

Bitkilerden Elde Edilen Anti Quorum Sensing Bileşikleri ve Yeni İlaç Geliştirmedeki Potansiyelleri

Elif ÇEPNİ *., Filiz GÜREL *

* İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, ** Ebittek Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Tic. Ltd. Şti. İstanbul Teknokenti

ÖZET

Quorum sensing (QS) bakteri hücreleri arasındaki iletişimin, sinyal molekülleri tarafından sağlanması ve bu sayede bazı özel fonksiyonların gerçekleşmesidir. Bu fonksiyonlar arasında virülansla ilişkili proteinlerin sentezi, biyofilm oluşumu ve DNA taşınması gibi patojenite özellikleri de bulunmaktadır. Günümüzde bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli sorun bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmeleri ve antibiyotik tedavisi ile dirençli suşların seçilmesidir. Yalnızca QS mekanizmasını bloke ederek enfeksiyonun kontrol altına alınması ilk kez *Pseudomonas aeruginosa*'da gösterilmiştir. Sonraki yıllarda bitki türlerinde anti-QS etkili bileşiklerin varlığı sayısı artan araştırmalarla gösterilmiştir. Bu bitkiler arasında ender bulunan türlerin yanı sıra antibakteriyel etkili tıbbi bitkiler ve yaygın türler de vardır. Anti-QS aktivite *Chromobacterium violaceum*'da pigment üretimindeki azalmanın yanı sıra, virülans faktörlerin üretimi ve biyofilm oluşumunun inhibisyonu gösterilerek ya da rekombinant bakteri suşları kullanılarak belirlenebilir. İncelenen bitkilerin çok azında QS'in hangi yolla baskılandığı belirlenebilmiştir. Anti-QS etkili ekstraktların saf maddelerin elde edilmesi ve bunların etki mekanizmalarının aydınlatılması yeni nesil ilaç geliştirme çalışmalarına önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Quorum sensing, ilaç, biyomonitör

SUMMARY

Anti Quorum Sensing Compounds Obtained From Plants and Their Potential in Developing New Drugs

Quorum sensing (QS) is a mechanism of particular functions carried out by cell to cell communication provided by signal molecules. These functions include virulence protein synthesis, biofilm formation and DNA transport which are pathogenic traits. Most important problem on the control of the bacterial infections today, is the multi-drug resistance developed by the bacteria and selection of antibiotic resistant strains. Control of the bacterial pathogenicity by inhibition of QS mechanism was first achieved in human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Recently, there has been an increase in studies showing the presence of anti-QS compounds in plant species. These species include rare or prevalent plants or medicinal plants with anti-bacterial effects. Various assays for anti-QS activity have been performed by using plant extracts prepared with different solvents. Anti-QS activity can be assayed by decreasing pigment production in *Chromobacterium violaceum*, production of virulence factors, inhibition of biofilms as well as by using recombinant strains. Mechanism of QS inhibition was examined in a scarce numbers of species. Obtainment of chemical constituents from extracts and enlightening the exact mechanism of their QS inhibition will contribute to the development of new generation drugs.

Key words: Quorum sensing, drug, biomonitor

GİRİŞ

Bakterilerde hücre-hücre iletişimi sinyal molekülleri aracılığıyla sağlanır. Bakteri sayısı arttıkça hücre dışına salınan bu sinyal moleküllerinin sayısı da artmakta ve bu artış algılanabilmektedir. Bakterilerin, belli bir yoğunlukta bu sinyalleri algılayarak çeşitli davranışlar sergilemesine “Quorum-sensing” (QS) adı verilir. Bu tanım; salt çoğunluk anlamına gelen “Quorum” ve algılama (sensing) sözcüklerinden oluşur.

Bu mekanizmada rol oynayan sinyal molekülleri gram negatif ve gram pozitif bakterilerde yaygındır. Gram negatif bakterilerde çoğunlukla açıl homoserin laktonlar (AHL) sentezlenmekte ve bunlar otoindükleyci (AI) adını almaktadır. Gram pozitif bakterilerde ise bazı modifikasyonlara sahip peptid molekülleri “otoindükleyci peptitler” (AIP) olarak adlandırılırlar⁽¹⁾. *Vibrio harveyi*'de tanımlanan ve “hibrid sistem” adı verilen mekanizmada ise AI-1 adı verilen bir AHL sinyalinin yanı sıra furanosil borat ester yapı-

Alındığı tarih: 16.04.2011

Kabul tarihi: 20.06.2011

Yazışma adresi: Filiz Gürel, İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Vezneciler 34134 İstanbul

e-posta: filiz@istanbul.edu.tr

sındaki farklı sinyaller de üretilir. AI-2 adı verilen bu sinyallerin farklı türler (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella* ve *Salmonella* türleri) tarafından algılandığı (cross-talk) ortaya çıkmıştır. Yine *Pseudomonas* türlerinde üretilen “siklik peptitler” ve *Bradyrhizobium japonicum*’un ürettiği “Bradyoxetin” QS sistemlerindeki sinyal çeşitliliğini göstermektedir ⁽²⁾.

