



BOR DERGİSİ

JOURNAL OF BORON

<http://dergipark.gov.tr/boron>



Boronik asit moleküllerinin *Pseudomonas aeruginosa*'da virülens faktörlerinin üretimine etkisi

Ramadan Bilgin Akalın¹, Seyhan Ulusoy^{2*}

¹Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 59030, Tekirdağ, Türkiye, ORCID ID orcid.org/0000-0003-0067-2467

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 32260 Isparta, Türkiye, ORCID ID orcid.org/0000-0002-6559-1177

MAKALE BİLGİSİ

Makale geçmişi:

İlk gönderi 19 Ekim 2017
Revize gönderi 09 Ekim 2018
Kabul 09 Ekim 2018
Online 30 Kasım 2018

Araştırma Makalesi

DOI: [10.30728/boron.345186](https://doi.org/10.30728/boron.345186)

Anahtar kelimeler:

Boronik asit,
Pseudomonas aeruginosa,
Hücrelerarası iletişim sistemi

ÖZET

Hücreler arası iletişim sistemi (quorum sensing system (QS)), bakterilerin birbirleriyle oto-indükleyci olarak adlandırılan, küçük difüze olabilen moleküller kullanarak iletişim kurduğu bir sistemdir. Bu sistemin bakterilerde, virülans faktörlerinin üretimi de dahil olmak üzere pek çok fonksiyonu kontrol ettiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, *Pseudomonas aeruginosa*'da üretimi hücreler arası iletişim sistemi ile kontrol edilen virülens faktörleri üretimine boronik asit moleküllerinin potansiyel inhibitör etkisinin araştırılmasıdır. Bu çalışmayla bazı boronik asit türevi moleküllerin *P. aeruginosa* PA01 suşunda virülens faktörlerinin (elastaz ve piyosiyanın) üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerine etkileri araştırılmıştır. Etkisi incelenen boronik asit moleküllerinden 4-Bromofenilboronik asitin, elastaz ve piyosiyanın üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketini istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* gibi patojenlerin virülens faktörlerinin üretimini engelleyebildiği belirlenmiştir.

Effects of boronic acids on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2017
Revised form 09 October 2018
Accepted 09 October 2018
Available online 30 November 2018

Research Article

DOI: [10.30728/boron.345186](https://doi.org/10.30728/boron.345186)

Keywords:

Boronic acid,
Pseudomonas aeruginosa,
Quorum sensing system

ABSTRACT

The intercellular communication (Quorum sensing) in bacteria is based on using small diffusible signal molecules called as autoinducers to communicate with each other. Studies have shown that QS controls a large number of microbial processes, including the expression of virulence factors. The aim of this work is to investigate the potential inhibitory effect of boronic acid molecules on the production of virulence factors controlled by the intercellular communication system in *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, the effects of some boronic acid derivatives were investigated on the production of virulence factors (elastase and pyocyanin), biofilm formation and swarming motility in *P. aeruginosa* PA01. The results indicate that production of elastase and pyocyanin, the formation of biofilm and swarming motility were significantly reduced by 4-Bromofenilboronic acid. This study tends to support the potential inhibitory effects of boronic acid derivatives on the production of virulence factors in some pathogens such as *P. aeruginosa*.

1.Giriş (Introduction)

Bakteriler bölünerek çoğalan ve ürettikleri özel sinyal molekülleri ile buldukları ortama uyum sağlayabilen tek hücreli organizmalardır. Bakteriler tek bir hücre olarak yaşamlarını devam ettirebilmelerine rağmen, virülens faktörlerinin üretimi, biyofilm oluşturma, biyo-işleme faaliyetinin gerçekleştirilmesi gibi topluluk olarak hareket etmeği gerektiren faaliyetleri gerçekleştirmek için diğer bakterilerle birlikte koordineli olarak çalışmaları gerekir [1]. Çevreyi algılama/çoğunluğu algılama (QS) olarak bilinen hücrelerarası iletişim sistemi yardımıyla pek çok mikroorganizma çeşitli faaliyetlerini genetik seviyede kontrol ederek düzenlerler [2]. Pseu-

domonas türleri arasında QS sistemi en çok çalışılan fırsatçı insan patojeni *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* toprak ve sudan izole edilebilen, insanlar, hayvanlar ve bitkiler için patojen olan bir bakteridir. İnsanlarda şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilen *P. aeruginosa*, ekzoenzimler (elastaz, alkalın proteaz v.b.), ikincil metabolitler (piyosiyanın, hidrojen siyanür, pyoverdın, v.b.) ve toksinler (ekzotoksin A) gibi hücre dışı hastalık oluşturma faktörlerinin üretimini ve ayrıca biyofilm oluşumunu QS sistemi ile kontrol eder [3-6].

