T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

ÇOK İLACA DİRENÇLİ PSEUDOMONAS AERUGİNOSA SUŞLARININ OLUŞTURDUĞU BİYOFİLME ANTİBİYOTİKLE BİRLİKTE HİPERBARİK OKSİJENİN ETKİNLİĞİ

Dr. Muhammed YILDIRIM

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Şamil AKTAŞ

İSTANBUL 2025

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2025-41425

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ V

KISALTMALAR.....VII

TABLOLAR DİZİNİ X

ŞEKİLLER DİZİNİ.....XI

RESİMLER DİZİNİ.....XII

ÖZET/ ABSTRACT.....1

I. GİRİŞ.....3

II. GENEL BİLGİLER.....5

A. Biyofilm.....5

1. Biyofilm Tanımı ve Tarihçesi.....5

2. Biyofilm Oluşumu.....6

a. Yüzeye Tutunma.....6

b. Mikrokoloni Oluşumu.....8

c. Matriks Üretimi.....9

d. Olgunlaşma ve Farklılaşma.....10

e. Ayrılma.....12

3. Pseudomonas aeruginosa ve Biyofilm.....12

4. Biyofilmde Antibiyotik Direnci Mekanizmaları.....14

a. Fiziksel Bariyer Etkisi.....14

b. Yavaş Büyüme Hızı ve Metabolik Adaptasyon.....15

c. Persister Hücreler.....16

d. Genetik Adaptasyon.....16

5. Biyofilm ile İlişkili Kronik Enfeksiyonlar.....17

a. Solunum Yolu Enfeksiyonları.....17

b. Yara Enfeksiyonları.....18

c. İmplant ve Kateterle İlişkili Enfeksiyonlar.....19

6. Klinik Önemi ve Tedavi Yaklaşımları.....21

a. Antibiyofilm Stratejileri.....21

b. Hiperbarik Oksijen Tedavisi ve Biyofilm.....22

B. Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....24

1. Tanım ve Tarihçe.....24

2. Fiziksel Temelleri.....27

a. Boyle Gaz Kanunu.....27

b. Charles ve Gay-Lussac Gaz Kanunları.....27

c. Henry Gaz Kanunu.....28

d. Dalton Gaz Kanunu.....28

3. Fizyolojik Etkileri.....29

a. Basınca Bağlı Doğrudan Etkiler.....29

b. Kısmi Oksijen Basıncı Artışına Bağlı Etkiler.....29

(1) Kardiyovasküler Etkiler ve Anti-Ödem Etki.....31

(2) Anti-Toksik Etki.....31

(3) Anti-Bakteriyel Etki.....31

(4) Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri.....32

4. Endikasyonları.....34

5. Kontrendikasyonları.....38

6. Komplikasyonları.....40

a. Barotravmalar.....40

b. Oksijen Toksisitesi.....40

III. AMAÇLAR.....41

IV. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....42

A. Çalışma Materyali ve Dizaynı.....42

B. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Saklanması.....42

C. Bakterilerin Antibiyotik Direncinin Tanımlaması.....42

D. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi.....45

1. Spektrofotometre ile Gösterilmesi.....45

2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Gösterilmesi.....47

E. Grupların Belirlenmesi.....49

F. Kolistin ve Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması.....49

1. Kolistin Sülfat Uygulanması.....49

2. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması.....50

G. Kolistin ve Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Biyofilm Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması.....52

1. Spektrofotometre ile Araştırılması.....52

2. Koloni Sayımı Yöntemi ile Araştırılması.....53

3. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Araştırılması.....56

H. İstatistiksel Analiz.....57

V. BULGULAR.....57

A. Spektrofotometrik Yöntem Sonuçları.....57

B. Koloni Sayımı Sonuçları.....59

C. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop Sonuçları.....62

VI. TARTIŞMA.....66

VII. SONUÇ.....69

VIII. KAYNAKLAR.....70

ÖNSÖZ

Tıp Fakültesinde öğrenci iken benim için büyük bir heyecan uyandıran, adı kadar kendisi de ilgi çekici ve çok yönlü olan bölümümüzde büyük bir kararlılık ve merakla uzmanlık eğitimi aldığım süreçte bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, gerek branş gerekse hayat ile ilgili tecrübelerinden her fırsatta istifade etmemi sağlayan, bilimden aldığı ışıkla bizleri aydınlatan ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında, gelişmesinde ve sonuçlanmasında geçen emekleri için kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Şamil AKTAŞ'a,

Kafanızda ne kadar zor bir soru olursa olsun cevabını kolaylıkla alabileceğiniz, neşesi eksik olmayan, bu çalışmanın deney sürecine de katkıda bulunan değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Salih AYDIN'a,

Branşımızın temelini oluşturan dalış ile yakından ilgilenerek bizlere hekimliğin dışında dalgıç olmanın da önemini aşılayan ve yazarlığı ile hayat tecrübelerini aktaran Sayın hocam Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca bizlerden klinik bilgilerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Bengüsu MİRASOĞLU'na,

Bu tezin planlanma sürecinde ve deneylerde her zaman kapılarını çalıp bilgilerinden faydalandığım kıymetli hocalarım; Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Serap ŞİMŞEK YAVUZ'a ve bu çalışmanın gerçekleştirildiği KÜKENS Laboratuvarı'nı bana açan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a ve biyofilm konusunda engin tecrübelerinde faydalandığım İÜ. Diş Hekimliği Fakültesi'nden Prof. Dr. Emine Nursen TOPCUOĞLU'na,

Deneyler esnasında benimle beraber laboratuvara girip günlerce emek veren meslektaşım Uzm. Dr. Zarifa ORTA ve teknik anlamda desteğini hiç sakınmadan sunmak için vaktini cömertçe harcayan Laborant Cem ÜLKÜ'ye,

Kliniğimizin basınç odası operatörü ve teknik anlamda her şeyi olan, uzmanlık eğtimim süresince basınç odasını her ayrıntısıyla anlatan Cengiz ŞİMŞEK'e ve kliniğimizde görev alan bütün hemşire ve personellerimize,

Uzmanlık eğitimim boyunca bir arada çalışma fırsatı bulduğum, zorlukları ve sevinçleri birlikte yaşadığım, birbirimizden çok şey öğrendiğimiz, uzman olarak aramızdan ayrılan arkadaşlarıma ve şu an beraber çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma,

Fakültede aynı sıraları paylaştığım, dostluklarından başka bir şeyi görmediğim, tez sürecinde manevi desteklerini esirgemeyen Fatih ÖZGÜN, Niyazi YİGİT ve görevlendirmede geçirdiğim sürede kazandığım saygıdeğer arkadaşım Emre SAVAŞ'a,

Beni yetiştiren, doğruluğu ve dürüstlüğü her şeyin önüne koyan sevgili anneme, babama ve bütün aileme,

Hem zorda hem kolayda hep en yakınımda olan biricik eşim Berfin'e,

En içten dileklerimle teşekkür ederim.

Muhammed YILDIRIM, 2025

KISALTMALAR

AMP: Antimikrobiyal peptitler

aPDT: Fotodinamik terapi

ATA: Atmosfer Absolute

BAL: Bronkoalveolar Lavaj

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CFU: Colony Forming Unit

cGMP: Guanozin 3',5'-siklik monofosfat

CO: Karbonmonoksit

DAÜ: Diyabetik Ayak Ülseri

Dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik asid

ECHM: European Committee for Hyperbaric Medicine

eDNA: Çevresel DNA

EPS: Ekstrasellüler Polimerize Madde

ETA: Endotrakeal Aspirat

EUBS: European Underwater and Baromedical Society

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Fluorescein Diacetate

Fsw: Feet Sea Water

g/dl: Gram/Desilitre

HBO: Hiperbarik Oksijen

HBOT: Hiperbarik Oksijen Tedavisi

HOCl: Hipokloröz Asit

m^3: Metreküp

MDR: Multi Drug Resistant

MHB: Mueller-Hinton Broth

MİK: Minimum İnhibasyon Konsantrasyon

ml: Mililitre

mmHg: Milimetre Cıva

MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2

Msw: Meter Sea Water

NET: Neutrophil extracellüler trap

NO: Azot Monoksit

ºC: Santigrat

OD: Optik Dansite

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PDR: Pan-Drug Resistant

PHMB: Poliheksametilen biguanid

Pİ: Propidium İodür

PMN: Polimorfonükleer lökosit

PVC: Polivinil Klorür

QS: Quarum Sensing

RNA: Reoksiribonükleik Asid

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SGK: Sosyal Güvenlik Kurumu

SUT: Sağlık Uygulama Tebliği

TA: Toksin-Antitoksin

TSA: Triptic soy agar

TSB: Triptic Soy Brot

UHMS: Undersea and Hyperbaric Medical Society

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

XDR: Extremely Drug Resistant

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

V x π x r^2 x h: Hacim: Pi sayısı x yarıçap karesi x yükseklik

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. UHMS HBO Tedavisi Endikasyon Listesi.....35

Tablo 2. Sağlık Bakanlığı HBO Tedavisi Endikasyon Listesi.....36

Tablo 3. ECHM HBO Tedavisi Endikasyon Listesi.....38

Tablo 4. P. aeruginosa izolatlarının (n=15) Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Kolistin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi.....43

Tablo 5. A, B P. aeruginosa Suşlarının (N=15) ve Kontrol Suşlarının Mikroplak Üzerinde Yerlerinin Gösterilmesi.....47

Tablo 6. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Optik Dansite (OD) Sonuçlarının Ortalamaları(µm) ve Kontrol Grubu ile İstatistik Karşılaştırmaları.....58

Tablo 7. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU) Sonuçlarının Ortalamaları ve Standart Sapmaları.....59

Tablo 8. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU/ml) Sonuçlarının Ortalamaları ve Standart Sapmaları.....61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Biyofilm oluşumunun temel aşamaları.....7

Şekil 2. HBO Tedavi Tablosu.....51

Şekil 3. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Optik Dansite (OD) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması.....58

Şekil 4. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması.....60

Şekil 5. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU/ml) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması.....61

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. %10 Gliserinli ‘’Triptic Soy Broth’’ (TSB) İçinde -20ºc’de Saklanan Suşlar.....44

Resim 2. Kanlı Agarda Üreyen Pseudomonas Spp.....44

Resim 3. A, B, C, D Mikrodilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibator Konsantrasyonu (MİK) tespiti.....45

Resim 4. Suşların 5 Ml Triptik Soy Brot (TSB) İçeren Tüplerde 37ºc’de 18-24 Saat İnkübe Edilmesi.....46

Resim 5. 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakta bazal biyofilm oluşumu.....47

Resim 6. 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakta kristal viyole boyama işlemi.....47

Resim 7. İçinde Steril Disk Bulunan 6 Kuyucuklu Mikroplakta Bazal Biyofilm Oluşumu…..48

Resim 8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (Leica, TCS SP8 Ted, Leica Microsystems CMS Gmbh, Mannheim, Germany) 49

Resim 9. Kolistin Sülfat (512 mg/ml) Solüsyonunun Hazırlanması İşlemi.....50

Resim 10. Deneysel Basınç Odası.....51

Resim 11. Hazırlanan Kolistin Sülfat (512 mg/ml) Solüsyonunun Mikroplaklara Koyulması İşlemi.....52

Resim 12. Spektrofotometre ile Optik Dansite Ölçümü.....53

Resim 13. A, B 96 Kuyucuklu U Tabanlı Mikroplakta Bazal Biyofilm Oluşumu Öncesi ve Sonrası (24 Saat) 54

Resim 14. Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO03 Suşunun Triptic Soy Agar’da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler.....55

Resim 15. A, B Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO09 ve PO04 Suşlarının Triptic Soy Agar’da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler.....55

Resim 16. A, B Sadece HBO Uygulanan Gruptaki PO09 Suşunun ve Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO43 Suşunun Triptic Soy Agar’da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler.....56

Resim 17. Sonikatör Cihazı (Elmasonic P30H, Germany) 56

Resim 18. Plaklara 30 ºC'de 10 dk Banyo Sonifikasyon İşlemi Uygulanması.....56

Resim 19. PO01 (A) Ve PO03 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler) 62

Resim 20. PO04 (A) Ve PO06 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler) 63

Resim 21. PO09 (A) Ve PO11 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler) 63

Resim 22. PO18 (A) ve PO23 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler) 64

Resim 23. PO27 (A) ve PO40 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler) 64

Resim 24. PO42 (A) ve PO43 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler) 65

Resim 25. PO47 (A) ve PO54 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler) 65

Resim 26. PO55 numaralı suşun FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler) 66

ÖZET

Başlık: Çok İlaca Dirençli Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Oluşturduğu Biyofilme Antibiyotikle Birlikte Hiperbarik Oksijenin Etkinliği

Amaç: Bu çalışmada çok ilaca dirençli P. aeruginosa suşlarının oluşturduğu biyofilm tabakasına kolistin ve hiperbarik oksijen tedavisinin (HBOT) gerek tek başına gerekse kombine olarak etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Endotrakeal aspirasyon ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde üreyen çok ilaca dirençli P. aeruginosa suşları spektrofotometrede OD ölçümü için 96 kuyucuklu düz tabanlı ve konfokal lazer taramalı mikroskopta (CLSM) 3 odakta fotoğraflama için 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına koyuldu. Suşlar, kontrol, sadece HBO, sadece kolistin ve HBO+kolistin grupları için oluşturulan ayrı hücre kültürü plaklarına ekildi. Biyofilm oluştuktan sonra gruplara göre tedavileri uygulandı (HBO: 2.4 ATA'da 90 dk %100 oksijen, kolistin sülfat: 512 μg/ml). Sonrasında gruplar arası OD (595 nm), CFU değerleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Bütün suşların (n:15) biyofilm oluşturduğu CLSM ile fotoğraflandı ve OD ölçümü ile saptandı. Grupların OD sonuçları karşılaştırıldığında sadece kolistin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (p=0,009). Sadece HBO uygulanan grup ile kontrol arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Sadece kolistin uygulanan grup ile kolistin+HBO grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (p=0,130). Gruplar koloni sayımı yöntemiyle (CFU) karşılaştırıldığında kolistin grubunda kontrol grubuna anlamlı bir azalma (p<0,001) varken HBO ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,193). Tedavi grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kolistin+HBO kombine tedavi grupları ile yalnızca kolistin grubunda anlamlı fark yoktu (p=0,355).

Sonuç: Kolistinin gerek tek başına gerek HBOT ile kombine verildiğinde biyofilm tabakasında anlamlı ölçüde azalmayı sağladığı saptanmıştır. HBO tedavisinin biyofilm tabakasına karşı etkisiz olduğu gözlemlenmiştir.

ABSTRACT

Title: The Effect of Antibiotic and Hyperbaric Oxygen on Biofilm Formed by Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Strains

Objective: This study aimed to investigate the effects of colistin and hyperbaric oxygen therapy (HBOT), both alone and in combination, on biofilm formation by multidrug-resistant P. aeruginosa strains.

Materials and Methods: Multidrug-resistant P. aeruginosa strains grown in endotracheal aspiration and bronchoalveolar lavage samples were plated in 96-well flat-bottom cell culture plates for spectrophotometric OD measurement and in 6-well cell culture plates for confocal laser scanning microscope (CLSM) imaging at 3 focuses. The strains were seeded in separate cell culture plates for the control, HBO alone, colistin alone and HBO+colistin groups. After biofilm formation, treatments were applied according to the groups (HBO: 2.4 ATA for 90 min %100 oxygen, colistin sulfate: 512 μg/ml). OD (595 nm) and CFU values were then compared between the groups.

Results: Biofilm formation of all strains (n: 15) was determined by CLSM photography and OD measurement. When the OD results of the groups were compared, a significant decrease was found in the colistin-only group compared to the control group ($p=0.009$). No significant difference was found between the HBO-only group and the control group. Also no significant difference was found between the colistin-only group and the colistin+HBO group ($p=0.130$). When the groups were compared using the colony count (CFU) method, a significant decrease was found in the colistin-only group ($p<0.001$) while no significant difference was found between the HBO and control groups ($p=0.193$). When the treatment groups were compared, there was no significant difference between the colistin+HBO combined treatment groups and the colistin alone group ($p=0.355$).