QS varlığına ilk kez, biyoluminesans ışımaya gösteren deniz bakterisi *Vibrio fischeri*’de rastlanılmıştır. Bu bakteride sinyal molekülü yeterli konsantrasyon düzeyine ulaştığında biyoluminesans özelliği ortaya çıkar. QS mekanizmasının işleyişi Lux operonu ile açıklanmaktadır. Burada LuxI geni bir AI olan N-(3-oksoheksanoil)-homoserin laktonun sentezini; LuxR ise AI’ye bağlanabilen bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Ortamdaki N-(3-oksoheksanoil)-homoserin lakton moleküllerindeki artış, LuxR proteini ile bir kompleks oluşmasına ve bu kompleksin daha sonra luxICDABE operonuna bağlanmasına neden olur. Böylece biyoluminesans özellik ile ilişkili bu operondaki genlerin aktive olması ve özellikle lusiferaz üretimi sağlanmış olur. Eşzamanlı olarak LuxI gen ürününün de sentezi uyarılır (Şekil 1).

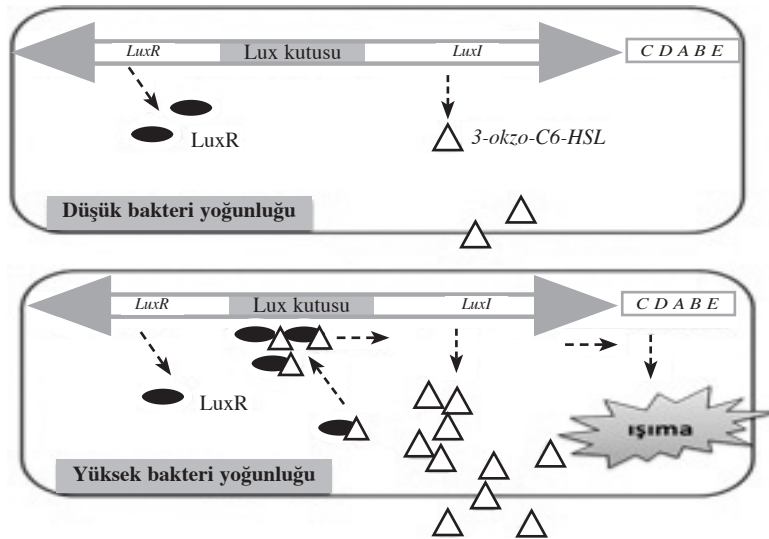
QS mekanizmasının bakteriyel patojenitedeki önemi 1990’ların başında anlaşılmaya başlanmıştır. Birçok

gram negatif bakteride virülans faktörlerin üretimi ya da konak hücreleri parçalayan enzimlerin sentezi QS’ye bağlıdır. *P. aeruginosa*’nın biyofilm oluşturma ve hücre dışı enzim salgılama gibi patojenik fonksiyonlarını QS’ye bağlı olarak gerçekleştirdiğinin bulunması ise önemli bir gelişme olmuştur. İnsan patojeni *P. aeruginosa*’da, *V. fischeri*’deki LuxI-LuxR genlerine homolog olan lasR ve lasI genleri hücre dışı enzim salgılanması ve biyofilm oluşumuna neden olur. Bu bakterideki RhlI-RhlR adı verilen ikinci QS sinyal yolu ise hücre dışı enzim sentezinin yanı sıra biyofilm oluşumunda kullanılan ramnolipid üretimini sağlamaktadır ⁽¹⁾.

Hentzer ve ark. ⁽³⁾ tarafından 2003 yılında yayınlanan bir çalışmada, doğal furanondan elde edilen sentetik bir türev (C-30; bileşik 30) ile *P. aeruginosa*’da QS’yi inhibe etmenin olanaklı olduğu gösterilmiştir. Fare akciğerlerine uyguladıkları furanon türevi, bakterinin çoğalmasını durdurmuş, bağışıklık sisteminin hızlı yanıtıyla enfeksiyon önlenmiştir. Bu çalışma ilk kez bakteriyel QS’yi önleyerek bir enfeksiyonun durdurulabilmesini göstermesi bakımından önem taşımaktadır.

