrenin oksijen kullanımını azaltır⁽²⁵⁾.

Biyofilm gelişiminin ortaya konması ve özelliklerinin açığa çıkarılması, birçok hastalığın patogenezinin ve buna bağlı olarak tedavi yöntemlerindeki başarısızlıkların anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Biyofilm formasyonunun önemli olduğu hastalıklar arasında, cerrahi implant infeksiyonları, kronik yaralar, gastrik ülser (*Helicobacter pylori*), kistik fibrosis (*Pseudomonas aeruginosa*), kronik otitis media, tekrarlayan üriner sistem infeksiyonları sayılabilir.

Bakterilerin hastalık yapabilme özelliklerini düzenleyen önemli bir süreç vardır. Bu süreç "Quorum sensing, QS" (yeterli çoğunluk algılaması) olarak isimlendirilmektedir. Yeterli çoğunluk algılaması, bakteriler arasında iletişimi sağlayan ve virülans faktörlerini düzenleyen kimyasal sinyalizasyon sistemidir. Sinyal molekülleri küçük ve diffüze olabilme özelliğindedir⁽¹³⁾. İlk olarak deniz biyologlarının *Vibrio fischeri* isimli organizmanın belli bir çoğunluğa ulaştığında ışığa özelliği kazanmasıyla fark edilerek tanımlanmıştır⁽¹⁶⁾. *P.aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* gibi pek çok insan için patojen olan türlerde bakteri savunması amaçlı benzer nitelikte moleküller tanımlanmıştır^(9,15,23). Bu moleküller ile mikroorganizmaların konak (host) invazyonunu, ilaç direncini, hareketlerini, fosfat alımını, osmoregülasyon, nitrojen fiksasyonunu kontrol edebildikleri bilinmektedir. Bu bilgilerden hareketle hayvanlarda gerçekleştirilen QS mutant *P.aeruginosa* akciğer infeksiyon modellerinde mortalitenin azaldığı, immun yanıtın hızlandığı, polimorf nüveli lökosit yanıt artışı, antikör yapımında artış saptanabilmektedir^(7,21,24,26).

Yabancı cisim infeksiyonlarını önlemek amacı ile, mikroorganizmalar arası iletişimi kesmek ve biyofilm gelişimini engellemek yolunda yapılan çalışmalara bakıldığında dört ana grup tanımlanabilmektedir. Birincisi tercih edilecek antimikrobiyalin anti-inflamatuar, alginat sentez yolu inhibitörü, QS molekül blokörü özelliklerini taşımasıdır⁽¹⁴⁾. Azitromisin bu amaçla en sık kullanılan ilaçtır. Ancak sonuçlar istenilen başarıları sağlayamamıştır. İkinci önlem yöntemi olarak patojen olmayan bakterinin ortama yerleştirilerek patojen olanlara yaşam alanı bırakılmaması olarak tanımlanabilir. Ancak bu çalışmalar patojen olmayan bakterilerin patojen özellik kazanması ile hayal kırıklığı yaratarak son bulmuştur. Bakteriler arası iletişimin engellenmesi için kimyasalların kullanılması üçüncü grup olarak özetlenebilir. Triklosan (sinyal molekülü yapımının engellenmesi), AHL laktanoz ve AHL açılaz (sinyal molekülün inaktive edilmesi), furanon (sinyal reseptör blokajı) bu amaçla kullanılacak kimyasallardır^(10,27). Ancak doku için de toksik oldukları için tercih edilmezler. Son olarak medikal yabancı cisimlerin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi veya yüzeyin kaplanması bu amaçla kullanılacak en uygun ve ümit verici yöntemler olarak tıp literatüründe yerini almaktadır.