Biyofilm oluşturulması ve virülens faktörlerinin üretimi *P. aeruginosa*'da Lux I/R sistemine benzeyen Las ve Rhl olmak üzere iki temel sistem tarafından kontrol

*Sorumlu yazar: seyhanulusoy@sdu.edu.tr

edilir. Bu sistemler birbirlerini hiyerarşik düzende kontrol ederler. Rhl sistemi Las sistemi tarafından aktive edilir. *P.aeruginosa*'da üretimi Rhl sisteminin kontrolü altında olan piyosiyanın, biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen ve kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde oldukça önemli hücresel hasarlara sebep olabilen bir üründür. Elastaz ve proteaz enzimlerinin salgısı da patojenite açısından oldukça önemlidir. Konak içerisinde dokulara kolonize olma ve konağa zarar verecek koşulların oluşumunu kolaylaştırmada etkilidirler. *P. aeruginosa*'da gözlenen swarming (kayma) hareketi de, bakterinin tutunması ve daha sonrasında biyofilm oluşumunda bir bölgeden diğer bölgeye lokasyonu sağlamada oldukça önemlidir. Bakteriyel hareketlilik biyofilm oluşumunda önemli olduğundan, biyofilm inhibisyonu biyofilm oluşumunu önleyebilir ya da bozabilir. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler antibiyotiklere ve dezenfektanlara diğer bakterilerden daha fazla dirençli olduğundan biyofilm eradikasyonu bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kritik öneme sahiptir [4, 7].

Bakteriyel çevreyi algılama sistemi biyofilm oluşumu ve bakteriyel virülens faktörlerinin üretimi gibi çeşitli olaylarla ilişkili olduğundan, bu sistemi inhibe edebilecek veya bozabilecek moleküllerin araştırılması önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu iletişim sistemini etkileyebilecek moleküllerle ilgili artan sayıda çalışma mevcuttur. Bugün bor içeren kompleks biyoaktif moleküllerin çoğu insanlardaki hastalıkların tedavisinde önemli bir yer almaktadır. Literatürde bor türevi moleküllerle ilgili yapılmış; bakteri, küf, maya ve virüslere karşı bakteriyostatik, bakterisidal, fungistatik, fungisidal ve antiviral etkilerinin olduğu ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceklerini gösteren çalışmalar mevcuttur [8]. Ni ve ark. (2008), boronik asit türevi moleküllerin çevreyi algılama sistemi üzerine inhibitör etkili potansiyel antibakteriyel ajan olarak kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Fenil boronik asit bileşiğinin *Vibrio harveyi*'de Al-2 molekülüne benzerlik gösterdiğinden QS'yi inhibe ettiği bildirilmiştir [2]. Aynı zamanda bor içeren antimikrobiyal bileşiklerin (dihidrobenzoksaborales) antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [8]. Biyofilm inhibisyonuna yönelik yapılan bir çalışmada borik asitin insan oral kavitesinde *Enterococcus faecalis* tarafından oluşturulan biyofilm üzerine inhibitör etkili olabildiği ve irrigasyon sıvısı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [9]. Boronik asit türevlerinin *P. aeruginosa*'da virülens sistemi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamakla birlikte Ni vd. (2009), *Vibrio harveyi* üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bazı boronik asit türevi moleküllerinin Al-2 inhibitörü olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir [2].

Şimdiye kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde çevreyi algılama sistemini (QS) bloke eden bazı maddeler tanımlanmıştır. Ancak bu maddelerin konak için toksik olması veya konak tarafından tolere

edilemeyecek konsantrasyonlarda etkili olmaları sebebiyle tedavide kullanılmaları mümkün değildir. Bu alanda çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen klinikte uygulamadan henüz uzaktır.