ANTİ-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

QS mekanizmasının inhibisyonu “anti-QS aktivite”



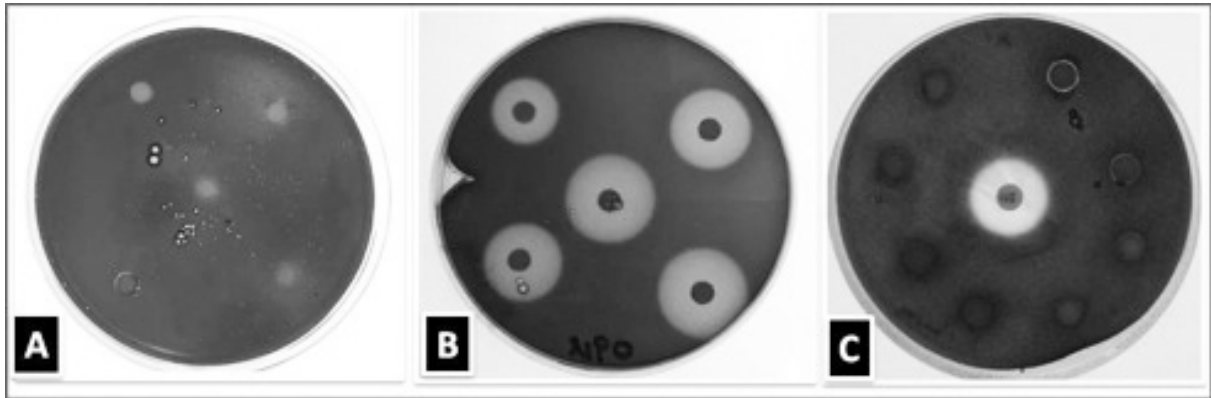
Şekil 1. QS mekanizmasının model deniz bakterisi *Vibrio fischeri*’de gösterilmesi. Düşük bakteri yoğunluğunda, LuxI ürünü olan AHL ve LuxR transkripsiyon faktörünün sentezi oldukça düşüktür. Artan bakteri yoğunluğuna bağlı olarak ortamdaki sinyal molekülleri artar ve AHL/LuxR kompleksleri oluşur. Bu komplekslerin Lux operonuna bağlanmasıyla bakteride ışımadan (biyoluminesans) sorumlu genler aktif hale gelir.

olarak da tanımlanmaktadır ve çeşitli biyomonitör türler kullanılarak gösterilebilir. Bunlardan en yaygın olanı *Chromobacterium violaceum* (CV12472) bakterisi ile yapılan testlerdir ⁽⁴⁾. Bu bakteride LuxI homologu olan *cviI* geni aracılığı ile mor renkli antibiyotik viyolasin üretilir. AHL üretimine bağlı olarak sentezlenen antibiyotik görsel olarak izlenebilir ve kantitatif olarak ölçülebilir. Bu nedenle, *C. violaceum* anti-QS etkili maddelerin test edilmesinde bir araç olarak kullanılabilir. Bu yöntemin uygulanması "disk difüzyon testi", "kuyu difüzyon testi" ya da kantitatif olarak viyolasin miktarının ölçülmesi şeklinde yapılır. Disk difüzyon yönteminde, test edilecek bitki ekstresi ya da saf madde diskler üzerine emdirilerek, Luria Bertoni besiyerinde hazırlanmış *C. violaceum* kültürlerine uygulanır. Kuyu difüzyon testinde ise ekstreler petri üzerinde açılan kuyulara yüklenir. Bu ekstreler anti-QS aktiviteye sahip olmadıkları takdirde viyolasin üretimi engellenmeyeceğinden diskler etrafında mor bir renklenme görülecektir (Şekil 2a). Anti-QS bir aktivite var ise disklerin çevresinde inhibisyon bölgeleri olarak tanımlanan renksiz opak yapıda zonlar oluşur ki bu zonların boyutu inhibisyonun derecesine bağlı olarak değişebilir (Şekil 2b). Bu zonların opak yerine saydam olması ise antimikrobiyal etkinin işaretidir (Şekil 2c). Disk difüzyon testlerinde *Chromobacterium*'un CV026 adı verilen mutant suşu da kullanılabilir. Bu suşta AI sentezini yapan gen yönsel mutasyon (Tn5 mutasyonu) ile inaktif hale gelmiştir ve bu nedenle antibiyotik üretimi gerçekleşemez. Diğer yandan, uygun sinyal molekülleri (C4-HSL ve C6-HSL) dışarıdan verilerek viyolasin üretilebilir ve anti-QS belir-

leme çalışmalarında kullanılabilir. Viyolasin miktarının kantitatif olarak ölçülmesi görsel tespitleri güçlendirerek çalışmaları daha güvenilir kılabilir. Bunun için bakteri kültürleri (CV12472 ya da CV026+C6-HSL) ekstrelerle belirli oranlarda karıştırılarak 30°C'de 24 saat üremeye bırakılır. Kontrol olarak ekstre içermeyen sıvı kültürler kullanılabilir. Daha sonra, belli miktarlardaki sıvı kültürler santrifüjlenerek üst sıvıları elde edilir ve bu fazdaki viyolasin miktarı (OD585 değerleri ile) elde edilir ⁽⁵⁾.