Conclusion: Colistin was found to significantly reduce biofilm formation, both alone and in combination with HBOT. It was concluded that HBO treatment was ineffective against biofilm formation.

I. GİRİŞ

Biyofilm tabakası, mikroorganizmaların salgıladığı, primer olarak kapalı ekstrasellüler polimerik madde içeren bir tabakadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar serbest dolaşan planktonik bakterilerden farklı fenotipik özellikler gösterirler. Bu özelliklerin bir sonucu olarak tedavi yöntemlerine daha fazla direnç göstererek hastalığın kronikleşmesine neden olurlar [1].

Bazı mikroorganizmalar, gerek canlı yüzeylerde, gerekse yabancı cisimler üzerinde, biyofilm tabakası oluşturabilmektedir. Canlı yüzeylerde biyofilm tabakasının varlığına kistik fibroz, periodontit, kronik osteomyelit, diyabetik ayak enfeksiyonları, kronik prostatit gibi enfeksiyonlar örnek verilebilir. İnsanlarda kullanılan protez kalp kapakları, eklem protezleri gibi yabancı cisimlerin yüzeylerinde de başta stafilokoklar olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar biyofilmler oluşturarak tedavisi oldukça güç olan infeksiyonlara yol açmaktadır. Doğada da içme ve endüstriyel su sistemlerinde, petrol boru hatlarında çok çeşitli mikroorganizmaların biyofilm oluşturduğu bilinmektedir [2].

Biyofilm oluşturabilen bakteri hücreleri, kendi türlerinden azalmış büyüme hızı ve metabolizmaları, bazı spesifik genlerinin regülasyonunun artması veya azalması ile ayrılır. Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklerle tedavisi birçok nedenle güçleşir; bunun en önemli nedenlerinden biri biyofilmin temelini oluşturan ekstrasellüler polimerik maddenin antibiyotik geçişi için bir bariyer oluşturmasıdır. Diğer bir neden, biyofilm içindeki bakterilerin çoğalma hızını yavaşlatmasıdır. Bazı antibiyotikler esas olarak çoğalan hücreleri hedeflediği için bu durum etkilerini azaltır. Son olarak biyofilm içindeki bakteri hücreleri arasında direnç genleri dahil mobil genetik elemanların alışverişi kolaylaşır. Sonuç olarak biyofilm bulunan infeksiyonlarda, biyofilm içindeki etken bakterilerde hem antibiyotik toleransı hem de antibiyotik direnci, biyofilm içinde olmayan aynı türdeki planktonik bakterilere göre çok daha sık görülür. Bu nedenle biyofilm oluşmuş infeksiyonlarda, daha uzun tedavi sürelerine rağmen tedavi başarısızlığı, morbidite ve mortalite daha sık görülmektedir [3,4].

Hiperbarik Oksijen Tedavisi (HBOT) 1 Atmosfer Absolute (ATA)'dan daha yüksek basınçlı bir ortamda 100% oksijen solunması ile gerçekleştirilen bir tedavidir. HBOT, karbonmonoksit zehirlenmesi, dekompresyon hastalığı, aseptik nekroz, ani işitme kaybı, retinal arter oklüzyonu vs gibi endikasyonlar yanında; kronik osteomyelit, kronik yaralar, gazlı gangren, diyabetik ayak gibi enfeksiyonlarda da uygulanmaktadır [5].

Hiperbarik oksijen tedavisinin temel amacı türlü nedenlerle hipoksik bulunan dokularda yüksek oksijen parsiyel basıncı yaratılarak hücrelere aerobik solunum için gerekli oksijenin sağlanmasıdır. Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisinin yara iyileşmesi endikasyonlarında anjiogenez, antiödem ve antiinflamatuar etkilerinden; enfeksiyon ile ilişkili endikasyonlarda ise anaerob mikroorganizmalar üzerine direk bakterisitik-bakteriostatik etkiler, konak savunma faktörlerinin oksidatif stres etkisinin restorasyonu ve bazı antibiyotiklerle sinerjizm etkilerinden yararlanılır [6].

Son yıllarda biyofilm ilişkili infeksiyonların tedavisinde HBOT ve antibiyotik kombinasyonlarının uygulandığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda HBOT'un biyofilm tabakasını bozması, biyofilm içinde oluşmuş anoksik ortamın hiperoksik hale getirilmesi ile düşük metabolik etkinliğe sahip bakterilerin metabolizmasının hızlandırılarak dirençlerinin azaltılması, antibiyotiğin hücre içine alımının ve etkinliğinin artırılması gibi konular ele alınmaktadır. Ancak HBOT'un biyofilm tabakası üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar az sayıdadır ve bu konuda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır [7, 8].

II.GENEL BİLGİLER

A. Biyofilm

1.Biyofilm Tanımı ve Tarihçesi

Biyofilm, mikroorganizmaların yüzeylere tutunarak oluşturduğu, salgıladıkları polisakkarit ve protein içeren matriks içinde organize olmuş mikrobiyal topluluklardır. Bu yapı, bakterilere çevresel stres faktörlerine, konak savunmasına ve antimikrobiyal ajanlara karşı koruma sağlar. Biyofilm içindeki bakteriler planktonik formlarına kıyasla hem fenotipik hem de genotipik olarak önemli farklılıklar gösterir. Bu yapılar başta tıbbi cihaz yüzeyleri olmak üzere, kronik yara yataklarında da sıklıkla görülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda kronik yaraların %60'ında biyofilm yapılarının gözlendiği bildirilmektedir [9].

Biyofilmlerin tanımı ve gözlemlenmesi aslında mikrobiyolojinin erken dönemlerine kadar uzanır. 1684 yılında Antonie van Leeuwenhoek, diş plağı örneklerinde mikroskobik canlıları tanımlayarak biyofilmlerin varlığını ilk gözlemleyen kişi olmuştur. 20. yüzyılın başlarında Heukelekian ve Heller, deniz bakterilerinin, yüzeylere tutunarak daha etkin şekilde çoğaldığını göstermiştir. Zobell ise yüzeylerdeki mikrobiyal yoğunluğun çevresindeki ortama kıyasla çok daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Elektron mikroskobunun geliştirilmesiyle biyofilm yapılarına dair detaylı morfolojik incelemeler mümkün hale gelmiş ve bakterilerin çevresini saran matriksin temel bileşeninin polisakkarit olduğu gösterilmiştir [10].

Modern anlamda biyofilm teorisinin şekillenmesi 1970'li yıllara rastlar. 1975'te "biyofilm" terimi ilk kez su filtreleri üzerindeki mikrobiyal tabakaları tanımlamak için kullanılmıştır. 1977'de Niels Hoiby, kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde kronik enfeksiyon oluşturan bakteri kümelerini tanımlamış böylece biyofilm ile kronik enfeksiyonlar arasındaki ilişki kurulmuştur. Bu alandaki asıl dönüm noktası ise Bill Costerton'un 1978 yılında yayımladığı "How Bacteria Stick" adlı çalışmasıyla olmuştur. Bu makale ile bakterilerin yüzeylere tutunarak glikokaliks yapısı içerisinde organize olduğu ve bu yapının birçok mikrobiyal ekosistemde baskın olduğu fikri bilim camiasına sunulmuştur [11].

Costerton'un bu konudaki ilgisi, Kanada'da bir dağda yürüyüş yaparken kaygan bir yüzeyde kayıp düşmesiyle başlamıştır. Mikroskobik incelemeler, bu kaygan yapının ortamda bulunan planktonik bakterilerden çok daha yoğun sayıda bakteriyi barındıran bir biyofilm olduğunu göstermiştir. Daha sonra implantlar üzerindeki araştırmaları, kronik enfeksiyonların çoğunun biyofilm yapılarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, klasik

mikrobiyolojik kültür yöntemlerinin yetersizliğini gözler önüne sermiş ve enfeksiyonların tanı ve tedavisinde yeni bir yaklaşımı gündeme getirmiştir. Costerton'un öngörüsü, özellikle implant enfeksiyonlarında kültürle tanımlanamayan mikroorganizmaların biyofilm içinde yer aldığı ve Deoksiribonükleik asid (DNA) temelli tekniklerin bu süreçte önemli rol oynayabileceği yönünde olmuştur [12].

Biyofilm araştırmaları son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiştir. Konfokal lazer taramalı mikroskopi, elektron mikroskobu ve moleküler biyoloji tekniklerinin gelişimi, biyofilm yapılarının hem yapısal hem de genetik düzeyde daha ayrıntılı incelenmesine olanak sağlamıştır. Günümüzde bakterilerin hem doğada hem de insan vücudunda en yaygın yaşam formunun planktonik değil, biyofilm formu olduğu kabul edilmekte ve bu doğrultuda tedavi stratejileri geliştirilmektedir [9, 10].

2. Biyofilm Oluşumu

a. Yüzeye Tutunma

Biyofilm oluşumu basitçe aşağıdaki adımlardan oluşur **(Şekil 1)**:

-Bakterilerin Yüzeye İlk Tutunması (Geri Dönüşümlü)

-Bakterilerin Yüzeye Kalıcı Olarak Bağlanması (Sıkı Adezyon)

-Hücrelerin Çoğalarak Küçük Gruplar Halinde Birikmesi (Mikrokoloniler)

-Ekstrasellüler Polimerize Madde (EPS) Üretimi ve Olgun Biyofilm Yapısının Oluşumu

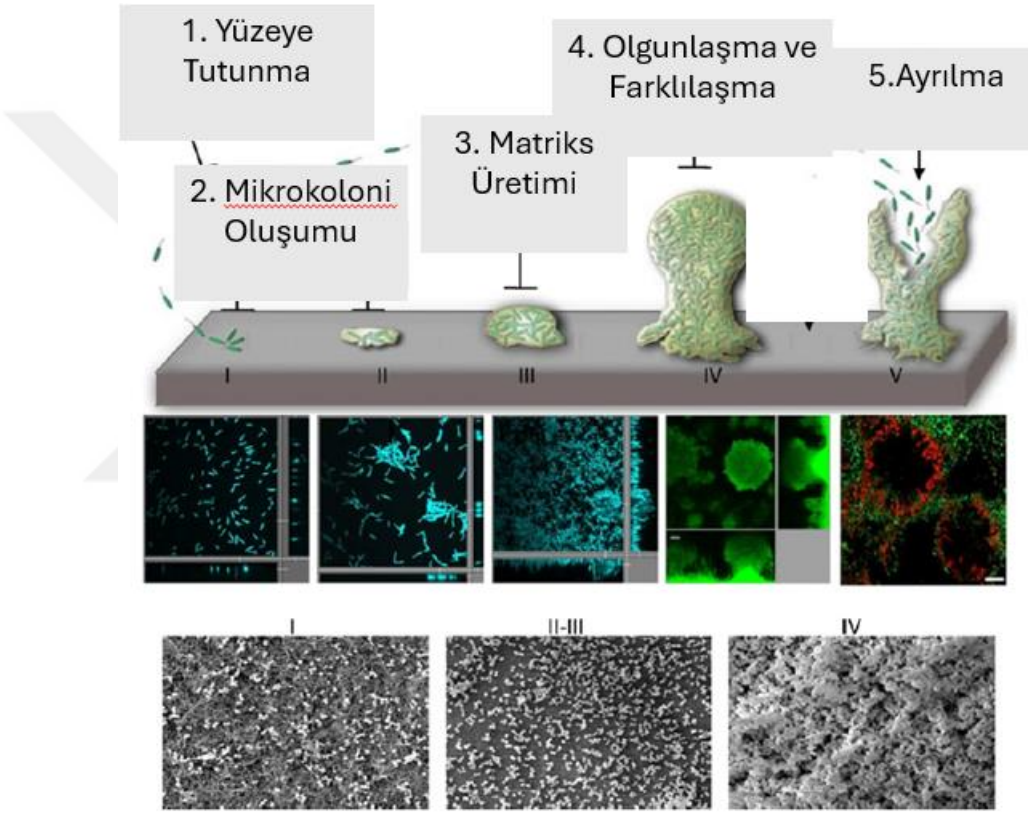
-Biyofilmden Serbest (Planktonik) Hücrelerin Ayrılarak Çevreye Yayılması

Biyofilm gelişiminin ilk ve en kritik adımı, bakterilerin bir yüzeyle temas ederek orada tutunmaya başlamasıdır. Bu süreç, genellikle "tersinir adezyon" olarak tanımlanır çünkü bakteri hücreleri bu aşamada yüzeye zayıf kuvvetlerle bağlanır ve halen ortamdan ayrılabilecek durumdadır. Bu tutunmada başlıca görev yapan yapılar flagella ve tip IV pilus gibi hareket organelleridir. Flagella yüzeye yaklaşmayı ve yön değiştirmeyi sağlarken, tip IV piluslar geri çekilme hareketleriyle yüzeyle fiziksel temas kurarak bakterinin bu yüzeyi algılamasına yardımcı olur. Pseudomonas aeruginosa gibi türlerde bu yapılar, yüzey algılamasında ve tutunma kararının verilmesinde önemli rol oynar [13].

Bu mekanik temas, hücre içi sinyal yollarını aktive ederek, adezyon ve biyofilmle ilişkili genlerin ekspresyonunu başlatır. Özellikle tip IV pilusun geri çekilmesi sırasında oluşan gerilimin, ikinci haberci sistemleri aktive ederek hücrede Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP)

düzeyini artırdığı gösterilmiştir. Artan cAMP bakterinin çevresine adaptasyonunu sağlayan gen ekspresyonlarını tetikler ve yüzeye daha kalıcı bağlanma için hücresel hazırlıkları başlatır [14].

Yüzeye ilk temas sonrası oluşan geçici bağlanma, çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkisiyle kalıcı hale gelir. Bu süreçte hücreler yüzeyi, hidrofobiklik derecesini, yüzeyin elektrik yükünü algılayarak tutunmanın devam edip etmeyeceğine karar verir. Yapılan çalışmalar, özellikle yüzey pürüzlülüğünün mikroorganizmanın tutunma derecesinde belirleyici olduğunu göstermiştir [15].



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun temel aşamaları [14]

İlk aşamada hücrelerin adezyon süreci sadece mikroorganizmaya ait faktörlerle değil, yüzeyin biyofiziksel özellikleriyle de şekillenir. Yüzey modifikasyonu çalışmaları göstermiştir ki özellikle hidrofobik yüzeylerde tutunma daha erken ve kuvvetli gerçekleşir. Bu nedenle yüzey mühendisliği yoluyla yapılan değişiklikler, biyofilm oluşumunu engellemede önemlidir. Bazı biyomalzemelerin yüzeyine plazma uygulamaları gibi fiziksel modifikasyonlar yapıldığında, ilk adezyon süreci ciddi şekilde baskılanabilmektedir [16].

Bakteri yüzeyle temas ettikten sonra morfolojik ve metabolik olarak aktif hale gelir. Bu aşamada ekstrasellüler polimerize maddelerin (EPS) üretimi başlar ve bu maddeler ilerleyen süreçte biyofilmin üç boyutlu yapısını oluşturur. EPS üretiminin başlaması, bakterinin yüzeyi kalıcı olarak kolonize etmeye karar verdiğini gösteren ilk biyokimyasal belirtidir. Aynı zamanda hücrelerin yüzeyde yayılmasını ve mikrokoloniler oluşturmaya başlamasını sağlar [17].

Yüzeye tutunan bakterilerin hücre içi metabolizması, bu geçiş sürecine uyum sağlayacak şekilde yeniden düzenlenir [18].

Özetle, biyofilm oluşumunun başlangıç noktası olan yüzeye tutunma süreci hem bakterinin genetik donanımı hem de çevresel ve yüzeysel koşulların birleşik etkisiyle şekillenir. Kalıcı tutunmanın başlaması, hücre dışı matriksin sentezini tetiklerken; bu matriksin gelişimi, kolonileşme ve olgun biyofilmin yapısal iskeletini oluşturur [19].

b. Mikrokoloni Oluşumu

Biyofilm oluşumunun ikinci aşaması olan hücresel çoğalma ve mikrokoloni oluşumu, yüzeye tutunan bireysel bakterilerin çoğalarak küçük, organize yapılar hâlinde kümelenmesiyle gerçekleşir. Bu mikrokoloniler biyofilmin üç boyutlu mimarisinin temelini oluşturur ve hücre-hücre etkileşimlerinin başladığı ilk organizasyonel birimlerdir [20].