Bu çalışma ile ilk kez 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin, fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'da virülens faktörlerinin (elastaz ve piyosiyanın) üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. Malzemeler ve yöntemler (Materials and methods)

2.1. Boronik asit türevi moleküllerin yapıları (Structures of boronic acid molecules)

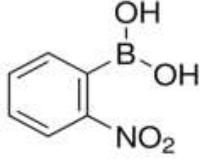
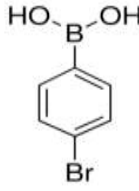
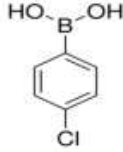
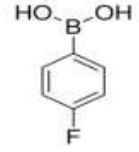
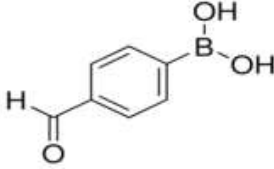
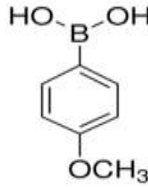
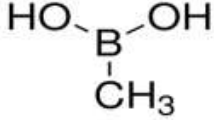
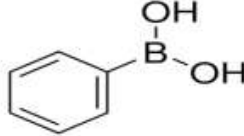
Bu çalışmada 2-Nitrofenilboronik asit (2-NFBA), 4-Bromofenilboronik asit (4-BFBA), 4-Klorofenilboronik asit (4-KFBA), 4-Fluorofenilboronik asit (4-FLFBA), 4-Formilfenilboronik asit (4-FFBA), 4-Metoksifenilboronik asit (4-MFBA), Metilboronik asit (MBA) ve Fenilboronik asit (FBA) molekülleri kullanılmıştır. Bileşiklerin sentezinde ve yapılan analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler, Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilerek kullanılmıştır [Çizelge 1] [10]. Çalışma sırasında *P. aeruginosa* PA01 suşu kullanılmıştır. Bu suş Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü bakteri koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.2. Boronik asit türevi moleküllerin minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MIK) (Determination of minimum inhibitory concentrations (mics) of boronic acid molecules)

Çalışmada kullanılan boronik asit molekülleri ile biyosensör suşlar olan QSS1, *Chromobacterium violaceum* 026 ve *Chromobacterium violaceum* VIR07 kullanılarak ön çalışmalar yapılmış, elde edilen sonuçlara göre MIK testleri için kullanılabilecek uygun derişimler belirlenmiştir [11,12].

2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA moleküllerinin antibakteriyel özelliklerinin belirlenebilmesi için MIK değerleri *P. aeruginosa* PA01 suşu için incelenmiştir. Bu amaçla PA01 5 mL LB sıvı besi yerinde 37 °C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA moleküllerinin son derişimleri 55,500 mM, 27,750 mM, 13,875 mM, 6,937 mM, 3,468 mM, 1,734 mM 0,867 mM ve 0,433 mM olacak şekilde test tüplerine eklenmiştir. Her bir test tüpüne 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış bakteri kültüründen 20'şer µl eklenmiştir. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır [13]. İnkübasyon sonrasında bulanıklık ölçülerek MIK değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 1. Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak seçilen moleküller (Molecules selected as quorum sensing inhibitor candidate).

<p>2-Nitrofenilboronik asit MA: 166,93 g/mol</p> 	<p>4-Bromofenilboronik asit MA: 200,83 g/mol</p> 
<p>4-Klorofenilboronik asit MA: 156,37 g/mol</p> 	<p>4-Fluorofenilboronik asit MA: 139,92 g/mol</p> 
<p>4-Formilfenilboronik asit MA: 149,94 g/mol</p> 	<p>4-Metoksifenilboronik asit MA: 151,96 g/mol</p> 
<p>Metilboronik asit MA: 59,86 g/mol</p> 	<p>Fenilboronik asit MA: 121,93 g/mol</p> 

2.3. Virülens faktörlerinin analizi (Analysis of virulence factors)

2.3.1. Elastaz testi (Elastase assay)

Elastaz aktivitesini test için Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır [14]. *P. aeruginosa* PAO1 suşu LB besiyerinde 2 mM'lık derişimlerde 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA moleküllerinin varlığında 37 °C, 120 rpm de 24 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100 µL üzerine 900 µL ECR (elastin congo red) tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7,5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 37°C'de 3 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üst faz absorbansı 495 nm'de mikropilaka okuyucuda (BIOTEK, Epoch) okunmuştur. Test sırasında Luria Bertani (LB) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kimyasal eklenmemiş örnekler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.3.2. Piyosiyanın testi (Pyocyanin assay)

10 ml piyosiyanın broth (PB) besiyerine, son derişimi 2 mM olacak şekilde 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA,