Sorun ve çözüme kısaca bir bakış attığımız bu yazıda tüm bu bilgiler ışığında grup deneyimimizi aktarmakta fayda görüyorum. Öncelikle bu nitelikteki çalışmaların yürütülmesini sağlayacak farklı branşlardan örneğin, kimya, fizik, tıp gibi disiplinlerin araştırmacılarını bir araya getirilerek "Yabancı Cisim İnfeksiyonları Araştırma Grubu" kurulmuş ve 10 yıla yakın bir süredir çalışmalarını düzenli olarak sürdürmektedir. Bu grup düzenli olarak 15 günde bir biraraya gelip çalışmalarına devam eder. Tamamen non-profit bir organizasyon olup, yabancı cisim infeksiyonu temel araştırma konusudur. Ancak önemli bir diğer amacı da multienstütuysyonel, multidisipliner, translasyonel araştırma konusunda araştırma grubunun her basmaktaki üyelerine büyük bir öğrenim ve deneyim kazanma süreci sağlamasıdır. Bu guruptaki araştırmacılar aşağıda yer almaktadır:

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı

- Prof Dr Fatih Ağalar
- Doç Dr Oral Saygun
- Yrd Doç Dr Kuzey Aydınuraz

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

- Prof Dr Canan Ağalar

Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

- Prof Dr Emir B. Denkbaş, PhD (Biopolimerik Sistemler Araştırma Grubu Başkanı)
- Doç Dr Eylem Öztürk, PhD

Kırıkkale ve Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi, Fizik Bölümü

- Yrd Doç Dr Selçuk Aktürk, PhD

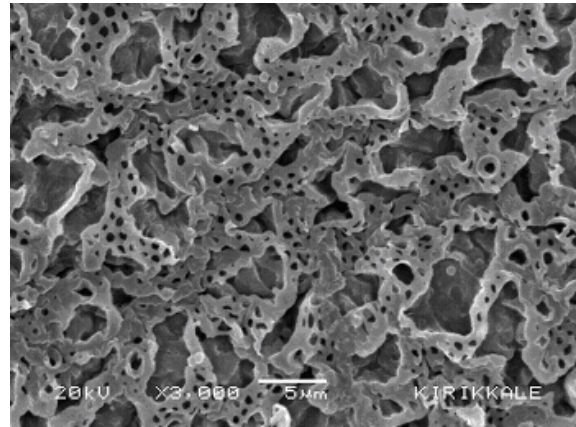
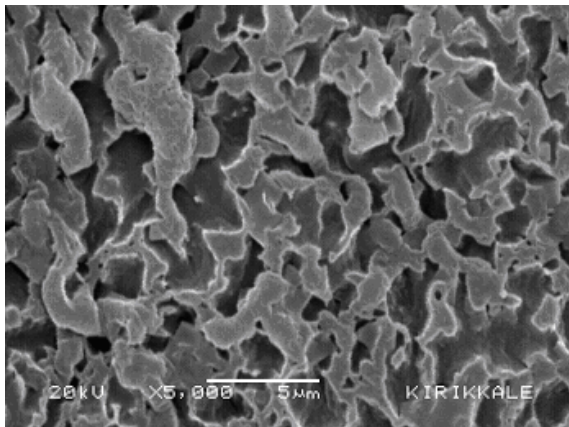
Araştırmalarımıza temel teşkil etmek ve geçerli bir model ortaya koyabilmek amacıyla bazı çalışmalarla işe başladık. Standardizasyonu sağlamak için öncelikle greft enfeksiyon geliştirme modelleri üzerinde çalıştık⁽⁴⁾. Biyofilm çalışmalarını için uygun bakteriyolojik yöntemleri değerlendirmek için sonikasyon ve vorteksleme yöntemlerini karşılaştırdık⁽²⁾. En sık klinikte enfeksiyon nedeni olarak karşılaştığımız yabancı cisimleri araştırdık. Üriner kateterler, greftler, damar kateterleri, yara örtü materyaller, airway sık enfeksiyona yol açmaları yanı sıra laboratuvar ortamında kolay çalışılabilecek malzemeler

olduğu için araştırmalarımız bu malzemelerde yoğunlaştı.