Anti-QS aktiviteyi belirlemek için geliştirilen farklı bir yöntemde *Agrobacterium tumefaciens*'un NTL4 (pZLR4) biyomonitör suşu kullanılır ⁽⁶⁾. Bu yöntem kısa (C6) ve uzun (C12) yan zincirli AHL sinyallerinin inhibisyonunu saptamada başarı ile kullanılmıştır ⁽⁷⁾. NTL4 suşundaki raportör *LacZ* geni QS'e bağlı bir promotörün önüne klonlanmıştır. Bu QS'e bağlı promotörün dışarıdan verilen AHL'ler ile aktive edilmesi sonucunda beta-galaktosidaz enzimi üretilir. Bu enzim ise besi yerine eklenmiş olan kromojenik substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside)'ı parçalayarak mavi renklenmeyi sağlar. Anti-QS aktivitesi olan bileşikler raportör *LacZ* geninin bağlı olduğu promotörü inhibe ederek bu genin aktivasyonunu önler. Ortamdaki beta-galaktosidaz enziminin azalmasına bağlı olarak X-Gal'ın parçalanması ve mavi renk oluşumu sınırlanır.

AHL sinyal inhibitörlerinin belirlenebilmesinde kullanılan rekombinant bakteri suşları Bjarnsholt ve ark. ⁽⁸⁾ tarafından geliştirilmiştir. Bunlardan ilki *V. fischeri*'nin *LuxR-I* genlerinin bir *Escherichia coli Lac+*



Şekil 2. *Chromobacterium violaceum* (CV12472)'un anti-QS belirlenmesinde biyomonitör olarak kullanımı. A: Anti-QS aktivitenin olmadığı durumda *C. violaceum* üretilmiş petride ekstrelerin yüklendiği disklerin çevresinde viyolasin üretiminden kaynaklanan mor renklenme B: 4-NPO (4- nitropiridin oksit)'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı disklerin çevresinde anti-QS aktivite sonucu oluşan opak zonlar C: Gentamisin uygulaması sonucu disk çevresinde oluşan berrak zonlar (anti-bakteriyel etki).

suşuna klonlanmasıyla elde edilen QSI-1 suşudur (Quorum Sensing Inhibitör Seçicisi). Bu rekombinant suş bitki ekstraktları içindeki AHL inhibitörlerini konsantrasyonlarından bağımsız olarak geniş spektrumlu bir seviyede taramaya olanak sağlar. Bu sistemde QS sinyallerinin varlığında, *PluxI* promotörü önündeki *phlA* geninin aktivasyonu sonucu hücre ölümüne neden olan fosfolipid A maddesi sentezlenir. Toksik olmayan bir QS inhibitörü varlığında ise *phlA* aktivitesi inhibe edilir ve hücre bölünmesi normal olarak gerçekleşir. QSI-1 sistemindeki *E. coli Lac+* dir. Bu durum anti-QS bileşiklerin varlığında, X-gal substratı içeren besiyerlerinde mavi bir halka oluşumunu sağlar ki bu halka o bölgede hücre üremesinin işaretidir. Ekstrenin konulduğu bölge ile mavi halka arasında ise ekstrenin miktarına bağlı olarak bakteriyi öldürücü bir etki sonucunda büyümenin olmadığı ya da az olduğu bir zon (toksik bölge) oluşmaktadır⁽⁸⁾.

Aynı araştırmacıların geliştirdiği diğer bakteri suşları ise bu anti-QS bileşiklerin hayvan modellerindeki etkinliğini ölçmeye yöneliktir. Burada *P. aeruginosa*'nın *lasB-gfp* ya da *rlhA-gfp* füzyon yapılarını taşıyan iki suşu kullanılır. Uygun QS sinyalleri varlığında bu genlerin uyarımı sonucu *gfp*'ye bağlı olarak floresans oluşacak; anti-QS moleküllerin varlığında ise bu floresans indirgenecektir. Bu suşlarla farelerde enfeksiyon oluşturulmasında ölüme neden olmayacak dozun belirlenmesi yapılır. Daha sonra implant ya da enjeksiyonla alginatlar içindeki rekombinant suşlarla fare solunum sisteminde enfeksiyon oluşturulur. Bu şekilde oluşturulan hayvan deneysel modellerinde, anti-QS bileşiklerin etkileri floresans mikroskopta incelenen örneklerde *gfp*-negatif bir fenotipin oluşumuyla belirlenebilir. Örneğin, furanon türevi olan C-30'un uygulandığı farelerde bu maddenin belli miktarlarda her sekiz saatte bir uygulanmasının enfeksiyonu önlediği saptanmıştır⁽⁸⁾. Yukarıda kısaca açıklanan bu test sistemi ilaç geliştirmede aday olabilecek QS inhibitörlerinin etkinliğini ve toksisitesini 2-3 haftada belirleyebilmektedir.