Mikrokoloni formasyonu sadece çoğalma değil aynı zamanda ekstrasellüler matriks sentezi ve yüzeyle etkileşim gibi karmaşık biyolojik süreçleri içerir. Bazı bakterilerde, kapsül gibi yüzey yapıları, mikrokoloni formasyonuna gerek kalmaksızın biyofilm gelişimini başlatabilir. Örneğin Streptococcus pyogenes'te kapsül yapısı mikrokoloniye bağlı olmayan biyofilm formasyonunu desteklemektedir [21].

Mikrokoloniler, çevresel streslere karşı bakterilere avantaj sağlar. Hücreler bu yapılar içerisinde daha dirençli hâle gelir ve antibiyotiklere karşı korunaklı bir yapı oluştururlar [22].

Ayrıca, mikrokolonilerin morfolojisi ve dağılımı, genetik mutasyonlardan etkilenebilir. P. aeruginosa'da yapılan çalışmalarda, mutasyonların mikrokoloni dinamiğini değiştirdiği ve bu durumun biyofilmin yapısal çeşitliliğini artırdığı ortaya konmuştur [23].

S. mutans gibi bazı türlerde mikrokoloni gelişimi, EPS üretimiyle doğrudan ilişkilidir. Sakkaroz varlığında glukan üretiminin artması, mikrokolonilerin daha iyi şekilde gelişmesini sağlar. Bu glukanlar, bakterilerin yüzeye ve birbirlerine tutunmalarını kolaylaştırır [24].

Sakkarozla birlikte nişasta da biyofilm mimarisini etkileyebilir. Nişasta varlığında, EPS sentezi hızlanmakta, bu da daha büyük mikrokolonilerin oluşumuna neden olmaktadır. EPS yoğunluğu arttıkça, mikrokoloniler arası bağlantılar güçlenir ve yapı daha dirençli hâle gelir [24].

Çevresel faktörler de mikrokoloni gelişiminde etkilidir. Özellikle sıvı akımı ve ‘’shear stress’’ (kayma gerilimi) gibi mekanik faktörler, mikrokoloni organizasyonunu belirler. Staphylococcus aureus biyofilmlerinde, yüksek kayma gerilimine maruz kalındığında “kule” benzeri yüzeye vertikal mikrokoloniler geliştiği gösterilmiştir [25].

Bu süreçte EPS matriksinin üç boyutlu organizasyonu, mikrokolonilerin büyümesini yönlendirir. EPS, sadece hücreleri çevrelemekle kalmaz, aynı zamanda yüzeye bağlanmalarını sağlar ve mikrokoloniler arasında köprü kurarak yapısal bütünlüğü artırır [24].

Mikrokoloni oluşumu, biyofilmde hayatta kalma açısından kritik bir adaptif mekanizma olarak görülmektedir. Bu yapılar, bakterilerin fizyolojik dayanıklılığını artırır, difüzyon bariyerleri oluşturur ve biyofilm içindeki bakterilerin bütünlüğünü sağlar [22, 26]

c. Matriks Üretimi

Biyofilm oluşumunun temel yapı taşı aslında hücrelerin çevresini saran ve onları bir arada tutan ekstrasellüler matriks (EPS)'tir. EPS, bakterilerin ürettiği ve biyofilmin hem mimarisini hem de dayanıklılığını sağlayan bir yapıdır. EPS, polisakkaritler, çeşitli proteinler, çevresel DNA (eDNA), lipitler ve büyük oranda su içerir. Bu yapı sadece yapıştırıcı bir tabaka değil, aynı zamanda biyofilmin organizasyon, korunma ve iletişim ağıdır [27].

Her bakteri türü, matriksin bileşimini farklı oranlarda oluşturur. Örneğin P. aeruginosa’da yapışkanlık sağlayan aljinik asit, Psl ve Pel adlı polisakkarit maddeler ön plandayken, S. aureus gibi bakterilerde protein bazlı yapılar daha baskındır. Bu proteinler, bakterilerin yüzeye tutunmasını kolaylaştırır ve aralarındaki bağları güçlendirir. Bu sayede biyofilm hem kalıcı hâle gelir hem de dış etkilere karşı daha dirençli olur [28].

Biyofilm matriksinin yapısı yalnızca kimyasal bileşenleriyle değil, fiziksel özellikleriyle de mimariyi doğrudan etkiler. Özellikle esneklik, yapışkanlık ve sıkılık gibi nitelikler, biyofilmin dayanıklılığı ve formunda önemli rol oynar. Yüzeye yakın bölgelerde matriks daha yoğun bir yapıya sahiptir ve bu alanlar, dış etkenlere — örneğin sürtünme ya da antiseptik uygulamaları gibi — karşı adeta bir tampon görevi görür. Öte yandan, matriks içinde

yer alan mikroskobik kanallar, sıvıların, besin maddelerinin ve atıkların taşınmasını mümkün kılar [29, 30].

Bazı bakteri türlerinde matriks üretimi, biyofilmin her alanında eşit şekilde gerçekleşmez; üretim, genellikle belirli bölgelerle sınırlı kalır. Örneğin E. coli üzerinde yapılan çalışmalar, EPS'nin özellikle biyofilmin üst katmanlarında yoğunlaştığını ortaya koymuştur. Bu üst tabakalar, curli adı verilen lifli proteinler ve selülozla zenginleşmiştir. Böylece biyofilmin üst kısmı dış baskılara karşı daha dirençli hâle gelirken, alt katmanlar oksijen gibi hayati maddelere daha kolay erişim sağlayabilir [31].

Matriksin dayanıklılığı büyük ölçüde lifli proteinlerin varlığına bağlıdır. Bu proteinler, yapı iskeleti gibi davranarak hem hücreleri bir arada tutar hem de yapının dağılmasını önler. Bu lifler EPS içindeki diğer bileşenlerle etkileşim hâlindedir. Bu etkileşimler biyofilmi daha sağlam, daha kalıcı ve dirençli hâle getirir [32].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, biyofilm matriksinin yalnızca hücresel ürünlerden değil, aynı zamanda çevreden alınan maddelerle de şekillendiğini göstermiştir. Özellikle kalsiyum gibi minerallerin EPS içine gömülmesinin yapıyı daha sert ve dirençli kıldığı saptanmıştır. [33].

Yapılan yapısal analizlerde, biyofilmin içerdiği maddeler oran olarak da belirlenmiştir. Örneğin E. coli biyofilminde %85 oranında curli proteini ve %15 oranında selüloz tespit edilmiştir. Bu oranlar biyofilmin yoğunluğunu, kalınlığını ve geçirgenliğini doğrudan etkiler. Böylece her bakterinin oluşturduğu biyofilm kendine özgü bir mimariye sahip olmuş olur [34].

Sonuç olarak, biyofilm matriksi; yalnızca bir yapışkan örtü değil, çok katmanlı, dinamik ve fonksiyonel bir sistemdir. Matriks üretimi bakterilerin hem hayatta kalmasına yardımcı olur hem de yapısal olarak güçlü bir mikro-çevre oluşturur. Bu yapı, tıbbi cihaz enfeksiyonlarından kronik yaralara kadar birçok klinik tabloda bakterilere avantaj sağlayan ana etmendir [35].

d. Olgunlaşma ve Farklılaşma

Biyofilmin ilk evrelerinde yüzeye tutunan bakteriler zamanla çoğalır, kümelenmeye başlar ve mikrokoloniler oluşturur. Ancak bu başlangıç aşamasının ötesinde, hücrelerin daha organize hâle geldiği ve biyofilmin karmaşık bir yapı kazandığı bir evre başlar. İşte bu döneme olgunlaşma denir. Olgunlaşma süreci, hücrelerin yalnızca çoğalması değil, çevrelerine göre şekil değiştirmesi, görev paylaşımı yapması ve daha dayanıklı bir yapıya bürünmesi anlamına gelir [36].

Bu evrede biyofilm, artık basit bir hücre yığını olmaktan çıkar ve içinde farklılaşmış hücre tiplerinin yer aldığı, üç boyutlu yapı hâline gelir. Örneğin, Candida albicans'ta hem yuvarlak maya hücreleri hem de uzamış ipliksi (hiphal) hücreler bir arada bulunur. Bu çeşitlilik sayesinde biyofilm antifungal tedavilere karşı daha dirençli olur. Hücre tiplerinin farklılaşması, hücre içi genetik düzenlemelerle kontrol edilir ve bu süreç biyofilmin gelişiminde önemli bir yere sahiptir [37].

Benzer şekilde, E. coli bakterilerinde "curli" adı verilen lifli protein yapılar, olgun biyofilm oluşumunda önemli rol oynar. Bu lifler, bakterilerin birbirine sıkı tutunmasını sağlar ve biyofilmin fiziksel bütünlüğünü destekler. Curli üretimi olmayan suşlar, yapısal olarak zayıf ve dağınık biyofilmler oluşturur. Bu nedenle, curli gibi moleküller biyofilmin mekanik dayanıklılığı için temel yapı taşları arasında yer alır [38].

Olgunlaşma sürecinde hücreler arası iletişim de belirleyici bir rol oynar. Listeria monocytogenes'te bulunan agr sistemi, hücrelerin birbirine sinyal göndererek farklı davranışlara geçmesini sağlar bir nevi hücrenin yönelimini belirler. Bu sistem, özellikle biyofilmin ilk evresinde hücrelerin yüzeye tutunmasını artırırken, ilerleyen aşamalarda gen ekspresyonundaki değişikliklerle biyofilmin daha sağlam ve farklı yapılar oluşturmasına katkıda bulunur [39].

Biyofilmin olgunlaşması sırasında bakteriler, çevrelerinden gelen sinyalleri alarak hareket eder. Pseudomonas aeruginosa gibi türlerde, quorum sensing adı verilen hücreler arası iletişim sistemleri devreye girer. Bu sistemler, hücrelerin sayısına göre sinyal molekülleri üretir. Bu sinyallerde yeterli sayıya ulaşılınca, biyofilm içindeki hücrelerin ortak hareket etmesi sağlanır. Örneğin, bazı bakteriler rhamnolipid adı verilen özel maddeleri salgılayarak biyofilmin içinde düzgün kanallar oluşmasına katkıda bulunur [40].

Bazı durumlarda, biyofilmin nasıl şekilleneceği önceden programlanmış bir şemaya göre değil, çevre koşullarına verilen yanıtlara göre belirlenir. Yani aynı bakteri, farklı ortamlarda farklı biyofilm yapıları oluşturabilir. Besin içeriği, oksijen düzeyi, yüzey tipi gibi çevresel faktörler, biyofilmin mimarisini etkileyebilir. Bu da biyofilm gelişiminin oldukça esnek ve çevreden bağımsız olmayacağını gösterir [41].

Olgun bir biyofilm içinde hücreler arası görev dağılımının başladığından bahsedilebilir. Bazı hücreler matriks üretirken, bazıları hareket kabiliyeti kazanır, bazıları da çevresel strese karşı savunma görevini üstlenir. Tıpkı bir organizmadaki farklı hücrelerin farklı işlevler

üstlenmesi gibi, biyofilmdeki bakteriler de aralarında görev paylaşımı yapar. Bu sayede biyofilm daha verimli çalışır, daha dirençli olur ve uzun süre hayatta kalabilir [42].

e. Ayrılma

Biyofilmin son evresi olan ayrılma, mikroorganizmaların bulundukları yapıyı terk ederek çevredeki yeni bölgelere yayılmalarıyla sonuçlanır. Bu süreç, enfeksiyonun ilerlemesi açısından oldukça önem arz eder. Ayrılan bu hücreler çevreye dağılarak yeni biyofilm oluşumlarını başlatabilir [43].

Ayrılma farklı şekillerde gerçekleşebilir: bazı hücreler yüzeye zayıf bağlandığı için kolayca ayrılırken (desorpsiyon), bazıları dış etkenlerle yapının bozulması sonucu kopar (detachment). Asıl önemli olan ise bakterilerin kendi düzenledikleri aktif ayrılma sürecidir. Bu süreç, çevresel sinyallerle tetiklenir ve bazı genler tarafından kontrol edilir [44].

Bakteriler besin azaldığında, hipoksik bir ortam oluştuğunda ya da belirli sinyaller (quarum sensing) (düşük cGMP düzeyleri) aldıklarında ayrılmaya başlar. Bu sinyaller, hücre içi mekanizmaları harekete geçirerek biyofilmin parçalanmasını sağlar. Ayrılma hücreleri, genellikle özel proteinlerin etkisiyle matriksten kurtularak serbest hale gelir [45].

Matriksi parçalayan başlıca yapılar arasında bazı enzimler ve yüzey maddeleri yer alır. Örneğin Dispersin B ve aljinat liyaz gibi proteinler matriksi ayırma vazifesi görür. Ayrıca bakteriler rhamnolipid gibi maddelerle yüzey gerilimini düşürerek ayrılmayı kolaylaştırır. Bu yapıların birlikte çalışması, biyofilmin kontrollü bir şekilde çözülmesini sağlar [46].

Bu süreçte ayrılan bakteriler, biyofilm içindekilerden farklı özellikler gösterirler. Genellikle daha hareketlidirler ve çevrede yeni alanlara yerleşme potansiyelleri yüksektir [47].

Ancak bu durum konak için risk oluşturur. Ayrılan bakteriler, uygun koşullar bulduklarında enfeksiyonu yayabilirler. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bu durum sistemik enfeksiyonlara neden olabilir [48].

Toparlanacak olursa ayrılma süreci bakterilerin hayatta kalma stratejilerinden biridir. Bu mekanizma sayesinde hem yeni alanlara yayılabilirler hem de çevresel koşullara adapte olabilirler [49].

3. Pseudomonas aeruginosa ve Biyofilm

Pseudomonas aeruginosa, biyofilm içinde yaşarken karşılaşabileceği pek çok fiziksel ve kimyasal tehdide karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirir. Bu mikroorganizma, özellikle

kistik fibrozis gibi kronik enfeksiyonlarda uzun süreli konak yaşamına uyum sağlar. Bahsi geçen adaptasyon süreci zaman içinde hem genotipi hem de fenotipi ilgilendiren değişiklikler içerir [50].

Enfeksiyon sürecinin ilerlemesiyle birlikte bakteri mukoid fenotipine geçer. Bu fenotip bakterinin hem bağışıklık hücrelerinden korunmasını sağlar hem de biyofilm yapısının güçlenmesini sağlar. Düşük oksijen düzeyleri, nötrofil varlığı ve serbest radikaller gibi çevresel aktörler bu dönüşümde etkili olur [51].

Bağışıklık sistemiyle etkileşimde P. aeruginosa biyofilmleri özellikle polimorfonükleer lökositlerin (PMN) ve makrofajların bakterilere etkin şekilde ulaşmasını engeller. Bu konak savunmasını aşmada çok önemlidir. Bakterinin salgıladığı rhamnolipid gibi yüzey aktif moleküller, PMN'lerin membran bütünlüğünü bozarak apoptoza neden olabilir. Ayrıca biyofilm matriksi, immün hücrelerin infiltrasyonunu kısıtlayarak fagositoz etkinliğini düşürür [52]. Antibiyotikler biyofilme ulaştığında ise farklı bir direnç tablosu ile karşılaşılır. Bakteriler burada genellikle düşük metabolik hızda çalıştıklarından dolayı antibiyotiklerin etkisine karşı daha dirençlidir. Özellikle persister adı verilen bazı hücreler geçici olarak ilaca yanıt vermez, böylece tedavi sonrasında yeniden çoğalabilir [53].

Biyofilm yapısı ayrıca bakterinin mutasyon hızını artırır. Artan mutasyon oranı, özellikle oksidatif stresin etkisiyle ortaya çıkar ve zamanla antibiyotiklere karşı daha dirençli suşların gelişmesine sebep olabilir [54].

Uzun süreli enfeksiyonlarda, bakteri başta gösterdiği agresif karakterinden uzaklaşır. Virülans faktörleri azalır, yerine konak savunma sistemine daha az zarar veren ama uzun süreli yaşamı sürdürebilen bir fenotip ortaya çıkar. Bu dönüşümün bakterinin konakta daha uzun süre kalmasına olanak tanıdığı söylenebilir [55].