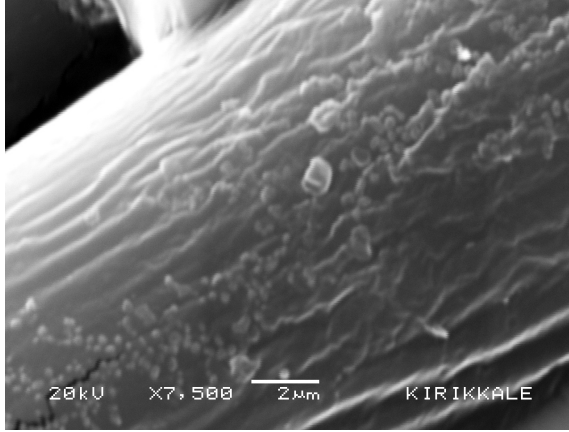
İki önlem mekanizmasını temel araştırma hedefi olarak belirledik. Bunlardan ilki bakterinin yabancı cisme yapışmasının önlenmesi (yüzey elektrik özellikleri değiştirilerek veya diğer şekillerde), ikincisi ise bakteri yapıştıktan sonra yapışan bakteriyi öldürme şeklinde idi. Yüzey kaplamaları için iyon implantasyon yöntemi, dipping gibi kimyasal yöntemler kullanıldı. Yüzeyin özellikleri uygun olduğunda ilaç taşıyıcı (scaffold) ajanlar kullanıldı. Scaffold'lar içinde grubumuzun tercihi chitosan adı verilen "biodegradable" bir taşıyıcı olmaktadır. İlaç salım profilleri çalışılarak bağlanan ilacın hangi zaman dilimi içinde salınabildiğini görebiliyoruz. Bu bakımdan biyofilmin bir süreç olduğu göz önüne alınarak bu salınım profilleri değiştirilerek ilacın istediğimiz zaman içinde ve miktarlarda salınımı sağlanabilmektedir.

Öncelikle yüzeylerini yerleştirildikleri ortam florası ve en sık etken patojenleri göz önüne alarak uygun antibiyotik ve diğer ajanlarla kaplayarak, malzemelerde mikroorganizmanın adezyonunu engellemeye çalıştık^(3,5,6,11,12,17,18,19). Antibiyotik dışında antiseptikleri de kolonizasyonu önleme amaçlı kullandık⁽⁸⁾. Farklı amaçlarla uzun yıllar tedavide kullanılan altın, palladium gibi metalleri, yüzey özelliği değiştirmek amacıyla kullanarak, adezyonu azalttığını gösterdik⁽²²⁾.

Bu çalışmalar ile ilgili bazı elektronmikroskopik görüntüleri Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Na fusidat yüklü ve salınmış periferik kateterin elektron mikroskopik görünümü⁽³⁾.



Şekil 2. Polipropilen greft üzerinde *Staphylococcus epidermidis* ile gelişen biyofilm⁽²²⁾.