4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA eklenmiş ve 600 nm'de OD 0,05 olacak şekilde ayarlanan *P. aeruginosa* PAO1 kültüründen ilave edilip 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. PB ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürünün 10 ml'si 5 ml kloroform ile ekstrakte edilmiş ve 1 ml organik faz temiz bir tüpe ayrılmıştır [15]. Ayrılan faza, 1 ml 0,2 M HCl ilave edilerek piyosiyanın zengin organik faz ayrılmıştır. Ekstrakte edilen kısımdaki piyosiyanın miktarı 520 nm'de mikropilaka okuyucuda (BIOTEK, Epoch) okunarak sonuçlar kayıt edilmiştir. Sonuçlar kimyasal eklenmemiş örnekler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.3.3. Biyofilm testi (Biofilm assay)

P. aeruginosa PAO1 suşu için 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA moleküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir. Biyofilm testi için O'Toole ve Kolter (1998) [16] tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu test için 2mL'lik plastik tüpler kullanılmıştır. Her bir plastik tüpe 800µL LB broth besiyeri, 50µL 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış *P. aeruginosa*

kültürü ve son derişimi 2 mM olacak şekilde 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA eklenerek 24 saat 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler döküldükten sonra tüpler steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Tüpler kurutulduktan sonra 1 ml %0,5 (w/v) kristal viyole ile 30 dakika boyanmış ve steril saf su ile boyanın fazlası yıkanmıştır. Tüplere eklenen 1 ml % 95 (v/v) etanolün optik dansitesi 570 nm'de okunarak sonuçlar kaydedilmiştir. Oluşan biyofilm miktarları kimyasal eklenmemiş örneklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.3.4. Kayma hareketi testi (Swarming motility assay)

8 g nutrient broth 1⁻¹, 5 g bacto agar 1⁻¹ ve % 0,5 glikoz içeren kayma besiyeri içine, 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA son derişimleri 2 mM olacak şekilde eklenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 kültürü santrifüj edildikten sonra süpernatantın 5 µL'si kayma besiyeri petrilere ilave edilmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir [17]. Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının (mm) ölçülmesiyle belirlenmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.4. İstatiksel değerlendirme (Statistical analysis)

Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen veriler boronik asit eklenmemiş *P. aeruginosa* PAO1 kültürü ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Origin 8 programında tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p≤ 0,05 seviyesinde istatistik olarak değerlendirilmiştir.

3. Sonuçlar ve tartışma (Results and discussion)

Antibiyotiklere artan direnç gelişimi, yeni antimikrobiyal moleküllerin geliştirilmesinde farklı stratejilere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Antibiyotik olmayan bileşikler ve bakteriyel enfeksiyonlarda çevreyi algılama sisteminin öneminin daha da anlaşılması, QS inhibitör özellikleri olan anti-virülens moleküllerin araştırılmasına ilgiyi arttırmıştır [18,19].

Çevreyi algılama sistemi ile virülens özelliklerinin düzenlenmesi ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin en çok çalışıldığı bakteri *P. aeruginosa* olduğu için, çalışmamızda bu patojen borik asit türevlerinin anti-virülens etkinliklerinin değerlendirilmesinde model olarak tercih edilmiştir [20].

3.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlenen örnekler (Minimum inhibitory concentrations of boronic acids)

Derişimleri 55,500 mM, 27,750 mM, 13,875 mM, 6,937 mM, 3,468 mM, 1,734 mM, 0,867 mM ve 0,433 mM olacak şekilde seyreltmeleri yapılan 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA, 4-FLFBA, 4-FFBA, 4-MFBA, MBA ve FBA moleküllerinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu için antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak *P. aeruginosa* PAO1 suşu için 2-Nitrofenilboronik asit için 27,75 mM,

4-Bromofenilboronik asit için 3,468 mM, 4-Klorofenilboronik asit için 3,468 mM, 4-Fluorofenilboronik asit için 13,875 mM, 4-Formilfenilboronik asit için >55,500 mM, 4-Metoksifenilboronik asit için 27,750 mM, Metilboronik asit için > 55,500 mM ve Fenilboronik asit için 27,750 mM seviyelerinde inhibisyon etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Tüm boronik asit molekülleri için 2 mM çalışma derişimi olarak seçilmiştir.

3.2. Boronik asit moleküllerinin elastaz üretimine etkisi (Effect of boronic acids on elastase production)

Elastaz, elastin ve kollajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan ve insan immunoglobulin G hücrelerini inaktive eden bir metalloproteazdır [21]. Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir [22]. Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu ile elastaz üretimini azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [23,24].