Bu süreçte efluks pompaları, sinyal yolakları ve hücre içi stres yanıtları gibi mekanizmalar aktive olur. cGMP gibi moleküller, hem biyofilm oluşumunu teşvik eder hem de hücrenin çevresel sinyallerle uyum içinde olmasını kolaylaştırır [56].

Ayrıca, kronik enfeksiyonlarda özellikle bazı genlerde meydana gelen mutasyonlar, bakteri fenotipini kalıcı olarak değiştirir. Bu değişimler, aljinat üretimi gibi bazı özellikleri artırırken, hareketlilik ve virülansı azalttığı saptanmıştır [57].

Quorum sensing sistemleri de adaptasyonda önemli rol oynar. Bu sistemler, bakterilerin birbirleriyle iletişimini sağlar ve çevresel koşullara göre birlikte hareket etmelerine olanak tanır. Böylece biyofilm içindeki yapı daha organize hale gelir [58].

Aynı hastada bile farklı bölgelerde yaşayan bakterilerin genetik yapılarında farklılık olabileceği gösterilmiştir. Bu durum, klinik olarak alınan tek bir örneğin tüm enfeksiyonu temsil etmeyebileceğini düşündürür. Bu da tanı ve tedavide sık kültür alınmasının önemine işaret eder [59].

Bazı araştırmalar, biyofilm içindeki küçük topluluklarda mutasyonların daha sık olduğunu göstermiştir. Bu mikrokoloniler, genetik çeşitliliğin ve ilaca dirençli suşların oluşumunda önemli bir rol oynayabilir [23].

Biyofilmdeki farklı bölgeler, oksijen ve besin miktarı bakımından eşit değildir. Bu da hücrelerin farklılaşmasına neden olur. Üst tabakalar daha aktiftir çünkü oksijene erişimleri daha kolaydır, alt bölgelerdeki hücreler ise düşük metabolizmaya sahiptir. Bu heterojen yapı, antibiyotiklere karşı farklı düzeyde tolerans gelişmesine neden olur [60].

Son olarak, stres yanıt sistemleri de antibiyotiklere karşı geçici tolerans geliştirilmesinde önemli rol oynar. Özellikle hipoksi, açlık ve duraklama evresinde (stationary phase) olan hücreler, antibiyotiklerin etkisine daha az duyarlıdır. Bu durum fenotipik geçişlerle ilgilidir ve genetik dirençten bağımsız gelişebilir [61].

4. Biyofilmde Antibiyotik Direnci Mekanizmaları

a. Fiziksel Bariyer Etkisi

Biyofilm direnç mekanizmaları içinde en temel yapısal bileşenlerden biri, ekstrasellüler polimerik matrikstir. (EPS). Bu yapı, bakteriler tarafından salgılanan polisakkaritler, proteinler, lipitler ve ekstrasellüler DNA (eDNA) gibi moleküllerin birleşiminden meydana gelir. EPS, biyofilmin hacimce büyük kısmını - yaklaşık %75 ila %90'ını - oluşturur ve hem fiziksel hem de kimyasal bir bariyer işlevi görür [30].

EPS tabakası, antibiyotiklerin biyofilme nüfuzunu fiziksel olarak kısıtlar. Özellikle pozitif yüklü antibiyotikler, matriksten geçerken negatif yüklü eDNA ve polisakkaritlerle etkileşime girerek yavaşlar ya da tamamen tutulur. Bunun sonucunda antibiyotiğin biyofilm içinde bakteri hücrelerine ulaşımı ciddi şekilde azalır [62].

P. aeruginosa gibi bazı bakteriler, EPS içinde bulunan spesifik polisakkaritler (aljinik asit, Pel ve Psl) sayesinde kendilerini hem antibiyotiklerden hem de bağışıklık sistemi hücrelerinden koruyabilir. Bu maddeler sadece difüzyonu engellemekle kalmaz, aynı zamanda antimikrobiyal maddeleri doğrudan bağlayarak etkisiz hale getirebilir [62].

EPS sadece fiziksel bir engel oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda bağışıklık sistemiyle doğrudan etkileşime de girer. Aslında, nötrofiller tarafından oluşan NET (extracellular traps) oluşumunun bazı durumları ters etki yaratabilir; bu tuzaklar biyofilmleri çevreler ve bakterilerin içeriden korunmasını artırmış olurlar. Böyle bir savunma mekanizması, özellikle kronik enfeksiyonlar durumunda, kistik fibrozis vakalarında meydana gelir [63].

EPS'nin dikkate değer diğer bir özelliği, biyofilm içindeki mikroçevreyi değiştirme yeteneğidir. Biyofilme oksijen ve besin maddelerinin difüzyonunu sınırlayarak hücrelerin metabolizma hızını düşürür. Bu da hücre içindeki aktivite seviyesini, antibiyotiklerin etkili olması için gerekli eşiğin altına düşürür. Bu durum antibiyotiklerin etkisini azaltır. Ayrıca EPS içerdiği enzimler sayesinde bazı antibiyotikleri doğrudan parçalayıp etkisizleştirebilir. Örneğin aminoglikozidler, matriksteki enzimlerle parçalanabilir ve bu durum antibiyotik yoğunluğunun azalmasına neden olur [63].

Sonuç olarak, ekstrasellüler polimerik matriks; antibiyotiklerin biyofilme ulaşmasını zorlaştıran, bağışıklık sisteminden koruyan ve mikroçevreyi antibiyotiklere elverişsiz hale getiren çok yönlü bir bariyer görevi görür.

b. Yavaş Büyüme Hızı ve Metabolik Adaptasyon

Biyofilm yapısında bulunan bakteriler, yalnızca fiziksel koruma sağlamakla kalmayıp metabolik savunma da geliştirmektedir. Özellikle P. aeruginosa, biyofilm içinde bulunan ve hipoksik ve besin açısından kısıtlı olan iç kısımlarda metabolik olarak daha az aktif olur. Yavaş büyüme gösteren bu hücreler, antibiyotiklerin hedef aldığı süreçlerin (örneğin hücre duvarı sentezi, protein üretimi) baskılanması sonucu, tedaviye daha dirençli hale bürünürler [64].

Yavaşlayan hücreler genellikle "fenotipik tolerans" olarak adlandırılan bir savunma durumuna geçer. Bu durum, bakterinin genetik olarak dirençli olmamasına rağmen hayatta kalabilmesini sağlar. Özellikle büyümenin duraklama evresine (stationary phase) girmiş hücrelerde, antibiyotiklere karşı daha düşük bir ölüm oranı saptanmıştır. Yani bu hücreler aktif olarak bölünmedikleri için antibiyotiklerin etkisinden büyük ölçüde korunurlar [64].

Metabolik yavaşlama aynı zamanda bazı savunma sistemlerini de aktive eder. Örneğin, 'stringent response' ismi verilen stres yanıt mekanizması, amino asitlerin olmadığı durumlarda aktifleşerek istediği mitotik evreye girmeyi sağlayan evreyi durdurmaktadır. Bu da hem ribozom aktivitesini baskılar hem de DNA onarım mekanizmalarını artırır. Bu fizyolojik geçişler, antibiyotiklerin etkisini sınırlandırırken, hücrelerin biyofilm içinde hayatta kalmasına olanak sağlar [65].

c. Persister Hücreler

Bazı bakteriyel enfeksiyonların uygun antibiyotik tedavisine rağmen tamamen eradike edilememesi, son yıllarda dikkat çeken bir sorun haline gelmiştir. Bu klinik gözlemin en önemli nedenlerinden biri, antibiyotiklere geçici olarak tolerans geliştiren "persister" hücrelerin varlığıdır. Persister hücreler, klasik direnç mekanizmalarından farklı olarak genetik mutasyon taşımayan, metabolik olarak durgun hücrelerdir [66, 67].

Bu hücreler çoğunlukla biyofilm yapılarında veya enfeksiyon bölgesinde düşük oksijen ve besin ortamlarında oluşur. Antibiyotik etkinliğini düşüren, hücresel faaliyetleri kısıtlayan bu ortam ilerleyen süreçte kronik enfeksiyonlara da zemin hazırlar [65, 66].

Persister hücrelerin oluşumunda, hücresel stres yanıtlarının ve toksin-antitoksin (TA) sistemlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. TA sistemlerinin, hücre içi dengenin bozulduğu durumlarda geçici durgunluk hali oluşturarak antibiyotiklerin etkisinden kaçışı mümkün kıldığı çeşitli çalışmalarda saptanmıştır [67-69].

Oksidatif stresin de persister hücre oluşumunu artırabildiği gösterilmiştir. Özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS), bazı antibiyotiklerle birlikte bakterinin savunma mekanizmalarını aktive ederek bu fenotipi tetiklediği düşünülmektedir [69].

Klinik açıdan persister hücrelerin en önemli özelliği, tedavi sonrasında canlı kalabilmeleri ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmalarıdır [66, 68].

d. Genetik Adaptasyon

Mikroorganizmalar, maruz kaldıkları antibiyotiklere ve antiseptiklere karşı zamanla genetik düzeyde adaptasyon geliştirerek tedaviye dirençli hale gelebilirler. Bu süreç bazı direnç genlerinin aktive edilmesiyle başlar ve enfeksiyon kontrolünü güçleştiren bir tabloya yol açar [70].

H. pylori gibi bazı bakterilerde, antibiyotik tedavisi altında hücre zarının yapısını değiştiren genetik yanıtların devreye girdiği saptanmıştır. Bu durum, antibiyotiğin hücre içine girişini zorlaştırarak direnç oluşumuna katkı sağlar [70].

Fırsatçı patojenlerden olan E. coli gibi bakterilerde, direnç mekanizmaları sadece hücre içi sinyal yolları aracılığıyla değil aynı zamanda plazmidlerin, transpozonların ve diğer genetik materyalin yatay aktarımı ile de gerçekleşir. Bu genetik materyal, bakterilerin porin yapılarını değiştirmesine olanak tanır, efluks pompa sayısını artırır ve bazı antibiyotikleri yok eden enzimler üretir [71].

Benzer genetik savunmalar, antiseptiklere maruz kalmış mikroorganizmalarda da gözlemlenebilir. Örneğin P. aeruginosa, klorheksidine karşı biyofilm yapısını değiştirerek hem antiseptiğe hem de antibiyotiklere karşı direncini artırabilir. Bu değişim hem proteinler hem de gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelir ve klinik açıdan tedavisi zor bir enfeksiyon tablosu ortaya çıkarır [72]. Direnç genlerinin bu şekilde aktive olması, özellikle hipoksik ve doku bütünlüğü bozulmuş alanlarda gelişen enfeksiyonlarda tedaviye yanıtı olumsuz etkiler [70, 72].

5. Biyofilm ile İlişkili Kronik Enfeksiyonlar

a. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Solunum yolu enfeksiyonları özellikle yapısal akciğer hastalığı olan bireylerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bronşektazi, kistik fibrozis ve mekanik ventilasyon gibi durumlar, tekrarlayan enfeksiyonlara ve/veya kronik enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Bu hastalarda sık izole edilen patojenlerden biri olan P. aeruginosa, biyofilm oluşturma kapasitesi ve direnç geliştirme potansiyeliyle önem kazanır [73].

Biyofilm oluşumu antibiyotik tedavisinin etkinliğini sınırlandıran başlıca mekanizmalardan biridir. Biyofilm içindeki bakteriler, düşük oksijen varlığı ve azalmış metabolik aktivite nedeniyle antibiyotiklere karşı daha dirençli hale gelir. Bu durum özellikle kistik fibrozis ve bronşiektazili olgularda tedaviye yanıtsız enfeksiyonlara neden olur [74]. Tuncer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ventilatör ilişkili pnömoni hastalarından izole edilen pan-rezistan Klebsiella pneumoniae suşlarının da yüksek oranda biyofilm oluşturabildiği, klasik antibiyotiklerle bu yapının ortadan kaldırılamadığı gösterilmiştir [75].

P. aeruginosa, kronik enfeksiyon ortamında konak savunmasından kaçmak ve tedaviye dirençli hale gelmek amacıyla fenotipik değişiklikler geçirir. Bronşiektazili hastalardan izole edilen suşlarda mukoid dönüşüm, yüksek mutasyon oranı ve metabolik hızda yavaşlama gibi

adaptasyonlar gösterilmiştir. Bu değişiklikler, enfeksiyonun kronikleşmesini kolaylaştırır. Aynı hastada bile birden fazla genetik farklılığa sahip suşların bulunabilmesi, bu bakterinin kronik enfeksiyon ortamında geçirdiği değişimleri ortaya koymaktadır [76,77].

Tedavi başarısızlığı konakçının bağışıklık yanıtı ile de ilgilidir. P. aeruginosa, virülans faktörleri aracılığıyla mukosilyer aktiviteyi engeller, konağın epitel bariyerini zayıflatır ve bağışıklık sisteminden kaçmayı başarır. Akciğerlerde, özellikle enfeksiyon sırasında, nötrofil aracılı inflamatuar yanıtla ilişkili doku hasarının önemli ölçüde arttırdığı iyi bilinmektedir [78].

b. Yara Enfeksiyonları

Yara enfeksiyonları bilhassa kronikleşen lezyonlarda komplikasyon riskini artıran önemli klinik sorunlardandır. Bu durum Tip 1,2 Diyabetes Mellitüs hastalarında ömürleri boyunca %25 oranında görülen diyabetik ayak ülserlerinde (DAÜ) enfekte yaranın yönetimi daha karmaşık bir hal almaktadır. Ek olarak DAÜ'lerin yaklaşık %60–80'inde biyofilm varlığı gösterilmiş olup bu yapıların yara iyileşmesini doğrudan olumsuz etkilediği bildirilmektedir [79].

Diyabetik doku ortamında -Tip 1, 2 Diyabetes mellitus'a bağlı vaskülopati, nöropati ve immün sistem disfonksiyonu gibi nedenlerle- biyofilm gelişimi oldukça kolaylaşmaktadır. Özellikle S. aureus ve P. aeruginosa gibi etkenler, bu yaralarda en sık izole edilen biyofilm oluşturan bakteriler arasındadır [79-81].

Kronik yara enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan mikrobiyolojik durum polimikrobiyal enfeksiyonlardır. Bakteriler daha önce bahsedildiği gibi quorum sensing adı verilen sistemle birbirleriyle iletişim kurarak, antimikrobiyal ajanlara karşı tolerans geliştirmekte ve koloni içindeki savunma mekanizmalarını birlikte organize etmektedirler. S. aureus ile P. aeruginosa arasında sık gözlenen bu durum biyofilmin kalınlığını ve direnç düzeyini artırmaktadır [82,83].

Biyofilmler yalnızca mikrobiyal direnç değil, aynı zamanda konak immün yanıtının bozulmasında da etkilidir. Biyofilm ortamında nötrofiller, makrofajlar etkin fagositoz kabiliyetini kaybederler. Normalde fagozom adı verilen yapı ile bakteriler solunum patlamasına maruz bırakılır ancak bu oksidatif süreçte zaten hipoksik olan yara dokusundaki oksijeni tüketecektir. Ayrıca makrofajların antiinflamatuar (M2) fenotipe geçişi baskılanmaktadır. Bunun sonucunda yara dokusunda uzamış inflamasyon ve granülasyon dokusu oluşumunun gecikmesi gözlenir [84]. Bu mekanizmalar, özellikle diyabetik hastalarda bağışıklık cevabının zayıflığıyla birleştiğinde, enfeksiyonun kontrol altına alınmasını daha da zorlaştırmaktadır.

Tanı sürecinde klasik kültür yöntemleri çoğu zaman biyofilmi gösteremez. Bu durumda konfokal lazer taramalı mikroskopi, scanning elektron mikroskopi (SEM) gibi ileri görüntüleme yöntemleri de kullanılabilir. Bu tekniklerin kullanımıyla biyofilm varlığı daha kesin olarak ortaya konulmaktadır [75,80,85].

Biyofilm etken yara enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili yöntem, uygun intravenöz veya oral antibiyotik tedavisinin başlanmasıdır. Ancak bu tedavi çoğu zaman tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle sistemik tedaviye ek olarak yaranın debridmanı (cerrahi, enzimatik) ve gerektiğinde destekleyici lokal/topikal ajanların kullanılması önemlidir. Topikal antiseptikler (örneğin poliheksametilen biguanid (PHMB), hipokloröz asit (HOCl), klorheksidin) biyofilm tabakasının kırılmasında yardımcı olabilir [79, 86].