Anti-QS belirlemelerde bakterilerde QS aracılığıyla oluşturduğu bilinen fenotipler kullanılabilir (Örn. Kayma ve yüzme testleri). *P. aeruginosa* PAO1, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* ve *E. coli*'de anti-QS aktivite, kayma testine göre bitki ekstraktlarıyla hazırlanan yumuşak agarlı ortamlara eklenen bakterilerin gece boyu üretimi sonucunda inokülasyonun yapıldığı

noktadan çevreye doğru yayılmanın ölçülmesiyle ve yine benzer şekilde yüzme testine göre inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan bulanıklığın çapının ölçülmesiyle belirlenebilir⁽⁹⁻¹¹⁾. Yine aynı bakterilerde biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimi spektrofotometrik ve ışık mikroskobu ile analiz edilmiştir⁽¹¹⁾.

Ayrıca son yıllarda *P. aeruginosa* suşlarında virulans faktörlerin (LasA proteaz, LasB elastaz, piyoverdin ve piyosiyenin) üretimi; *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica* ve *Aeromonas hydrophila*'da AHL moleküllerinin, biyofilm oluşumunun ve karbapenem aktivitesinin inhibisyonu ve *P. solanacearum* suşuyla yapılan kuyu difüzyon yöntemi, QS inhibisyonunun analizi için kullanılmaya başlanmıştır⁽¹²⁻¹⁶⁾.

BİTKİSEL ANTI-QS BİLEŞİKLER

İlaç sanayinde öncül hammadde oluşturan pek çok bitkisel bitkilerden elde edilmektedir. Bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri reçeteli ilaçların %25'ine yakını oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak QS inhibisyonu gösteren bileşiklerin bitkilerde araştırılması önemli bir yaklaşımdır. Yapılan genel taramalarda nadir bulunan bitki türlerinde, tıbbi bitkilerde ve kestane balında anti-QS aktivite olduğu gösterilmiştir (Tablo 1). Güney Florida orijinli tıbbi bitkilerde anti-QS açısından bir tarama yapılmış ve 50 bitki türünden altısında anti-QS aktivitesi saptanmıştır⁽⁷⁾. Söz konusu çalışmada *C. violaceum*'a dayalı belirleme yapılmıştır. Ayrıca, *Medicago sativa*, vanilya, sarımsak, ülkemiz kökenli *Scorzonera sandrasica*, *Ananas comosus*, *Musa paradisiaca*, *Manilkara zapota* ve *Ocimum sanctum*, *Sonchus oleraceus* ve *Laurus nobilis*'de QS'i baskılayan bileşiklerin olduğu belirlenmiştir^(5,17-22). Yine dokuz tıbbi bitkinin esansiyel yağları ile yapılan bir çalışmada gül (*Rosa damascena* L.), lavanta (*Lavandula angustifolia* L.), turnagagası (*Geranium robertianum* L.) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) esansiyel yağlarında QS inhibisyon potansiyeli gösterilmiştir⁽²²⁾. Hindistan florası tıbbi bitkilerinde, epigallokateşin gallat bakımından zengin yeşil çay (*Camellia sinensis* L.) preparatından, akasya ağacından elde edilen bazı ekstraktlarda, *Syzygium aromaticum*'dan elde edilmiş bitkisel yağlarda, Kolombiya florası kökenli *Piper* sp., *Ocotea* sp. ve *Lippia alba*'nın esansiyel yağlarında çeşitli seviyelerde anti-QS aktivitesi gözlenmiştir^(9,10,16,23-25).

Tablo 1. Anti-QS aktivitesi olduğu bilinen bazı bitki türleri.