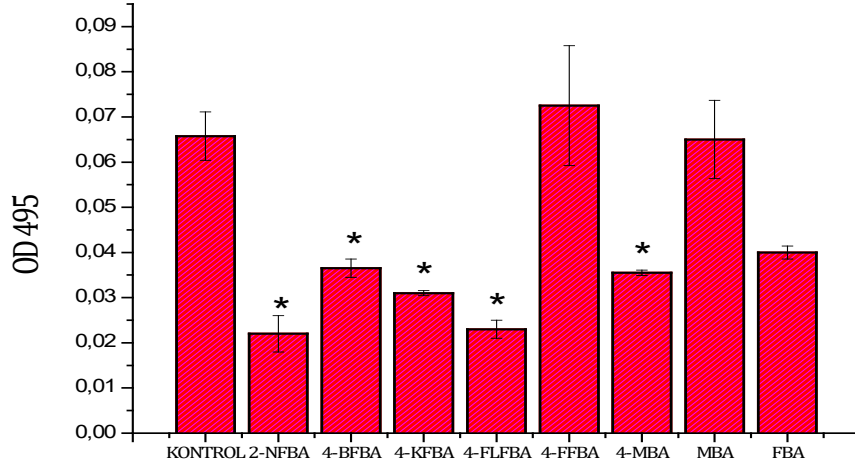
P. aeruginosa PAO1 suşunda elastaz üretimini 2 mM derişimde, 2-NFBA %67, 4-BFBA %44, 4-KFBA %53, 4-FFBA %65 ve 4-MFBA %46 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil1).

3.3. Boronik asit moleküllerinin piyosiyanın üretimine etkisi (Effect of boronic acids on pyocyanin Production)

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyel kolonilere mavimsi yeşil renk veren çözünebilir fenazin türevi bir pigment olan piyosiyanini üretme özelliğine sahiptir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyanın molekülü, akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarından sorumludur ve üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında gerçekleşir [24]. Piyosiyanın üretimi ile çevreyi algılama sistemi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bir çevreyi algılama sistemi inhibitörü olan N-oktanoyil siklopentilamid (C8-CPA) kullanılarak yapılan bir çalışmada HSL üretimi yanında elastaz, rhamnolipid ve piyosiyanın gibi virülans faktörlerinin üretimini de engellendiği gösterilmiştir [25]. 2 mM derişimde *P. aeruginosa* PAO1 suşu için piyosiyanın üretimini 4-BFBA, %74 ve 4-KFBA, %73 oranında azaltmıştır (Şekil2).

3.4. Boronik asit moleküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi (Effect of boronic acids on biofilm production)

Mikrobiyal hücrelerin geri dönüşümsüz olarak polisakarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu, makroskobik opak yapıda, ortalama 100-500 µm yükseklikte, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir [26]. Planktonik bakterilerin sebep olduğu akut enfeksiyonlar antibiyotiklerle tedavi edilebilirken, biyofilm oluşturan bakteri enfeksiyonlarının tedavisi zor olup kronikleşmektedir [27]. Son yıllarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının



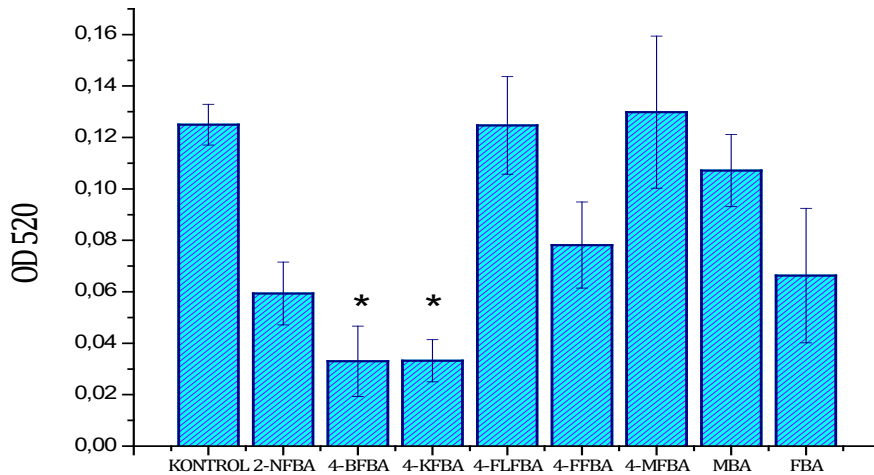
Şekil 1. Boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunun elastaz üretimine etkisi. Sonuçlar tek yönlü Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile boronik asit eklenmiş örnekler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. (The effect of boronic acids on the production of elastase by *P. aeruginosa* PA01. The results were analyzed with one-way ANOVA and the difference between the control and boronic acid added samples were statistically significant ($p \leq 0,05$).

gelişmesinde biyofilm oluşumu önemli rol oynamakta ve nazokomiyal enfeksiyonlarda gittikçe artan morbitide ve mortaliteye sebep olmaktadır. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda antibiyotiklerle tedavinin zor olması biyofilm oluşumunun engellenmesi ve biyofilm oluşumundan sorumlu olan çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur [28].