Sonuç olarak tıpta kullanmakta olduğumuz biyomedikal malzemelerin tamamının yabancı cisim olduğunu hatırlayacak olursak, yabancı cismin bulunduğu her tıbbi girişimde biyofilm başımızın derdi olmaya devam edecektir. Biyofilm mekanizmalarının öğrenilmesi, oluşumunun engellenmesi birçok enfeksiyonun önlenmesi yönüyle önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces, *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1998;43(3): 338-48.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B)
2. Ağalar C, Eroğlu E, Yaylı G. Deneysel metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* mesh enfeksiyon modelinde iki farklı kültür yönteminin etkinliğinin karşılaştırılması, *Mikrobiyol Bült* 2001;35(1):63-7.
3. Ağalar C, Kılıç D, Ceken S et al. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* colonization with fusidic acid-impregnated catheters, *J Bioactive Compatible Polymers* 2007;22:160-74.
<http://dx.doi.org/10.1177/0883911507076457>
4. Ağalar C, Özdoğan M, Ağalar F et al. Rat model of polypropylene graft infection caused by *Staphylococcus epidermidis*, *ANZ J Surg* 2006; 76(5):387-91.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1445-2197.2006.03728.x>
PMid:16768701
5. Aydınuraz K, Ağalar C, Ağalar F, Ceken S, Duruyürek N, Vural T. In vitro *S.epidermidis* and *S.aureus* adherence to composite and lightweight polypropylene grafts, *J Surg Res* 2009;157(1):79-86.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2009.04.008>
PMid:19592038
6. Aydınuraz K, Ağalar C, Saygun O et al. Ciprofloxacin impregnated carboxymethylcellulose membrane reduces adherence and intraabdominal abscess formation and mortality rate in a lethal intraabdominal sepsis model in mouse, *Clin Microbiol Infect* 2005;11:595.
7. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmølle M et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent, *Microbiology* 2005;151(Pt 2):373-83.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27463-0>
PMid:15699188
8. Buyukkoçak U, Deniz T, Ceken S, Ağalar F, Ağalar C. Airway'in klorheksidin ile kaplanması mikrobiyal biyofilm oluşumuna etkisi, 5. Ulusal Dahili ve Cerrahi Bilimler Yoğun Bakım Kongresi Kitabı p.24, Adana (2008).
9. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antiviral therapies, *Nat Rev Microbiol* 2008;6(1):17-27.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1818>
PMid:18079741 PMCID:2211378
10. Christensen LD, Moser C, Jensen PO et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model, *Microbiology* 2007;153(Pt 7):2312-20.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/006122-0>
PMid:17600075
11. Denkbaz EB, Özlük B, Özdemir N, Kececi K, Ağalar C. Norfloxacin-loaded chitosan sponges as wound dressing material, *J Biomater Appl* 2004; 18(4):291-303.
<http://dx.doi.org/10.1177/0885328204041510>
PMid:15070516
12. Erdoğan G, Denkbaz E, Öztürk E, Ağalar C, Eroğlu M, Atilla P. Plasma modified Foley catheters against catheter associated urinary tract infection (CAUTI), *Hacettepe J Biol Chem* 2008;36(1):1-8.
13. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol* 1994;176(2):269-75.
PMid:8288518 PMCID:205046
14. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M et al. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer for-

- mation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(10):3677-87.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01011-06>
 PMid:17620382 PMCID:2043275
15. Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology, *Mol Microbiol* 2004;54(5):1212-23.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04349.x>
 PMid:15554963
 16. <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/fischeri3.htm> (erişim tarihi 20.03.2011)
 17. Kilic D, Agalar C, Ozturk E, Denkbas EB, Cime A, Agalar F. Antimicrobial activity of cefazolin-impregnated mesh grafts, *ANZ J Surg* 2007;77(4): 256-60.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1445-2197.2007.04029.x>
 PMid:17388831
 18. Ozturk E, Agalar F, Ozcetin A, Agalar C, Denkbas EB. Preparation and characterization of ciprofloxacin loaded plasma modified PLA/PEG membranes to use in peritonitis: In vitro studies, *Plasma Polymers Related Materials* 2005;527:166-70.
 19. Öztürk E, Keçeci K, Agalar C, Denkbaş EB. Preparation and characterization of ciprofloxacin loaded chitosan/alginate sponge as a wound dressing material, *J Applied Polymer Science* 2006; 101:1602-9.
<http://dx.doi.org/10.1002/app.23563>
 20. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects, *Microbiology* 2006; 152(Pt 4):895-904.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28601-0>
 PMid:16549654
 21. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections, *Infect Immun* 1999;67(11):5854-62.
 PMid:10531240 PMCID:96966
 22. Saygun O, Agalar C, Aydinuraz K et al. Gold and gold-palladium coated polypropylene grafts in a *S.epidermidis* wound infection model, *J Surg Res* 2006;131(1):73-79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2005.06.020>
 PMid:16139304
 23. Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi, *Mol Microbiol* 2006;59(3):753-64.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04976.x>
 PMid:16420349
 24. 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(4):1132-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/jb.184.4.1132-1139.2002>
 PMid:11807074 PMCID:134808
 25. Vandecasteele SJ, Van Wijngaerden E, Van Eldere J, Peetermans WE. New insights in the pathogenesis of foreign body infections with coagulase negative staphylococci, *Acta Clin Belg* 2000;55(3): 148-53.
 PMid:10981322
 26. Wu H, Song Z, Givskov M, Doring G et al. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection, *Microbiology* 2001;147(Pt 5):1105-13.
 PMid:11320114
 27. Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications, *Mol Microbiol* 2004;53:1563-71.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>
 PMid:15341639