Diyabetik hastalarda uygulanan biyofilm hedefli bireyselleştirilmiş tedavi protokolleriyle; iyileşme süresinde kısalma, antibiyotik kullanım süresinde azalma ve maliyetlerde düşüş sağlandığı bildirilmektedir. Bu protokoller; doku kültürü, hedefe yönelik antibiyotik seçimi ve sık debridman, yaraya uygun olarak pansuman yapılması gibi adımları içermektedir [4, 87].

Deneysel modellemelerde, biyofilm varlığı olan yara dokularında tip 1 kollajen sentezinin azaldığı, MMP-2 aktivitesinin arttığı ve granülasyon dokusunun mekanik dayanımının zayıfladığı gösterilmiştir. Bu durum, biyofilme bağlı olarak yaranın iyileşme sonrası mekanik olarak dayanaksız olacağını göstermektedir [88].

c. İmplant ve Kateterle İlişkili Enfeksiyonlar

Tıbbi implantlar ve kateterler modern tıbbın gelişimiyle birlikte neredeyse birçok tıbbi işlemde kullanılmaktadır. Özellikle invaziv yöntemler ile yerleştirilen ve vücutta uzun süre kalan kateterler ile diğer implant türleri için enfeksiyon kaynaklı problemler büyük önem arz eder. Bu tür enfeksiyonların büyük bir kısmı biyofilm kaynaklıdır. Daha önce bahsedildiği üzere bakteriler, cihaz yüzeyine tutunduktan sonra salgıladıkları EPS (polisakkarit, lipit, protein ve DNA parçacıkları) ile koruyucu bir yapı oluşturur [89,90].

Enfeksiyon süreci genellikle implant veya kateter yüzeyinin vücut sıvılarındaki proteinlerle kaplanmasıyla başlar. Bu biyolojik katman, literatürde “hazırlanma filmi (conditioning film)” olarak tanımlanır ve bakteriler için adezyonu kolaylaştıran bir yüzey oluşturur. İlk tutunan bakteriler yüzeye sıkıca bağlanarak çoğalır ve zamanla biyofilm yapılarını

geliştirir. Bu süreç hem konak savunmasından kaçmayı hem de antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanmayı mümkün kılar [91].

Kateterle ilişkili enfeksiyonlar, özellikle idrar yolu kateterleri gibi uzun süreli kullanım gerektiren cihazlarda sık görülür. İncelenen klinik örneklerde, biyofilm oluşumunun çoğunlukla kateterin intralüminal kısmında başladığı ve distal uca doğru yayıldığı bildirilmiştir [92]. Zhang ve arkadaşları tarafından üretral stentler üzerinde yapılan çalışmada, biyofilm oluşumunun 24 saat içinde başladığı ve yoğunluğun mesane tarafında daha fazla olduğu gösterilmiştir [93].

Biyofilm yapıları içerisindeki bakteriler, planktonik bakterilere kıyasla 100 ila 1000 kat daha fazla antibiyotik toleransı gösterir. Bu direnç; düşük metabolik aktivite, persister hücre varlığı, antibiyotiklerin matrikse penetre olamaması gibi nedenlere dayanmaktadır [94]. Ayrıca bakteriler, quorum sensing sinyal sistemleriyle koloni içi davranışlarını koordine ederek antibiyotiklere karşı kolektif bir savunma oluştururlar [95].

Biyofilm oluşan bölgelerde konak savunma mekanizmaları genellikle yetersiz kalmaktadır. Özellikle implant çevresinde oluşan hipoksik ortam, düşük pH ve azalmış doku perfüzyonu, immün hücrelerin etkinliğini sınırlar. Nötrofillerin enfeksiyon bölgesine geç ulaşması veya yeterli sayıya ulaşamaması durumunda, bakterilerin biyofilm oluşturarak immün sistemden kaçmalarını kolaylaşır [96]. Bu durum, enfeksiyonun kronikleşmesine ve antibiyotik direncine zemin hazırlar.

Klinik olarak bu enfeksiyonlar, ateş, implant çevresinde ağrı ve geç iyileşen yara gibi belirtiler gösterebilir. Ortopedik implant enfeksiyonlarında en sık izole edilen mikroorganizmalar S. aureus ve S. epidermidis olup, bu türler biyofilm oluşturma kapasiteleri ve virülans genleriyle enfeksiyonun kalıcı hale gelmesinde etkili olur [91, 97].

Tedaviye direnç, implanta ve katetere bağlı enfeksiyonların en çok yaşanan zorluklarındandır. P. aeruginosa'nın beta-laktam ve sefalosporin sektörlerinde yüksek direnç geliştirdiği, E. coli'nin siprofloksasin gibi florokinolonlara olan direncinin %70'in üzerindeki oranlarda olduğu bildirilmiştir [93, 98]. Bu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla karbapenemler ve rifampisin içeren kombinasyonlar tercih edilmektedir ancak bu seçenekler de direnç gelişimini önleyememektedir [98].

Tedavi protokollerinde intravenöz veya oral antibiyotik tedavisi temel yaklaşımı oluşturmaktadır. Ancak biyofilm gelişmiş olgularda sistemik antibiyotik tedavisine rağmen başarı oranı düşüktür. Bu nedenle enfekte cihazın çıkarılması önerilir [97]. Öte yandan

rifampisin, gümüş ve antiseptik içeren yüzey kaplamalarının bakteriyel tutunmayı ve biyofilm oluşumunu engellediği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur [90, 95].

Özetle implant ve kateterle ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve etkin tedavisi, biyofilm patogenezinin iyi anlaşılmasına bağlıdır. Konak savunmasından kaçan, antibiyotiklere dirençli hale gelen bu enfeksiyonların yönetimi multidisipliner yaklaşım gerektirir. Enfeksiyonun erken tanısı, uygun cihaz seçimi, yüzey kaplama teknolojileri ve hasta özelinde planlanmış tedavi, morbiditeyi azaltmada kritik önemdedir.

6. Klinik Önemi ve Tedavi Yaklaşımları

a. Antibiyofilm Stratejileri

- Klasik ve Kombinasyon Tedaviler

Biyofilm ilişkili enfeksiyonların yönetiminde ilk basamak, uygun antibiyotik tedavisinin başlanmasıdır. Ancak standart tekli antibiyotik rejimleri biyofilm ortamında yetersiz kalabildiğinden kombinasyon tedavileri ön plana çıkmıştır. Aminoglikozidler (örneğin gentamisin) ile beta-laktamlar (örneğin piperasilin-tazobaktam) ya da rifampisin ile vankomisin kombinasyonları, sinerjistik etkileri sayesinde daha başarılı sonuçlar vermektedir [99]. Rifampisinin özellikle S. aureus biyofilmlerine karşı penetrasyonunun yüksek olması nedeniyle implant ilişkili enfeksiyonlarda yaygın kullanımı söz konusudur. Tedavi planlamasında kültür ve duyarlılık sonuçlarına göre hedefe yönelik rejimlere geçilmelidir.

-Biyofilmi Önlemeye Yönelik Stratejiler

Biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan yüzeye adezyonun önlenmesi, koruyucu stratejilerin temelini oluşturur. Bu amaçla geliştirilen yüzey modifikasyonları özellikle kateter ve implant materyallerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanoparçacık içeren yüzeyler, hem bakteriyel tutunmayı azaltmakta hem de antimikrobiyal aktivite göstermektedir [100]. Ayrıca polimer fırçalar ve hidrofilik yüzeyler bakteriyel adezyonu engelleyen pasif bariyerlerdir [101].

Bakterilerin aynı tür veya farklı türlerle iletişimini sağlayan quorum sensing (QS) sistemi, biyofilm oluşumunda anahtar rol oynar. QS inhibitörleri aracılığıyla bu sistem baskılandığında, bakteriler arası haberleşme kesilmekte ve EPS sentezi engellenmektedir. Bitkisel kökenli doğal ajanlar (karvakrol, farnesol) bu etkileriyle antibiyofilm özellik göstermektedir [102].

-Biyofilmi Dağıtmaya Yönelik Stratejiler

Oluşmuş biyofilm yapılarında temel hedef, EPS matriksini dağıtarak bakterileri tekrar planktonik hale getirmek ve böylece tedaviye duyarlılığı artırmaktır. Bu amaçla enzimatik ajanlar, EPS'nin DNA, protein ve polisakkarit yapılarını parçalayarak biyofilmin fiziksel bütünlüğünü bozar [103].

Antimikrobiyal peptitler (AMP), hem bakteriyel zar bütünlüğünü bozarak doğrudan öldürücü etki gösterir hem de matriks içerisine penetre olarak yapıyı zayıflatır. Antimikrobiyal peptitlerin, özellikle P. aeruginosa ve S. aureus biyofilmlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bu ajanlar, biyofilm ortamında çok ilaca direnç gösteren bakterilerin eradikasyonunda potansiyel sunar [104].

-Destekleyici ve Gelişmekte Olan Yaklaşımlar

Biyofilmle mücadelede destekleyici tedavilerden birisi de **hiperbarik oksijen tedavisidir (HBOT)**. HBOT, hipoksik dokularda oksijen basıncını artırarak metabolizmada hızlanmaya sebep olur ve antibiyotiklerin biyofilm içerisine daha çok penetre olmasını sağlar. Yapılan çalışmalarda HBOT uygulanan olgularda, biyofilm matriksinde çözülme ve antibiyotik tedavisine yanıt oranlarında artış olduğu gösterilmiştir [105, 106].

Fotodinamik terapi (aPDT), lokal olarak verilen fotosensitizer ajanların ışıkla aktive edilmesiyle reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlar. Bu tür oksidatif stres hem bakteriyel membranı hem de EPS yapısını hedef alır. Periodontal enfeksiyonlarda, kronik yara ve sinüs enfeksiyonlarında klinik kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [107].

Bakteriyofaj tedavisi, biyofilm oluşturan bakterilere özgül virüslerin kullanılması prensibine dayanır. Bazı fajlar yalnızca bakteriyi öldürmekle kalmaz aynı zamanda EPS yıkıcı enzimler de salgılayarak yapının bozulmasına katkı sağlar. Antibiyotiklerle kombine edildiğinde, direnç gelişimini azaltma ve penetrasyon etkinliğini artırma potansiyeli taşımaktadır [108].

b. HBO ve Biyofilm

Biyofilmler, mikroorganizmaların uygun yüzeylerde koloni oluşturarak ekstrasellüler polimerik maddelerle çevrili, kendine özgü bir mikrosistem inşa ettiği dirençli yapılardır. Bu yapı, bakterilerin antimikrobiyal ajanlardan ve konak savunma mekanizmalarından korunmasını sağlayan hem fiziksel hem de fizyolojik bir bariyer oluşturur. Hipoksik

mikroçevre, düşük metabolik aktivite ve antibiyotik penetrasyonunu kısıtlayan yoğun matriks nedeniyle geleneksel tedavi protokollerine karşı belirgin bir direnç gelişebilmektedir [109].

Bu aşılması zor direnç mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda, tedaviye yanıt alınamayan enfeksiyonlarda hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) adjuvan bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Crabbé ve arkadaşlarının biyofilm fizyolojisine dair çalışmalarında, hipoksik bölgelerdeki bakterilerin metabolik olarak baskılandığı ve bu durumun antibiyotik etkinliğini azalttığı gösterilmiştir [110]. HBOT, bu bölgelerin oksijenlenmesini sağlayarak bakteriyel metabolizmayı yeniden canlandırmakta ve böylece antibiyotiklerin hedef hücreye ulaşma ve etki etme potansiyelini artırmaktadır. Kolpen ve arkadaşları, P. aeruginosa biyofilm modeli üzerinde yaptıkları kontrollü deneysel çalışmada, HBOT sonrası siprofloksasinin bakterisidal etkisinin anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmiştir [7].

Fang ve Galiano, osteomyelit tedavisinde HBOT'un tamamlayıcı rolüne dikkat çekmiş; özellikle oksijen seviyesindeki artışın granülasyon dokusu oluşumunu desteklediğini, nötrofil fonksiyonlarını iyileştirdiğini ve kemik iyileşmesini hızlandırabileceğini ifade etmişlerdir. Ancak bu etkilerin klinik olarak anlamlı düzeye ulaşıp ulaşmadığını gösterecek daha fazla kontrollü çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır [111]. Benzer şekilde, Coulson ve arkadaşları, osteomyelit nedeniyle uzun süreli antibiyotik tedavisi alan hastalarda femoral ven kanülasyonunun güvenli uygulanabildiğini, HBOT ile kombine edildiğinde klinik seyrin olumlu yönde etkilendiğini bildirmiştir [112].

HBOT'un sağladığı hiperoksik ortam, bakteriler üzerinde doğrudan toksik etkisi olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini de artırmaktadır. Dryden'in derlemesinde, ROS'un antibiyotik direnci gelişmiş patojenler üzerinde bile etkinlik gösterebildiği, bu sayede HBOT'un antimikrobiyal bir modülatör gibi davranabildiği belirtilmiştir [113]. Aynı şekilde Kolpen ve arkadaşlarının başka bir modelinde, HBOT'un aerobik metabolizmayı aktive ederek siprofloksasinin bakterisidal etkisini belirgin ölçüde artırdığı gösterilmiştir [114].

Lerche ve arkadaşlarının 2022 yılında yayımladığı çalışmada, HBOT'un enfektif endokardit'te ROS üretimini artırarak mikrobiyal yükü azalttığı ve antibiyotik etkinliğini desteklediği vurgulanmıştır [115]. Lerche ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise deneysel endokardit modelinde HBOT'un tobramisin etkinliğini artırdığı ancak enfeksiyonun tamamen eradike edilmesinde tek başına yeterli olmadığı belirtilmiştir [8]. Jensen ve ekibinin yürüttüğü bir diğer deneysel çalışmada da HBOT'un, antibiyotik penetrasyonunu ve bakteriyel yanıtı artırarak klasik tedaviye anlamlı katkı sunduğu gösterilmiştir [116].

HBOT'un immün sistem üzerinde de önemli etkileri vardır. Han ve Ceilley, HBOT'un nötrofil fonksiyonlarını artırarak fagositik aktiviteyi desteklediğini ve yara iyileşmesini hızlandırdığını ortaya koymuştur [117]. Sanford ve arkadaşlarının prospektif klinik çalışmasında ise HBOT uygulanan hastalarda mikrobiyal yükte azalma ve antibiyotik ihtiyacında azalma bildirilmiştir [118].

Kim ve Steinberg ise HBOT'un diyabetik ayak ülserlerinde granülasyon dokusu oluşumunu destekleyerek topikal ve hücresel bazlı ürünlerin etkinliğini artırabileceğini ifade etmişlerdir [119].

Periodontal hastalıklara yönelik çalışmalarda da HBOT'un etkinliği araştırılmıştır. Signoretto ve arkadaşları, subgingival debridman işlemiyle birlikte uygulanan HBOT'un, gram negatif anaerobik yükü %99,9 oranında azalttığını ve bu etkinin 60 güne kadar korunduğunu göstermiştir [120]. Öte yandan, Jørgensen ve arkadaşlarının implant ilişkili osteomyelit modelinde yürüttükleri çalışmada, HBOT'un rifampisin ve daptomisin kombinasyonuna anlamlı katkı sağlamadığı ancak inflamatuvar yanıt üzerinde olumlu etkiler sağladığı bildirilmiştir [121].

Laulund ve arkadaşlarının fareler üzerinde yürüttükleri in vivo bir çalışmada farelerde oluşturulan yara Pseudomonas aeruginosa ile enfekte edilmiştir. Devamında 3 gruba bölünen farelerin bir grubuna sadece siprofloksasin, bir grubuna siprofloksasin ve HBO (Günde iki seans 2.8 ATA'da 90 dk %100 Oksijen), son gruba sadece salin verilmiştir. Bu tedaviler 4 gün boyunca uygulanmış ve 4. günün sonunda sakrifiye edilen farelerin yara yerleri eksize edilip CFU yöntemiyle sayım yapılmıştır. Sonuç olarak kombine tedavi alan grup en az koloni oluşturmuştur. [122].