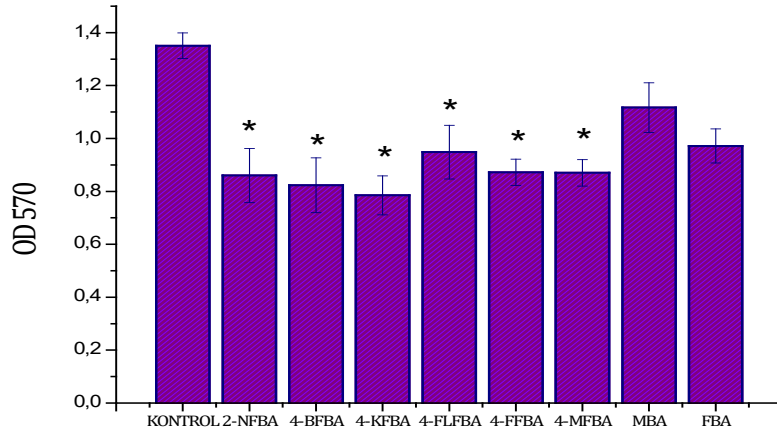
Boronik asit moleküllerinin 2 mM derişimde *P. aeruginosa* PA01 suşunun biyofilm üretimine etkileri incelenmiştir. Sayın ve ark. (2016) [29], borik asit molekülünün çeşitli bakterilerde biyofilm üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında sadece *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunda biyofilm oluşumu üzerine etkili olmadığını tespit etmesine rağmen bu çalışmada biyofilm oluşumunu 2-NFBA %36, 4-BFBA %39, 4-KFBA %42, 4-FLFBA %30, 4-FFBA %35 ve 4-MFBA %36 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Şekil3).

3.5. Boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa*'nın kayma hareketine etkisi (Effect of boronic acids on swarming motility of *P. aeruginosa*)

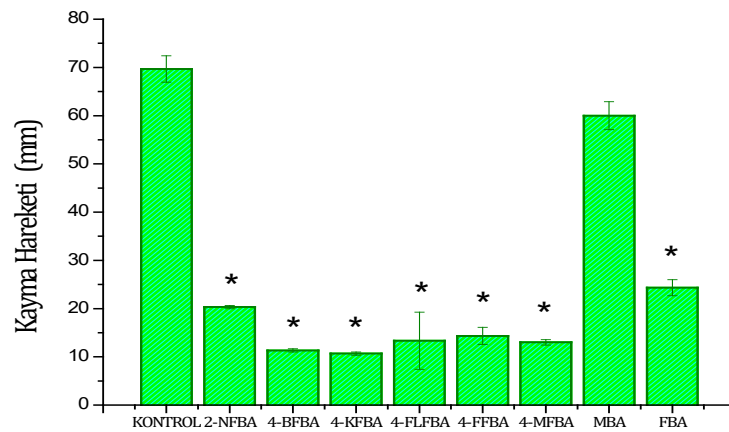
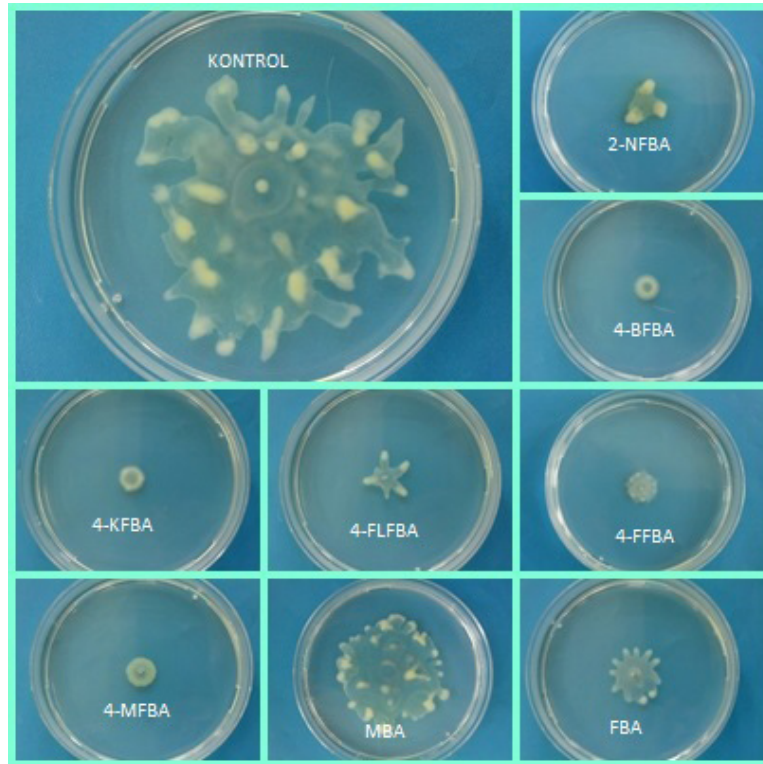
P. aeruginosa tip-IV pili ve ramnolipit üretimi sayesinde kayma hareketi yapabilmektedir. Bunlardan birisinin eksikliği *P. aeruginosa* PA01'in bu hareketi gerçekleştirememesine neden olmaktadır [30]. Bu motilite fonksiyonları bakterinin yüzeye yapışması ve kolonizasyonu için gereklidir [17]. Çevreyi algılama sistemi ile motilite arasındaki düzenleyici ilişki daha önce de incelenmiştir. Reimann ve arkadaşları HSL blokajı yapılan *P. aeruginosa* suşlarında kayma hareketinin engellendiğini ancak yüzme ve titreme hareketinin mevcut olduğunu ve bakterilerin kolonize olabildiğini göstermişlerdir. 2 mM derişimde *P. aeruginosa* PA01 suşunun kayma hareketini 2-NFBA %71, 4-BFBA %84, 4-KFBA %85, 4-FLFBA %81, 4-FFBA %79, 4-MFBA %86 ve FBA %65 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil4).