Türler	Anti-QS etki gösteren ekstre/saf madde	Kullanılan biyomonitor suşlar
<i>Syzygium aromaticum</i>	Esansiyel yağlar	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>Geranium robertianum</i> L. <i>Lavandula angustifolia</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Eucalyptus globulus</i> L. <i>Citrus sinensis</i> L.	Esansiyel yağlar	<i>C. violaceum</i>
<i>Lippia alba</i> <i>Ocotea sp.</i>	Esansiyel yağlar	<i>P. putida</i> <i>E. coli</i>
<i>Phyllanthus niruri</i> <i>Moringa oleifera</i> <i>Solanum indicum</i> <i>Solanum xanthocarpum</i>	Etanol ekstresi	<i>Erwinia carotovora</i> <i>P. solanacearum</i>
<i>Malus domestica</i> var. <i>Annurca</i>	Etanol ekstresi	<i>C. violaceum</i>
<i>Acacia nilotica</i> L.	Hidrolize etil asetat fraksiyonu ve hidrolize kaba ekstresi	<i>C. violaceum</i>
<i>Terminalia catappa</i>	Etil asetat ekstresi	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Hemidesmus indicus</i> L. <i>Holarrhena antidysenterica</i> <i>Mangifera indica</i> L. <i>Punica granatum</i> L. <i>Psorelea corylifolia</i> L.	Etanol ekstresi	<i>C. violaceum</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>Camellia sinensis</i> L.	Epigallokateşin gallat	<i>C. violaceum</i>
<i>Cuminum cyminum</i>	Metil öjenol (ME)	<i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>C. violaceum</i> <i>V. harveyi</i>
<i>Capparis spinosa</i>		<i>P. mirabilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. marcescens</i> <i>C. violaceum</i> <i>E. coli</i>
<i>Conocarpus erectus</i> <i>Bucida buceras</i> <i>Callistemo viminalis</i>	Su ekstresi	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Myristica cinnamomea</i>	Metanol ekstresi	<i>P. aeruginosa</i>
Kestane balı	Su ekstresi	<i>E. carotovora</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>

Sitrus flavonoidlerinin *V. harveyi* ve bir *E. coli* suşunu, bakteriyel hücre-hücre sinyallesine ket vurarak biyofilm oluşumunu engellendiği çok yeni bir çalışmada bildirilmektedir⁽²⁶⁾.

QS'in bloke edilmesi temelde üç yolla gerçekleşebilir: (i) Sinyal (AHL) üretiminin durdurulması, (ii)

AHL sinyal moleküllerinin etkisizleştirilmesi (iii) AHL reseptörünün (LuxR homologları) engellenmesi. Ancak, bu yolların dışında da dolaylı olarak QS'e bağlı fonksiyonlar engellenebilir. Örneğin, sentetik bir pirimidin türevi olan 4-nitro-piridin-N-oksit (4-NPO), *P. aeruginosa*'da QS'e bağlı çalışan genlerin %37'sinin aktivasyonunu engelleyerek biyofilm

oluşumunu azaltmıştır⁽²⁷⁾. Dolayısıyla, karmaşık bir mekanizma olan QS'in önlenebileceği doğrudan ya da dolaylı birden fazla yol bulunabilir.

Bitkilerdeki belirli bileşik gruplarının ya da ekstrelerin ayrı ayrı incelenmesi çalışmalarını ayrıntılandırmak bakımından önem taşır. Ancak, bu şekilde ekstrlerdeki anti-QS aktiviteye neden olan esas bileşiklerin tanımlanması ve etki mekanizmalarının bulunması olanaklı olabilir. Örneğin, mısırdan tarçına kadar 21 farklı bitki türünün esansiyel yağlarının incelendiği bir çalışmada, karanfil yağında anti QS aktivitesi gözlenmiştir⁽⁹⁾. *C. violaceum*'un 12472 ve CVO26 mutant suşlarında açıkça gösterilen bu aktivite konsantrasyona bağlı olarak değişmiştir (2µl'den düşükte yok; 4-8µl'de var ve 20µl'de anti-mikrobiyal aktivite). Bitkisel yağlar çok çeşitli bileşikler içermekte ve bunlar gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemleri ile açığa çıkarılabilmektedir. Aynı çalışmada yapılan analizlerde karanfil yağının içerisinde öjenolun yoğun olarak bulunduğu (%74.32), ancak anti-QS aktivite göstermediği belirlenmiştir. Buna göre yağ içerisindeki bileşenlerin tek tek ya da sinerjetik şekilde anti QS aktivite göstermesi bir olasılıktır. Tropikal bir mimoza türü olan *Acacia nilotica*'dan farklı çözücülerle hazırlanan sekiz ekstreten birinde anti-QS aktivite görülmüştür⁽²⁴⁾. Güney İtalya'ya özgü bir elma varyetesinde ise fenolik bileşenler tek tek incelendiğinde anti-QS aktivite göstermemiş ancak total ekstretenin anti-QS etkili olduğu saptanmıştır⁽²⁸⁾.

Bitkilerde yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda anti-QS aktivite biyomonitör suşlarla ortaya konabilmektedir, ancak ekstrlerde hangi moleküllerin hangi mekanizma ile QS'i önlediğinin belirlenmesi daha detaylı çalışmaları gerektirir.