Laulund ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, termal yanık yarası oluşturulup Pseudomonas aeruginosa ile enfekte edilmiştir. 3 gruba ayrılan farelerin bir grubuna sadece tobramisin, birine HBO (2.8 ATA'da 90 dk %100 Oksijen) ve tobramisin kombine tedavi ve son gruba kontrol olarak sadece salin uygulanmıştır. Burada da CFU'ya bakıldığında kombine tedavi alan grupta anlamlı bir azalma saptanmıştır [123].

B. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

1.Tanım ve Tarihçe

Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi; hastanın tamamen kapalı bir basınç odasında, mutlak atmosfer basıncından (1 atmosfer absolute = 1 ATA = 1 Bar = 760 mmHg) daha yüksek

basınçlarda aralıklı olarak %100 oksijen soluması esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Sıklıkla karıştırılan normobarik oksijen tedavisi (1 ATA'da %100 oksijen solunması) ya da sadece vücudun belirli bir bölgesine oksijen verilmesi (topikal oksijen uygulamaları), HBO tedavisi olarak değerlendirilmez [124].

Klinikte bu tedavi iki farklı tipte basınç odasında uygulanabilir: tek kişilik ve çok kişilik basınç odaları. Tek kişilik odalarda genellikle tüm oda %100 oksijenle doldurularak hasta doğrudan bu ortam havasını solur. Buna karşılık, çok kişilik odalarda odanın kendisi hava ile basınçlandırılır. Sonrasında ise hastalara maske, başlık ya da entübasyon yoluyla %100 oksijen aralıklı olarak verilir. Kullanılan basınç düzeyi ve tedavi süresi altta yatan hastalığa ve klinik tabloya göre değişkenlik gösterir [125].

Hiperbarik oksijen tedavisinin geçmişi oldukça eskilere dayanmaktadır. İlk uygulamalardan biri 1662 yılında İngiltere'de Henshaw adlı bir bilim insanının tasarladığı ve "Domicilium" olarak adlandırılan bir oda ile yapılmıştır. Bu odada, içeriye körük yardımıyla hava verilerek ortam basıncı ayarlanmıştır. Bu sistem, hiperbarik tedavi tarihinin başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir [126].

Oksijenin keşfi ise 1775 yılında Joseph Priestley tarafından gerçekleştirilmiştir. Ardından, Lavoisier ve Seguin 1789 yılında yaptıkları çalışmalarda oksijenin yalnızca yararlı değil, bazı koşullarda toksik etkiler de gösterebileceğini öne sürmüşlerdir. 1800'lü yılların ortalarına gelindiğinde, basınç odalarına olan ilgi yeniden canlanmış; Junod, Pravas ve Tabarie gibi araştırmacılar basınç odalarını kullanarak çeşitli hastalıkları tedavi etmeye başlamışlardır [124,126,127].

1840'lı yıllarda Fransız mühendis Triger sualtı tünel ve köprü inşaatlarında kullandığı basınçlı çalışma alanlarında, uzun süre görev yapan işçilerde eklem ağrıları ve sinir sistemi ile ilgili bazı yakınmalar gözlemlemiştir. Sonraki dönemlerde bu semptomların dekompresyon hastalığı ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır [124,126,127].

Hiperbarik oksijen tedavisinin temelleri ise 1878 yılında Paul Bert'in yayınladığı "La Pression Barométrique: Recherches de Physiologie Experimentale'' adlı eserle atılmıştır. Bert bu çalışmasında, gazların vücut sıvılarında çözünme prensiplerini, kabarcık oluşumunun fizyopatolojisini ve özellikle de dekompresyon hastalığındaki nitrojenin etkisini açıklamıştır. Oksijenin merkezi sinir sistemi toksisitesi bugün onun adıyla anılmakta, "Paul Bert etkisi" olarak literatürde yer almaktadır. [124,126,127]

Takip eden yıllarda, 1879'da Fransız cerrah Fontaine tarafından iç basıncı artırılabilen bir ameliyathane tasarlanmış ve bu odada bazı cerrahi işlemler gerçekleştirilmiştir. 1899 yılında ise Lorrain-Smith, oksijenin uzun süreli solunmasının pulmoner dokuda toksik hasara yol açabileceğini ortaya koymuştur. [124,126,127]

Drager 1917'de dekompresyon hastalığında oksijen kullanımını önerse de bu tedavi yöntemi ilk kez 1937'de Behnke ve Shaw tarafından pratikte uygulanmıştır. 1930'lardan itibaren hem Amerikan hem de İngiliz donanmaları, dalış hastalıklarının yönetiminde kullanılmak üzere oksijenli tedavi protokolleri geliştirmiştir. 1938'de de Almeida ve Costa lepra tedavisi için HBO tedavisini denemiştir. 1942 yılında End ve Long, hayvan deneylerinde karbonmonoksit zehirlenmesinde HBO tedavisinin etkilerini ortaya koymuştur. İnsanlarda karbonmonoksit zehirlenmesi tedavisinde ilk HBO uygulaması ise 1960 yılında Sharp ve Smith tarafından gerçekleştirilmiştir. [124,126,127]

HBO tedavisinin günümüzdeki anlamıyla sistematik şekilde kullanılmaya başlaması ise 1950'li yıllara denk gelir. Churchill-Davidson, radyoterapi uygulanan hastalarda tedavi etkinliğini artırmak amacıyla HBO'yu araştırmıştır [125]. 1959'da Boerema ise bu yöntemi kardiyak cerrahi alanına taşımıştır. Aynı araştırmacı, 1960 yılında çok düşük hemoglobin düzeyine sahip deney hayvanlarını yalnızca oksijen desteğiyle hayatta tutmayı başardığı "Life Without Blood" adlı çalışmasıyla dikkat çekmiştir.[128]

1963'te Amsterdam'da gerçekleştirilen ve kongre niteliği taşıyan ilk uluslararası hiperbarik tıp toplantısı, bu alandaki bilgi birikimini hızla artırmış ancak takip eden yıllarda bilimsel temele dayanmayan birçok endikasyonla tedavinin uygulanması, yöntem hakkında birtakım soru işaretlerini de beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, 1970'lerin sonunda Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS), HBO tedavisinin bilimsel esaslarını ve kullanım kurallarını yayınlayarak tedavi alanını daha sistemli hale getirmiştir. Avrupa'da ise European Underwater and Baromedical Society (EUBS) ve European Committee for Hyperbaric Medicine (ECHM) gibi yapılar, bilimsel güncellemeleri dikkate alarak HBOT endikasyonlarını netleştirmiştir. ECHM 1994 yılında ilk konsensus bildirgesini yayımlamıştır [129].

Türkiye'de HBO tedavisi, başlangıçta Türk Donanması tarafından dekompresyon hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. İhtiyaç gelişmesine üzerine 1962 yılında "Denizcilik Tababeti'' adıyla Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp ayrı bir uzmanlık dalı olmuştur. 1976 yılında İstanbul Tıp Fakültesi bünyesinde Deniz ve Sualtı Hekimliği birimi kurulmuş, 1989'da Anabilim Dalı haline getirilmiştir. 1980'lerden itibaren hem İstanbul Tıp Fakültesi'nde hem de

Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde HBO, dalış dışı endikasyonlar için de kullanılmaya başlanmıştır. 2002 yılında çıkarılan Tıpta Uzmanlık Tüzüğü ile bölümün adı "Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı" olarak değiştirilmiş; 1990'lı yıllardan sonra Türkiye genelinde devlet ve özel basınç odası merkezlerinin yaygınlaşması sayesinde bu tedavi halk arasında daha bilinir hale gelmiştir [124,130].

Günümüzde, HBO tedavisi yalnızca dalışla ilişkili hastalıklarda değil, çeşitli tıbbi endikasyonlarda da güvenle kullanılmaktadır. Akademik alandaki gelişmeler, bu tedavinin endikasyonlarını dolayısıyla da yerini daha sağlam bir zemine oturtmuştur.

2. Fiziksel Temel

a. Boyle Gaz Kanunu

Boyle Kanunu, sabit sıcaklık altında bir gazın hacmi ile basıncı arasında ters orantı olduğunu belirtir. Basınç arttıkça aynı miktardaki gazın kapladığı hacim azalır. Bu ilişki matematiksel olarak aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$\mathbf{P \times V = sabit} \text{ (T sabit)}$$

Bu prensip özellikle arteriyel gaz embolisi ve dekompresyon hastalığı gibi durumların tedavisinde önemli bir yer tutar. HBO tedavisinde basınç arttırıldığında, vücutta oluşan gaz kabarcıkları küçülerek klinik belirtilerin azalmasına katkı sağlar. Öte yandan bu aynı fiziksel mekanizma HBO tedavisinde en sık görülen yan etki olan barotravmaların da açıklamasını oluşturur [131].

b. Charles ve Gay-Lussac Gaz Kanunları

Bu iki gaz yasası, sıcaklıkla hacim veya basınç arasındaki ilişkiyi tanımlar. Charles Kanunu'na göre sabit basınç altında gazın sıcaklığı arttıkça hacmi de artar. Gay-Lussac Kanunu ise sabit hacimde, sıcaklık yükseldikçe gazın basıncının da arttığını belirtir. Her iki kanun şu denklemle gösterilebilir:

$$\mathbf{P_1 / T_1 = P_2 / T_2} \text{ (hacim sabit)}$$

Bu formüle göre HBO uygulamaları sırasında basınç hızla yükseltilirse, ortam sıcaklığı da buna paralel olarak artar. Dalış öncesi tüplerin hava ile doldurulduğunda ısınması bunun bir örneğidir [132].

c. Henry Gaz Kanunu

Henry Kanunu, sabit sıcaklık altında bir sıvı içerisinde çözünebilen gaz miktarının gazın o sıvı üzerindeki parsiyel basıncı ile doğru orantılı olduğunu ifade eder. Bu prensip, HBO tedavisinde doğrudan kullanılan bir mekanizmadır [131].

Normobarik ortamda, kanda taşınan oksijenin büyük bölümü (%97-98) hemoglobine bağlıdır. Geri kalan küçük bir kısmı ise plazma içinde serbest halde çözünmüş olarak taşınır. 1 gram hemoglobin yaklaşık 1,34 ml oksijen bağlayabilir. Ortalama 15 g/dl hemoglobin düzeyine sahip bir bireyde, 100 ml kanda yaklaşık 19,5 ml oksijen taşınabilir. Kapiller düzeyde oksijen satürasyonu %75'e düştüğünde, dokuya aktarılan oksijen miktarı 5 ml civarındadır [131,132].

HBO tedavisi sırasında uygulanan yüksek basınç sayesinde, oksijenin plazmada çözünmüş hali artar. Örneğin, 2,8 ATA'da %100 oksijen solunduğunda, yalnızca plazmada çözünen oksijen miktarı 6 ml/100 ml kana kadar yükselebilir. Bu seviye, hemoglobinden bağımsız olarak dokuların oksijen ihtiyacını karşılamaya yetecek düzeydedir. Ayrıca Henry Kanunu dekompresyon hastalığında gaz çözünürlüğüyle ilgili temel fiziksel açıklamayı da sağlar [131,132].

d. Dalton Gaz Kanunu

Bir gaz karışımındaki toplam basıncın, o karışımı oluşturan gazların kısmi basınçlarının toplamına eşittir. Formülü şu şekildedir:

$$\mathbf{PT=P_1+P_2+P_3+...+Pn}$$

PT: Gaz karışımının toplam basıncı

P1 + P2 + P3 + …. + Pn: Karışımdaki gazların kısmi basınçları toplamı

Deniz seviyesindeki atmosferik basınç yaklaşık 1 ATA (760 mmHg) olup, bunun yaklaşık %21'i oksijen, %78'i azot, geri kalanı ise diğer gazlardır. Bu durumda, deniz seviyesinde oksijenin parsiyel basıncı yaklaşık **0,21 × 760 = 159 mmHg** civarındadır [131,132].

Ortam basıncı iki katına çıkarıldığında, yani 2 ATA'ya yükseltildiğinde, oksijenin parsiyel basıncı da yaklaşık olarak 318 mmHg'ye çıkar. HBO tedavisinde bu prensip, dokulara daha fazla oksijen taşınmasının temelini oluşturur ve tedavinin fizyolojik etkilerini anlamada önemli bir yer tutar [131,132].

Bu dört temel gaz kanunu, hiperbarik oksijen tedavisinin fizyolojik ve terapötik etkilerini açıklayan bilimsel altyapıyı oluşturur. Tedavinin etkili ve güvenli şekilde

uygulanabilmesi için, bu fiziksel prensiplerin klinik pratiğe nasıl yansıdığının iyi bilinmesi gerekir.

3. Fizyolojik Etkileri

Hiperbarik oksijen tedavisinin fizyolojik etkileri, temelde iki ana başlıkta toplanabilir: uygulanan basıncın doğrudan etkileri ve yükseltilmiş parsiyel oksijen basıncının yol açtığı biyolojik ve metabolik değişikliklerdir.

a. Basıncın Doğrudan Etkileri

Basınç artışıyla gaz hacminin ters orantılı olarak azaldığını ifade eden Boyle kanunu, bu etkiyi açıklayan temel fiziksel ilkedir. Özellikle vücutta gaz kabarcıklarının rol oynadığı klinik tablolar – örneğin dekompresyon hastalığı ya da gaz embolisi – bu mekanizmadan doğrudan yararlanılarak tedavi edilebilir [133].

Yüksek basınca maruz kalan ortamlarda gaz kabarcıklarının hacmi küçülür. Bu durum, damar içindeki dolaşımın önündeki fiziksel engellerin ortadan kaldırılmasını sağlar [133].

Benzer bir mekanizma gazlı gangren gibi enfeksiyon hastalıklarında da devreye girer. Enfekte dokularda biriken gazlar basınç altında hacim kaybeder; bu da lokal basıncın düşmesine ve bölgedeki mikrosirkülasyonun rahatlamasına katkı sağlar. Böylelikle hem dokuların oksijenlenmesi artar hem de ağrı gibi basınca bağlı semptomlar azalabilir [133].

Ancak bu basınca bağlı etkiler yalnızca terapötik sonuçlar doğurmaz. Aynı zamanda, HBO tedavisinin en sık karşılaşılan komplikasyonlarından biri olan barotravmalar da bu fiziksel mekanizmanın bir sonucudur. Hava dolu boşluklarda meydana gelen hacim değişimleri, kulak, sinüs veya akciğer gibi yapılarda basınç travmasına neden olabilir [133].

b. Parsiyel Oksijen Basıncının Artışının Yarattığı Etkiler

Fizyolojik şartlarda hemoglobin, oksijen taşıma kapasitesinin neredeyse tamamına yakınını kullanır. Sağlıklı bir bireyde hemoglobin %97–98 oranında oksijenle doygun haldedir. Bu nedenle, normobarik ortamda %100 oksijen solunması, hemoglobine bağlı oksijen miktarını anlamlı düzeyde artırmaz ve dokulara ulaşan oksijen miktarında belirgin bir değişiklik yaratmaz. Dokuların oksijenlenmesini anlamlı ölçüde artırmak için, asıl hedef plazmada fiziksel olarak çözünmüş oksijen miktarını yükseltmektir [133,134].

Ortam basıncının artırılmasıyla plazmada çözünmüş oksijen miktarının da arttığını açıklayan Henry Kanunu, bu tedavi yaklaşımının temel dayanaklarından biridir. Örnek vermek

gerekirse; 1 ATA basınçta hava solunduğunda 100 ml kanda yaklaşık 0,3 ml oksijen çözünmüş halde bulunur. Aynı basınçta %100 oksijen solunduğunda bu değer 2 ml'ye çıkar. Basınç 2 ATA'ya yükseltildiğinde ise, çözünen oksijen miktarı yaklaşık 4 ml'ye ulaşır. Bu düzeydeki bir artış, oksijenin hemoglobine bağlanmaksızın direkt olarak plazma yoluyla taşınmasını ve dokulara ulaşmasını mümkün kılar [133,134].