Şekil 2. Boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunun piyosyanin üretimine etkisi. Sonuçlar tek yönlü Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile boronik asit eklenmiş örnekler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. (The effect of boronic acids on the production of pyocyanin by *P. aeruginosa* PA01. The results were analyzed with one-way ANOVA and the difference between the control and boronic acid added samples were statistically significant ($p \leq 0,05$).



Şekil 3. Boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunun biyofilm oluşumuna etkisi. Sonuçlar tek yönlü Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile boronik asit eklenmiş örnekler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. (The effect of boronic acids on the production of biofilm by *P. aeruginosa* PA01. The results were analyzed with one-way ANOVA and the difference between the control and boronic acid added samples were statistically significant ($p \leq 0.05$)).



Şekil 4. a) Boronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunun kayma hareketine etkileri b) *P. aeruginosa* PA01 suşunun kayma hareketi (mm). a) The effect of boronic acids on the swarming motility of *P. aeruginosa* PA01. b) The swarming motility of *P. aeruginosa* PA01).

4. Sonuçların değerlendirilmesi (Conclusion)

Bu çalışmada *P. aeruginosa* tarafından çevreyi algılama sistemi tarafından üretilen kontrol edilen çeşitli virülens faktörleri üzerine boronik asit moleküllerinin inhibisyon etkisi ilk defa rapor edilmiştir. Bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere gösterdikleri direnç ve özellikle bu direncin artması, bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu çalışmada dünya rezervinin büyük bir kısmının ülkemizde olduğu bilinen bor, farklı bir kullanım alanı için incelenmiştir. Bor türevi moleküllerin daha sonraki çalışmalarda yeni çevreyi algılama sistem inhibitör adaylarının sentezlenmesi için kullanılabileceği, klinik öneme sahip diğer patojen mikroorganizmalara karşı çeşitli araştırmalar için de katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür (Acknowledgment)

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı bu çalışmayı 3541-YL1-13 No'lu Proje ile maddi olarak desteklemiştir. Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na desteğinden dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar (References)