YENİ İLAÇ GELİŞTİRMEDE ANTI-QS BİLEŞİKLER

Bakteri kökenli enfeksiyonların önlenmesindeki en önemli sorun bakterilerin birden fazla antibiyotige karşı direnç geliştirmesidir. Bu direnç gelişiminin en temel nedenlerinden biri antibiyotik kullanımının bakteri üremesi üzerindeki seçici baskısıdır. Bu nedenle, QS mekanizması bakterileri öldürmeksizin onların patojenik özelliklerinin kontrol edilebilmesini sağlayan yeni nesil anti-mikrobiklerin geliştirilme-

sini sağlayabilir. Günümüzde bu bileşiklerin eldesi için çeşitli bitki türlerinin tarandığı çalışmalara örnekler yukarıda verilmiştir. Anti-QS aktivitesi tanımlanmış olan bitki ekstrlerinde bu etkinin oluşmasında hangi madde ya da madde gruplarının rol oynadığının tespit edilmesi, fraksiyonlama ile başlayan ve HPLC, LC-MS gibi biyokimyasal analizlere dayanan bir seri çalışmayı gerektirir. Sonraki aşama ise bu madde ya da madde gruplarının QS üzerindeki etki mekanizmasını araştırmaktır. Bu etkiler doğrudan QS ile ilişkili gen ya da gen ürünlerinde olabileceği gibi, QS'e bağlı fonksiyonların dolaylı yünden önlenmesi şeklinde de olabilir. Bu etkilerin ortaya çıkarılması hiç kuşkusuz anti-QS madde belirlemelelerinden daha uzun süren zaman alıcı ve detaylı moleküler çalışmalardır.

QS'e bağlı inhibisyonun klasik ilaçlarla yapılan tedavilere göre çeşitli avantajları olabilir. Bu çeşit bir yaklaşım bakteri hücreleri üzerinde seleksiyon oluşturacak mutasyonları ve ilaç direncini sınırlayabilmektedir. Ayrıca spesifik olarak tek bir bakteri popülasyonu hedeflendiğinden, konağa yararlı olabilecek diğer bakteri florası etkilenmeyecektir. Bakterileri doğrudan öldürmeyerek, ölü bakterilerden salınan ve septik şok gibi semptomlara neden olan toksik lipopolisakaritlerin ortama salınması önlenmiş olacaktır⁽²⁹⁾.

Diğer yandan günümüzde QS'den sorumlu olan birçok sinyal ve yolaklar henüz tam anlamıyla açıklanmış değildir. Ayrıca bakteriler arası çapraz iletişime (cross-talk) dair bilgiler yetersizdir. Çapraz iletişim spesifik türlerde çoğalmayı ve enfeksiyonu önleyebilecek antagonist sinyallerin bulunmasını sağlayabilir⁽³⁰⁾. İkinci olarak, QS'e bağlı olarak bakterilerin kontrolü sağlanabilse dahi bu ilaçların teşhis ve tedavinin hangi süreçlerinde kullanılabileceği belirsizdir. Örneğin, bu moleküller oluşmuş biyofilmleri ortadan kaldırmayacak, ancak yeni biyofilm oluşumlarını önleyebilecektir⁽²⁹⁾. Bakterilerce oluşturulan hastalıkların teşhisi belirli bir zaman aldığından QS inhibitörlerinin kullanımı zaten oluşmuş bir hastalığın önlenmesinde etkili olmayabilir. Bu değerlendirmelere karşın QS alanındaki çalışmalar hızla artmakta ve yeni bulgular farklı bakış açıları kazandırabilmektedir.