Bu mekanizmanın klinikte en çok kullanıldığı durumlardan biri karbonmonoksit (CO) zehirlenmesidir. CO'nun hemoglobine olan yüksek afinitesi nedeniyle doku hipoksisi gelişir ve normobarik oksijen desteği bu durumda çoğu zaman yetersiz kalır. Hiperbarik oksijen tedavisi sayesinde plazmada çözünen oksijen miktarı artırılarak hem dokuların oksijen ihtiyacı karşılanır hem de CO'nun hemoglobinden ayrılması hızlandırılır [133,134].

Aynı prensip, şiddetli anemilerde veya acil transfüzyonun mümkün olmadığı klinik senaryolarda da geçici bir çözüm olarak kullanılabilir. Plazmadaki oksijenin artışı, doku düzeyinde hipoksinin etkilerini belirgin ölçüde azaltabilir [133,134].

Plazma içinde yüksek konsantrasyonda çözünmüş oksijenin yalnızca taşıma kapasitesi üzerinde değil de hücresel ve biyokimyasal süreçler üzerinde de doğrudan etkileri olduğu bilinmektedir. Örneğin:

-Lökosit fonksiyonlarında artış gözlenir özellikle mikrobisidal etkinlikleri kuvvetlenir.

-Lökositlerin endotel yüzeye adezyonu azalır bu da inflamatuar yanıtın daha kontrollü seyretmesine yardımcı olur.

-Gazlı gangren gibi enfeksiyonlarda, etken bakterinin (C. perfringens) alfa toksin üretimi baskılanır.

-Anjiyogenez, fibroblast proliferasyonu, kollajen sentezi ve ekstraselüler matriks üretimi gibi iyileşme sürecinde rol oynayan olaylar hızlanır.

-Ayrıca süperoksit dismutaz gibi antioksidan savunma sistemlerinde de aktivite artışı gözlenebilir.

Bu etkilerin tamamı, hiperbarik oksijen tedavisinin yalnızca oksijen taşımasını değil aynı zamanda doku iyileşmesini, bağışıklık yanıtını ve enfeksiyon kontrolünü de destekleyen kapsamlı bir tedavi modeli olduğunu göstermektedir [133,134, 135].

(1) Kardiyovasküler Etkiler

Parsiyel oksijen basıncındaki artışın dolaşım sistemi üzerindeki etkileri, özellikle kardiyak ritim ve damar tonusu düzeyinde kendini gösterir. HBO tedavisi sırasında sık olarak gözlenen fizyolojik yanıtlardan biri bradikardi gelişimi ve buna bağlı olarak kalp debisinin azalmasıdır. Ancak bu durum genellikle klinik bir sorun yaratmaz. Çünkü plazmada çözünmüş oksijen miktarının artmasıyla birlikte, dokulara ulaştırılan oksijen miktarı toplamda artar [135].

Oksijen taşıma kapasitesindeki bu artış, dokuların ihtiyaç duyduğu oksijeni daha az miktarda kandan alabilmesini sağlar. Bunun sonucunda periferik vasküler yatakta vazokonstriksiyon meydana gelir. Periferik dirençteki bu artış, kan basıncında hafif bir yükselmeyle seyredebilir [135].

Vazokonstriktif etki yalnızca hemodinamik açıdan değil, aynı zamanda HBO'nun antiödem etkisinin fizyolojik temelini de oluşturur. Hipoksik ortamda bozulmuş olan kapiller geçirgenlik, hiperoksijenizasyon sayesinde kısmen düzelir. Böylece ekstravasküler sıvı kaçışı azalır ve ödemin gerilemesine katkı sağlanır [135].

(2) Antitoksik Etki

Hiperbarik oksijen tedavisinin yüksek parsiyel oksijen basıncı sayesinde gösterdiği etkilerden biri de antitoksik özelliktir. Bu etki, özellikle anaerobik bakteriler tarafından üretilen toksinlerin baskılanması ya da etkilerinin engellenmesiyle ortaya çıkar [135].

Gazlı gangren, Clostridium perfringens adlı anaerobik bakterinin neden olduğu, hızla ilerleyen myonekrotik bir enfeksiyondur. Bu bakteri tarafından üretilen alfa toksin, hücre zar yapısını bozar ve kapiller geçirgenliği artırarak şiddetli doku hasarına yol açar [135].

Hiperbarik oksijen tedavisi, bu toksinin üretimini doğrudan baskılayarak etki gösterir. Yüksek konsantrasyonda oksijen varlığında C. perfringens, toksin üretimini sürdüremez. Bu durum, hem doku hasarının ilerlemesini durdurur hem de enfeksiyonun sistemik yayılımını sınırlandırır. Böylece HBO, bu tür olgularda antitoksik bir tedavi aracı olarak önemli bir rol oynar [135].

(3) Antibakteriyel Etki

Hiperbarik oksijen tedavisi, bakterilere karşı etkisini birkaç farklı yoldan gösterir. Bunlardan ilki, özellikle anaerobik bakterilere doğrudan zarar vererek gösterdiği etkilerdir. Bu mikroorganizmalar, serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu sistemlerden yoksun oldukları için yüksek oksijen ortamında hassas hale gelirler. HBO uygulaması sırasında oluşan reaktif

oksijen türleri, bu bakterilerin DNA ve RNA gibi yönetici moleküllerinde geri dönüşümsüz hasarlara yol açar. Hücresel düzeyde metabolik faaliyetleri bozulur ve sonuçta canlılıklarını sürdüremezler [133].

Bazı aerob bakterilerde ise oksijenin etkisi daha karmaşıktır. Düşük basınçlarda, yani yaklaşık 1,5 ATA'ya kadar olan seviyelerde %100 oksijen uygulaması, bazı bakterilerin üremesini destekleyebilir. Ancak basınç yükseldikçe oksijenin baskılayıcı etkisi artar ve bu durum bakteriyel çoğalmayı durdurarak bakteriyostatik bir etki oluşturur [133].

HBO'nun antibakteriyel etkinliği yalnızca doğrudan bakterilere karşı değil, aynı zamanda konak savunma sistemi üzerinden de gerçekleşir. Polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar, enfeksiyonla mücadelede hem oksijen bağımsız hem de oksijen bağımlı yolları kullanır. Ancak hipoksik dokularda, bu hücrelerin oksijene bağlı öldürme kapasitesi belirgin şekilde azalır. Fagositoz sırasında fagozomal membranlarda yer alan oksidaz enzimleri, oksijeni kullanarak reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşturur ve bu mekanizma ancak parsiyel oksijen basıncı 30 mmHg'nin üzerinde olduğunda etkili çalışabilir. Hiperbarik oksijen tedavisi ile bu değer 1200 mmHg'ye kadar çıkabildiğinden, bağışıklık sistemi hücrelerinin enfeksiyon üzerindeki etkinliği anlamlı ölçüde artar [133].

Buna ek olarak, HBO bazı antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında tedaviye sinerjik ya da additif katkı sağlayabilir. Örneğin aminoglikozid antibiyotikler, bakteri hücre duvarını oksijenin yardımıyla geçebildiği için HBO altında daha etkili hale gelir. Aynı şekilde vankomisin, teikoplanin ve bazı florokinolonların da etki gücü artar; bu antibiyotiklerin etkin konsantrasyonları düşerken, etki süreleri uzayabilir [133].

(4) Yara İyileşmesine Etkisi

Yara, doku bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanır. Yara iyileşme süreci; inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma (remodeling) olmak üzere üç ana evreden oluşur [133,134].

İlk faz olan inflamasyon evresinde, doku hasarı sonrası damar bütünlüğü bozulur ve bu bölgede fibrin tıkaç oluşumu ile kanama kontrol altına alınır. Ardından kemotaktik sinyaller aracılığıyla nötrofiller bölgeye göç eder. Damar dışına çıkan nötrofiller, doku içindeki hasarlı yapıları temizlerken aynı zamanda fagositoz yoluyla mikroorganizmalara karşı da savunma oluştururlar. Daha önce belirtildiği gibi HBO tedavisi nötrofillerin hem oksijen bağımlı hem de oksijen bağımsız işlevlerini destekleyerek bu sürecin etkinliğini artırır. İlerleyen dönemde makrofajlar dokuda baskın hale gelirken inflamatuar yanıt devam eder [133,134].

İkinci evre olan proliferasyon fazında yara iyileşmesinin ana hücreleri fibroblastlar ve endotel hücreleridir. Fibroblastlar, dokuya yapı kazandıracak ekstraselüler matriks ve kollajen üretimini üstlenirken; endotel hücreleri anjiyogenez süreciyle yeni damar oluşumunu sağlar. Bu iki süreç birbirine bağımlıdır. Çünkü kollajen üretimi, oksijen gerektiren pirolin ve lizin hidroksilasyonu ile gerçekleşir ve ortamda en az 30–40 mmHg parsiyel oksijen basıncı gerekir. Ancak yara dokusunda bu değer genellikle 20 mmHg'nin altındadır. Bu oksijn seviyelerde fibroblast proliferasyonu, hücre göçü, protein sentezi ve büyüme faktörü üretimi ciddi şekilde yavaşlar. Kısa süreli hipoksi bazı onarıcı süreçleri tetikleyebilse de, uzamış hipoksi yara iyileşmesini durma noktasına getirir [133,134].

HBO tedavisi ile yara bölgesindeki oksijen basıncı artırılarak hipoksiye bağlı yavaşlamış hücresel faaliyetler yeniden hızlandırılır. Oksijenin etkisi yalnızca parsiyel basınca değil, aynı zamanda difüzyon mesafesine de bağlıdır. Parsiyel oksijen basıncı 100 mmHg iken difüzyon mesafesi yaklaşık 64 μm'dir ancak 2000 mmHg'ye çıkarıldığında mesafe 246 μm'a kadar ulaşır. Bu durum, hücrelere oksijen erişimini artırarak iyileşmeyi hızlandırır. Nitekim kültür çalışmaları, tek bir 120 dakikalık HBO seansının ardından fibroblast proliferasyonunun 72 saate kadar devam ettiğini göstermiştir [133,134].

HBO'nun etkisi yalnızca fibroblast sayısının artışı ile sınırlı değildir. Aynı zamanda proteoglikan, hyaluronik asit ve diğer matriks bileşenlerinin sentezi de artar. Bu etki, endotel hücrelerinin çoğalmasında da gözlenmiştir. Böylece iyileşmenin yapısal temeli daha sağlam oluşturulur [133,134].

Kronik yaralarda en sık karşılaşılan sorunlar; hipoksi, ödem ve enfeksiyon döngüsüdür. HBO tedavisi bu döngüyü farklı aşamalarda kırar. Artan oksijen sayesinde; fibroblast aktivitesi, kollajen sentezi, epitel hücre çoğalması, anjiyogenez ve matriks üretimi hızlanır. VEGF ekspresyonu artar, NO aracılığıyla kök hücre mobilizasyonu sağlanır. Aynı zamanda vazokonstriksiyon ile ödem geriler. Bu sayede hipoksi-ödem-hipoksi döngüsü kırılmış olur [133,134].

Yara iyileşmesinin son evresi olan remodeling sürecinde, dokuda biriken kollajen lifleri düzenlenir ve çapraz bağlarla güçlendirilir. Bu bağların oluşumu için de doku içi oksijen parsiyel basıncının 20–60 mmHg aralığında olması gerektiği gösterilmiştir. HBO'nun sağladığı yüksek oksijen parsiyel basıncı bu evreye de doğrudan katkı sağlar [133,134].

Son aşama olan reepitelizasyon evresinde ise epitel hücreleri, granülasyon dokusu üzerinden ilerleyerek yaranın yüzeyini kapatır. Bu faz da oksijene bağımlıdır.

Tüm bu doğrudan fizyolojik etkilerin yanı sıra, ödemin azalması ve enfeksiyonun baskılanması gibi dolaylı etkilerle de HBO tedavisi yara iyileşmesinde önemli bir destek tedavisi olarak yer alır [133,134].

4. Endikasyonlar

Hiperbarik oksijen tedavisi, hem akut hem de kronik bazı klinik durumlarda yardımcı bir tedavi yöntemi olarak hizmet vermektedir. Bununla birlikte tedavi endikasyonları ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir. Merkezi bir uygulama olmayıp genellikle hiperbarik birimlerin bulunduğu ülkenin yerel sağlık politikalarına, klinik aciliyet durumlarına veya sosyal güvenlik sistemine bağlıdır. Bu nedenle, HBOT uluslararası düzeyde hala tam olarak standart olmayan bir tedavi olarak kabul edilir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde bu alandaki uygulamalara Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS) rehberlik ederken Avrupa'da ise European Committee for Hyperbaric Medicine (ECHM) tarafından oluşturulan kılavuzlar esas alınmaktadır. Her iki kuruluş da, tedavinin güvenli, etkin ve bilimsel temellere dayalı biçimde uygulanabilmesi için endikasyonları belirli aralıklarla güncellemektedir.

Türkiye'de HBOT uygulamaları, Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan "Hiperbarik Oksijen Tedavisi Uygulanan Özel Sağlık Kuruluşları Hakkında Yönetmelik" ile yasal zemine oturtulmuştur. Ayrıca uygulamada Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) tarafından belirlenen Sağlık Uygulama Tebliği (SUT) kriterleri esas alınmakta ve bu kapsamda SGK geri ödemesi yapılabilen endikasyonlar tanımlanmaktadır. Uygulamada, UHMS tarafından 2014 yılında yayımlanan endikasyon listesi de birçok merkez tarafından bilimsel referans olarak kabul görmektedir. Son olarak UHMS, 2023 yılında yayımladığı 15. baskı endikasyon listesinde "Femur Başı Osteonekrozu" yeni bir endikasyon olarak tanımlamıştır **(Tablo 1, 2)** [136,137].

Tablo 1. UHMS HBO Tedavisi Endikasyon Listesi

PART I. Indications

1. Hyperbaric Treatment of Air or Gas Embolism: Current Recommendations
2. Arterial Insufficiencies:
   - A. Central Retinal Artery Occlusion
   - B. Hyperbaric Oxygen Therapy for Selected Problem Wounds
3. Carbon Monoxide Poisoning
4. Clostridial Myonecrosis (Gas Gangrene)
5. The Effect of Hyperbaric Oxygen on Compromised Grafts and Flaps.
6. Acute Traumatic Ischemias: Roles of Hyperbaric Oxygen
7. Decompression Sickness.
8. Delayed Radiation Injuries (Soft Tissue and Bony Necrosis) and Potential for Future Research
9. Sudden Sensorineural Hearing Loss
10. Intracranial Abscess
11. Necrotizing Soft Tissue Infections
12. Refractory Osteomyelitis
13. Severe Anemia
14. Adjunctive Hyperbaric Oxygen in the Treatment of Thermal Burns
15. Avascular Necrosis (Aseptic Osteonecrosis).

Tablo 2. Sağlık Bakanlığı HBO Tedavisi Endikasyon Listesi

Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları;
1. Dekompresyon hastalığı,
2. Hava veya gaz embolisi,
3. Karbonmonoksit, siyanid zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu,
4. Gazlı gangren,
5. Yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları (derialtı, kas, fasya),
6. Crush yaralanmaları, kompartıman sendromu ve diğer akut travmatik iskemiler,
7. Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar (diyabetik ve non-diyabetik),
8. Kronik refrakter osteomiyelit,
9. Aşırı kan kaybı,
10. Radyasyon nekrozları,
11. Tutması şüpheli deri flepleri ve greftleri,
12. Termal yanıklar,
13. Beyin absesi,
14. Anoksik ansefolapati,
15. Ani işitme kaybı,
16. Retinal arter oklüzyonu,
17. Kafa kemikleri, sternum ve vertebraların akut osteomyelitleri.