- [1] Solano C., Echeverez M, Lasa I., Biofilm dispersion and quorum sensing, *Curr. Opin. Microbiol.*, 18, 96-104, 2014.
- [2] Ni N., Li M., Wang J., Wang B., Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing, *Med. Res. Rev.*, 29,65-124, 2009.
- [3] Venturi V., Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 30, 274-291, 2006.
- [4] Vasavi H. S., Arun A. B., Rekha P. D., Antiquorum sensing potential of *Adenanthera pavonina*, *Pharmacognosy Res.*, Jan Mar; 7 (1), 105-109, 2015.
- [5] Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, et al. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos. Trans. R Soc. Lond. Bio. Sci.*, 355, 667-80, 2000.
- [6] Schuster M, Greenberg E. P., A network of networks: Quorum sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296, 73-81, 2006.
- [7] Çevik K., Ulusoy S., Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by 2,2'-bipyridyl, lipoic, kojic and picolinic acids, *Iran J. Basic Med. Sci.*, Aug; 18 (8), 758-763, 2015.
- [8] Baker S. J., Akama T., Zhang Y.-K., Sauro V., Pandit C., Singh R., Kully M., Khan J., Plattner J. J., Benkovic S. J., Identification of a novel boron-containing antibacterial agent (AN0128) with anti-inflammatory activity, for the potential treatment of cutaneous diseases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 5963-5967, 2006.
- [9] Zan R., Hubbezoglu I., Ozdemir A. K., Tunc T., Sumer Z., Alici O., Antibacterial Effect of Different Concentration of Boric acid against *Enterococcus Faecalis* Biofilms in Root Canal, *Marmara Dental Journal*, 2, 76-80, 2013.
- [10] (<https://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>)
- [11] Rasmussen T. B., Bjarnsholt T., Skindersoe M. E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kote M., Nielsen J., Eberly L., Givskov M., Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector, *J. Bacteriol.*, 187, 1799-1814, 2005.
- [12] Morohoshi T., Shiono, Takidouchi K., Kato M., Kato N., Kato J., Ikeda T., Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone, *Appl. Environ. Microbiol.*, 6339-6344, 2007.
- [13] Hammer K. A., Carson C., Riley T., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 985-990, 1999.
- [14] Ohman D., Cryz S., Iglewski B., Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase, *J. Bacteriol.*, 142, 836-842, 1980.
- [15] Essar D., Eberly L., Crawford I., Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida* trpE and trpGDC, *J. Bacteriol.*, 172, 867-883, 1990.
- [16] O'Toole G. A., Kolter R., Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol. Microbiol.*, 30, 295-304, 1998.
- [17] Rashid M. H., Kornberg A., Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 4885-4890, 2000.
- [18] Imperi F., Massai F., Pillai C. R., Longo F., Zennaro E., Rampioni G., Visca P., Leonib L., New Life for an Old Drug: The Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing, *Am. Soc. Microbiol.*, 57, 996-1005, 2013.
- [19] Soković M., Ćirić A., Glamočlija J., Nikolić M. and Griensven L. J. L. D van., Agaricus Blazei Hot Water Extract Shows Anti Quorum Sensing Activity in the Nosocomial Human Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*, *Molecules*, 19, 4189-4199, 2014.
- [20] Hamood A. N., Griswold J., Colmer J., Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*, 64, 3154-3160, 1996.
- [21] Passador L., Cook J. M., Gambello M. J., Rust L., Iglewski B. H., Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication, *Sci.*, 260, 1127-1130, 1993.
- [22] Pechere J. C., Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, *Jpn. J. Antibiot.*, 54, 87-89, 2001.
- [23] Reimann C., Ginet N., Michel L., Keel C., Michaux P., Krishnapillai V., Zala M., Heurlier K., Triandafillou K., Harms H., Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Microbiol.*, 148, 923-932, 2002.

- [24] Fuqua C., Parsek M. R., Greenberg E. P., Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing, *Annu. Rev. Genet.*, 35, 439-468, 2001.
- [25] Ishida T., Ikeda T., Takiguchi N., Kuroda A., Ohtake H., Kato J., Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N- Acyl Cyclopentylamides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 3183-3188, 2007.
- [26] Donlan R. M., Costerton J. W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193, 2002.
- [27] Bjarnsholt T., Van Gennip M., Jakobsen T. H., Christensen L. D., Jensen P. Ø., Givskov M., In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect, *Nat. Protoc.*, 5, 282, 2010.
- [28] De Kievit T. R., Gillis R., Marx S., Brown C., Iglewski, B. H. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1865-1873, 2001.
- [29] Sayin Z., Ucan U. S., Sakmanoglu A., Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria, *Biol. Trace Elem. Res.*, 173:241–246, 2016.
- [30] Köhler T., Curty L. K., Barja F., Van Delden C., Pechere J.-C., Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili, *J. Bacteriol.*, 182, 5990-5996, 2000.