SONUÇ

QS mekanizmasının biyokimyasal olarak kontrol edilebilmesi, bakterilerin ilişkili olduğu tüm alanlarda (Tıp, tarım, gıda, endüstri, vb. gibi) çeşitli uygulamalara yansiyabilir. Bu uygulamaların başında yeni terapötiklerin geliştirilmesi gelmektedir. Mikrobiyoloji ve moleküler genetik temelli yaklaşımlar doğal bileşiklerin anti-QS aktivitesini saptamada hızlı ve güvenilir olarak kullanılabilir. Farklı coğrafyalarda yetişen bitki türlerinde gerek ekstre gerekse bileşik grupları olarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve birçok anti-QS etkili örnekler elde edilmiştir. Buna karşın ekstrelerde anti-QS aktivitenin moleküler düzeyde nasıl sağlandığına ilişkin bulgular yetersizdir. Model bakterilere ek olarak diğer türlerde QS'in işlevişi mekanizmasında rol oynayan gen ve ürünlerin tanımlanarak, bunların etki mekanizmalarının incelendiği yeni araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Sifri CD. Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1070-6. <http://dx.doi.org/10.1086/592072> PMID:18781869
2. Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14446-51. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.222336799> PMID:12393811 PMCID:137903
3. Pentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003; 22:3803-15. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg366> PMID:12881415 PMCID:169039
4. McLean RJ, Pierson LS, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods* 2004; 58:351-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.016> PMID:15279939
5. Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42:637-41. PMID:16706905
6. Shaw PD, Ping G, Daly SL, et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6036-41. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
7. Adonizio AL, Downum K, Bennett BC, Mathee K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol* 2006; 105:427-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.025> PMID:16406418
8. Bjarnsholt T, Gennip M, Jakobsen TH, Christensen LD, Jensen P, Givskov M. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature protocols* 2010; 5:282-93. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.205> PMID:20134428
9. Khan MS, Zahin M, Hasan S, Husain FM, Ahmad I. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49:354-60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02666.x> PMID:19627477
10. Zahin M, Hasan S, Aqil F, Khan MS, Husain FM, Ahmad I. Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quorum sensing activity. *Indian J of Exp Biol* 2010; 48:1219-24. PMID:21250604
11. Abraham SVPI, Palani A, Ramaswamy RB, Shunmugiah PK, Arumugam RV. Anti quorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. *Arc Med Res* 2011; 42:658-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.12.002> PMID:22222491
12. Adonizio A, Kong KF, Mathee K. Inhibition of QS-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south florida plant extracts. *AAC* 2008; 52:198-203.
13. Chong YM, Yin WF, Ho CY, et al. Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-QS activity. *J Nat Prod* 2011; 74:2261-4. <http://dx.doi.org/10.1021/np100872k> PMID:21910441
14. Taganna JC, Quanico JP, Perono RMG, Amor EC, Rivera WL. Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylococcal activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ethnopharmacol* 2011; 134:865-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.028> PMID:21291979
15. Truchado R, Gil-Izquierdo A, Tomás-Barberán F, Allende A. Inhibition by chestnut honey of N-acyl homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila*. *J Agric Food Chem* 2009; 57:11186-93. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9029139> PMID:19950997
16. Kumar MR, Sathyabama S, Ramathilagam RD, Priyadarisini VB. Anti-QS activity of medicinal plants and detection of N-acyl homoserine lactone signal molecules. *Int J Integrative Biology* 2011; 11:21-5.
17. Keshavan ND, Gowdhary PK, Haines DC, Gonzalez JE. L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2005; 187:8427-36. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.24.8427-8436.2005> PMID:16321947 PMCID:1317012
18. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI Selector. *J Bacteriol* 2005; 187:1799-814. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005> PMID:15716452 PMCID:1063990
19. Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Ugur A, Ceylan O. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Curr Microbiol* 2007; 55:114-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-006-0624-2> PMID:17597339
20. Musthafa KS, Ravi AV, Annapoorani A, et al. Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the N-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 2010; 56:333-9. <http://dx.doi.org/10.1159/000320185> PMID:20720417
21. Al-Hussaini R, Mahasneh AM. Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules* 2009; 14:3425-35. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14093425> PMID:19783935
22. Szabó MA, Varga GZ, Hohmann J, et al. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother Res* 2010; 24:782-6. PMID:19827025
23. Taganna JC, Rivera WL. Epigallocatechin gallate from *Camellia sinensis* L. (Kuntze) is a potential QS inhibitor in *C. violaceum*. *Science Diliman* 2008; 20:24-30.
24. Singh BN, Singh BR, Singh RL, Parakash D, Sarma BK, Singh HB. Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food Chem Toxicol* 2009; 47:778-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.009>

- PMid:19168114
25. **Olivero JT, Pajaro NP, Stashenko E.** Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus Piper. *Vitae* 2011; 18:77-82.
26. **Vikram A, Jesudhasan PR, Jayapraksha GK, Pillai SD, Patil B.** Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology* 2011; 157:99-110. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.041228-0>
PMid:20864476
27. **Rasmussen TB, Givskov M.** Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:149-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>
PMid:16503194
28. **Fратиани F, Coppola R, Nazzaro F.** Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar annurca. *J Med Food* 2011; 14:957-63. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2010.0170>
PMid:21476926
29. **Ni N, Li M, Wang J, Wang B.** Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev* 2009; 29:65-124. <http://dx.doi.org/10.1002/med.20145>
PMid:18956421
30. **Avcı MK, Sezen Y, Gürel F ve ark.** The effect of quorum sensing signal molecules of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* on Nisin production of *Lactococcus lactis* (Quorum Sensing Cross-Talk analysis). 15. National Biotechnology Congress Kitabı, 28-31 Ekim 2007, Antalya: Turkey. Sayfa 348-350.