Avrupa'da hiperbarik oksijen tedavisinin uygulanma alanları, European Committee for Hyperbaric Medicine (ECHM) tarafından düzenlenen konsensus toplantıları doğrultusunda belirlenmektedir. Bu kapsamda en önemli referanslardan biri, 2004 yılında gerçekleştirilen 7. Avrupa Hiperbarik Tıp Konsensus Konferansı olmuştur. Bu toplantıda HBOT endikasyonları; bilimsel veriler, klinik deneyimler ve uzman görüşleri ışığında üç ana gruba ayrılmıştır:

-Tip 1: Kuvvetle önerilen endikasyonlar

-Tip 2: Önerilen endikasyonlar

-Tip 3: Opsiyonel (seçimli) endikasyonlar

Bu sınıflandırmanın yanı sıra, her endikasyon kanıta dayalı tıp prensipleri doğrultusunda A'dan F'ye kadar derecelendirilmiştir. Buna göre:

-A düzeyi: Birinci derecede kanıta dayanan, kuvvetle önerilen uygulamalar

-B düzeyi: Orta düzeyde bilimsel destek bulunan endikasyonlar

-C düzeyi: Daha düşük seviyede kanıt sunulan, ancak klinik olarak desteklenebilen durumlar

-D düzeyi: Sadece kontrolsüz çalışmalarla desteklenen, net konsensusa ulaşılmamış alanlar

-E düzeyi: Bilimsel olarak fayda sağladığına dair yeterli kanıt olmayan ya da metodolojik sorunlar barındıran durumlar

-F düzeyi: HBOT'nin kullanılmaması gerektiğine dair kanıtların bulunduğu alanlar

Bu sistematik yaklaşım, HBOT'nin sadece etkin olduğu durumlarda değil, uygulanmasının önerilmediği ya da kontrendike olduğu tabloların da belirlenmesini sağlamıştır. 2016 yılında güncellenen ECHM kılavuzu, bu çerçevede en güncel klinik yönlendirme aracı olarak kabul edilmektedir **(Tablo 3)** [138].

Tablo 3. ECHM HBO Tedavisi Endikasyon Listesi

DURUMLAR	KABUL EDİLEN			KABUL EDİLMEYEN		
	Kanıt Seviyesi			Kanıt Seviyesi		
Tip 1 (Kuvvetle Önerilen)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Karbonmonoksit zehirlenmesi		X				
Crush yaralanması		X				
Diş çekimi sonrası osteoradyonekrozun önlenmesi		X				
Osteoradyonekroz (mandibula)		X				
Yumuşak doku radyonekrozu (sistit)		X				
Dekompresyon hastalığı			X			
Gaz embolisi			X			
Anaerobik veya miks bakteriyel anaerobik enfeksiyonlar			X			
Tip 2 (Önerilen)						
Diyabetik ayak lezyonları		X				
Riskli deri grefti ve muskulokutan flep			X			
Osteoradyonekroz (diğer kemikler)			X			
Radyasyona bağlı proktit/enterit			X			
Radyasyona bağlı yumuşak doku lezyonları			X			
Radyon uygulanmış dokularda cerrahi ve implantasyon (işlem öncesi)			X			
Ani işitme kaybı			X			
İskemik ülser			X			
Refrakter kronik osteomiyelit			X			
Nöroblastom evre 4			X			
Tip 3 (Opsiyonel)						
Post-anoksik ensefalopati			X			
Larinks radyonekrozu			X			
Radyasyona bağlı santral sinir sistemi lezyonu			X			
Vasküler girişim sonrası reperfüzyon hasarı			X			
Uzuv reimplantasyonu			X			
Yüzey alanı %20'yi ve 2. dereceyi geçen yanıklar			X			
Akut iskemik oftalmolojik hastalıklar			X			
İnflamatuvar sürece sekonder iyileşmeyen yaralar			X			
Pnömatozis sistoides intestinalis			X			
Diğer Endikasyonlar						
Post sternotomi mediastinit				X		
İnme				X		
Orak hücreli anemi				X		
Malign otitis eksterna				X		
Akut miyokard infarktüsü				X		
Femur başı nekrozu				X		
Retinitis pigmentoza					X	
Tinnitus					X	
İnterstisyel sistit					X	
Fasial paralizi					X	
Serebral palsi						X
Multipl skleroz						X
Fetoplasental yetmezlik						X

5. Kontrendikasyonları

Hiperbarik oksijen tedavisinde, her hastaya aynı rahatlıkta tedavi uygulanmamaktadır. Bazı klinik durumlar, komplikasyon riskini önemli ölçüde artırabilir. Bu nedenle HBO tedavisi

açısından kontrendikasyonlar iki grupta değerlendirilir: kesin (mutlak) ve göreceli (rölatif) kontrendikasyonlar.

Kesin kontrendikasyonlar, tedavinin asla uygulanmaması gereken durumları belirtmektedir. Günümüzde bu tanıma uyan tek durum tedavi edilmemiş pnömotoraksın varlığıdır. HBO seansında dekompresyon sırasında meydana gelen basınç değişimi, pnömotoraksın hızlı bir şekilde tansiyon pnömotoraksa evrilmesine yol açabilir. Bu durum, hastada yaşamı tehlikeye atan ciddi bir komplikasyon meydana getirir. Ancak acil bir endikasyonla hastaya HBO tedavisi yapılacaksa tedavi öncesinde hastaya göğüs tüpü yerleştirilmeli ve basınç odasına alınmalıdır [139, 140].

Göreceli kontrendikasyonlar, HBO tedavisinin yapılması mutlak engel teşkil etmeyen fakat dikkatli bir değerlendirme ve gerekli önlemlerin alınması gereken durumları ifade eder. Bu hastalarda tedavi kararı klinik tablolarına göre verilir ve komplikasyon riski için hazırlıklı olunmalıdır. İmkan varsa çok kişilik bir basınç odası seçilmeli ve hastaya müdahale edebilecek bir sağlık çalışanının gözetiminde tedaviye devam edilmelidir. [139, 140].

Yaygın olarak kabul edilen göreceli kontrendikasyonlar şu şekilde sıralanabilir:

-Solunum yolu enfeksiyonları

-Kronik obstrüktif akciğer hastalıkları

-Radyolojik olarak saptanan, hava hapsine neden olabilecek asemptomatik akciğer lezyonları

-Geçirilmiş göğüs veya kulak cerrahisi öyküsü

-Kontrol altına alınmamış yüksek ateş (hipertermi)

-Gebelik

-Klostrofobi

-Epilepsi veya nöbet geçirme öyküsü

Bu listenin dışında olmakla birlikte, konjestif kalp yetmezliği, spontan pnömotoraks öyküsü ve herediter sferositoz gibi bazı klinik tablolar da HBO açısından rölatif kontrendikasyon olarak kabul edilmektedir. Bu tür hastalarda HBO uygulanacaksa, hasta yakından izlenmeli, olası komplikasyonlara karşı önceden önlem alınmalı ve seanslar boyunca tıbbi müdahale olanakları hazır bulundurulmalıdır [139, 140].

6. Komplikasyonları

a. Barotravmalar

Barotravmalar, HBO'da en yaygın görülen komplikasyonlardır. Boyle gaz kanununa dayanan barotravmalar içi gazla dolu alanlarda basınç değişimlerine bağlı olarak gerçekleşmektedir [131].

Orta kulak barotravması barotravmalar içinde en yaygın olanıdır. HBO tedavisine ilk defa girecek hastalarda, üst solunum yolu geçirmekte olan hastalar ve en önemlisi kulak eşitleme tekniklerini doğru uygulamayan hastalarda sık görülür. Tedavi öncesi Valsalva, Toynbee vs. kulak eşitleme manevralarının iyice öğretilmesi önemlidir. Ayrıca hastaya kompresyon başlar başlamaz kulak eşitlemesi gerektiği hatırlatılmalıdır [141].

Hastanın kulak ağrısı olduğunda hemen kompresyonu durdurmak gerekir. Bu sayede komplikasyon ilerlemeden önlenebilir. Basınç odasında hastaya refakat eden iç yardımcının hasta ile doğru iletişim kurması önem arz eder. Orta kulak barotravmasının önüne geçmenin bir yolu da yavaş kompresyon uygulamaktır [142].

Orta kulak barotravmalarının birçoğu hafif seyreder ve tedaviye ara verilmesiyle iyileşir. Bazı acil tedavi gerektiren durumlarda, timpanik zarı ve orta kulağı basınç değişiminden korumak için miringotomi yapılabilir. Timpanik zar rüptürleri çoğu zaman kendiliğinden iyileşme gösterir [142].

Barotravmanın görülebileceği diğer yerler, **sinüsler** (frontal, sfenoid, maksiller, etmoid), **dental yapılar**, **akciğerler**, **gastrointestinal sistem**dir. Sinüsler hariç diğerlerinde barotravma görülme olasılığı düşüktür. Ancak akciğer barotravmasında hava embolisi riski olup en tehlikeli olanıdır [142].

b. Oksijen Toksisitesi

Oksijen toksisitesi bir diğer önemli komplikasyondur. Yüksek basınçlı ortamdayken oksijen solunması kısa sürede toksisiteye neden olurken düşük basınçlarda oksijen solunması uzun bir süre sonra toksisiteye neden olacaktır. 0,5 ATA üzerindeki oksijen parsiyel basınçlarında, vücudun antioksidan sistemleri yetersiz kalabilmektedir [143].

Oksijen toksisitesi iki farklı şekilde görülür; Bunlarda biri santral sinir sistemi toksisitesi diğeri ise pulmoner toksisitedir.

Santral sinir sistemi toksisitesi, HBO seansı esnasında en sık gözlenen akut toksisitedir. Çoğunlukla 2 ATA ve üzeri basınçlarda ortaya çıkmaktadır. Parmak uçlarında ve ağız çevresinde karıncalanma, uyuşma, tremor, bulantı gibi bulgular gösterir. Bu bulgular tespit edilir edilmez, hastayı oksijenden ayırmak gerekir. Müdahale edilmemesi halinde grand mal konvülziyona kadar ilerleyebilir [143].

Oksijenin toksik etkilerinden korunmak amacıyla güncel protokollerde 2.8 ATA'nın üzerine çıkılmamakta ve seanslar, oksijen-hava molalı olarak uygulanmaktadır (örneğin 25 dakika oksijen, 5 dakika hava) [143].

Pulmoner toksisite, biraz önce bahsi geçtiği üzere düşük basınçlarda uzun süreli oksijen solunmasıyla meydana gelir. İlk olarak sternum hattında yanma hissi, öksürük gibi bulgular verir. Devamında akut solunum yetmezliğine kadar ilerleyebilir. Tedavisi hastayı bir an önce oksijenden ayırmaktır [143].

HBO tedavisine bağlı nadir ancak tanımlanmış bazı komplikasyonlar da mevcuttur. Özellikle uzun süreli tedavi gören bazı hastalarda **geçici miyopi** geliştiği bildirilmiştir. Bu durumun, lens proteinlerindeki oksidatif değişime bağlı olduğu düşünülmektedir. Genellikle tedavi kesildikten sonra görme keskinliği eski haline döner. Ayrıca literatürde **kıllanma artışı** gibi bazı kozmetik etkiler de nadiren tanımlanmıştır [143].

III. AMAÇLAR

Bu çalışmada, hipoksik bir ortam olan biyofilm katmanı içindeki bakterilerde antibiyotik direnci ve toleransına sebep olan düşük metabolik aktivitenin, Hiperbarik Oksijen Tedavisi verilerek hiperoksi ile tersine çevrilip çevrilemeyeceği araştırılacaktır. Hiperbarik Oksijen Tedavisi adjuvan tedavi olarak antibiyoterapi ile kombine uygulandığında daha düşük antibiyotik dozu ile daha başarılı sonuca ulaşabileceği düşünülmektedir. Öncelikle Fakültemiz dahili ve cerrahi servislerinde yatmakta olan 15 hastadan alınmış endotrakeal aspirat (ETA), bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde üretilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi, bu suşların biyofilm oluşturma kapasitelerinin tespit edilmesi planlanmıştır. Devamında in vitro ortamda Hiperbarik Oksijen Tedavisi ve

kolistinin gerek tek başlarına gerekse kombine olarak uygulanması ve bu tedavilerin biyofilm tabakası üzerine etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

IV. GEREÇ VE YÖNTEM

A. Çalışma Materyali ve Dizaynı

Bu çalışma 2023-2024 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi (İÜ.) İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan >18 yaş 15 hastadan alınan endotrakeal aspirasyon ve bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde üreyen invazif infeksiyon oluşturmuş çoklu ilaca dirençli Pseudomonas spp izolatları üzerinde yapıldı. Hasta ve/veya hasta yakınları bilgilendirilip Gönüllü Onam Formu alınmıştır **(Ek 1)**. Çalışmanın etik kurul onayı alınmıştır. (İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi, Etik Kurul Başkanlığı, Karar no: 2979575) **(Ek 2)**. Çalışma boyunca hasta gizliliğine ve etik kurallara uyulmuştur. On beş adet çok ilaca dirençli Pseudomonas spp izolatı çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan her izolat numaralandırıldı (PO04, PO09 vb.).

B. Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Saklanması

İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Merkezi Laboratuvarı'nda (KÜKENS) mikrobiyolojik olarak klasik yöntemlerle non-fermantatif, oksidaz-pozitif bakteriler Pseudomonas spp. olarak tanımlandı. Pseudomonas suşlarından pyosyanin pigmenti oluşturanlar ve 42 ºC'de üreyebilme yeteneğine sahip olanlar P. aeruginosa olarak adlandırıldı. Tanımlanmasında sorun yaşananlar ise Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostic Systems, MD, ABD) ile tanımlandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Disk difüzyon yöntemiyle dirençli olduğu saptanan izolatların MİK değerleri gradyan testi (Etest®) ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi.

C. Bakterilerin Antibiyotik Direncinin Tanımlaması

Gram-negatif enterik bakterilerde antibiyotik direnci tanımı için aşağıdaki sınıflama kullanıldı: a) çoğul antibiyotik dirençli ("multi-drug resistant", MDR); b) yaygın antibiyotik dirençli ("extremely drug resistant", XDR); c) tüm antibiyotiklere dirençli ("pan-drug

resistant", PDR). Üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana dirençli olan bakteriler MDR olarak, tüm antimikrobiyal kategorilerden en fazla iki antimikrobiyal kategoriye duyarlı olup diğer kategorilerden en az bir ajana dirençli bakteriler XDR olarak ve tüm antimikrobiyal kategorilerde tüm ajanlara dirençli ajanlar PDR olarak tanımlandı [75, 144].

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi KÜKENS Laboratuvarı'nda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ölçütlerine göre Pseudomonas spp. için meropenem <18 mm zon çapı gösteren suşlarda karbapenem direnci düşünüldü. Etest® veya sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle Pseudomonas spp. için EUCAST ölçütlerine göre kolistin MİK değeri >4 mg/l bulunan suşlar kolistine dirençli olarak kabul edildi (2). Çalışmanın standardizasyonu amacıyla kalite kontrol suşları olarak P. aeruginosa ATCC 27853 ve E. coli ATCC 25922 kullanıldı [75, 145, 146]. İzole edilen suşlar %10 gliserinli "Triptic Soy Broth" (TSB) içinde -20ºC'de saklandı **(Resim 1, 2)**.

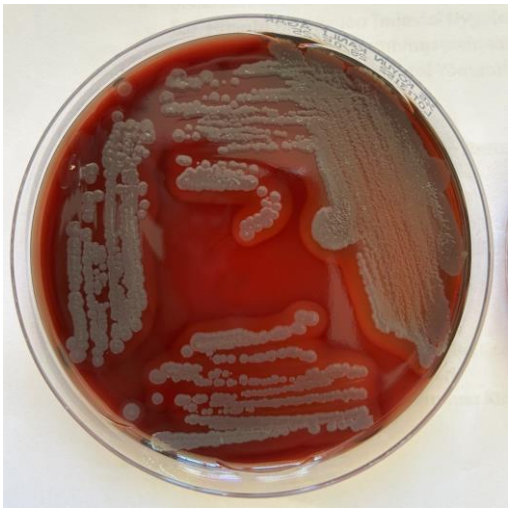
Çalışmaya dahil edilen P. aeruginosa izolatlarının (n=15) meronem, imipenem, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin, sefepim, amikasin, seftazidim antibiyotik dirençlerine disk difüzyön testi ile bakıldı. İzolatların tamamının EUCAST Standartları'nda belirtilen Zon Çaplarına göre dirençli oldukları tespit edildi. **Tablo 4**'de gösterildiği üzere sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile bu izolatların kolistin dirençlerine bakıldı.

Tablo 4. P. aeruginosa izolatlarının (n=15) Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Kolistin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Antibiyotik Duyarlılık Testi	Antibiyotik	PO54	PO01	PO55	PO42	PO40	PO11	PO27	PO06	PO23	PO18	PO43	PO47	PO04	PO09	PO03	Suş No
Sıvı Mikrodilüsyon Testi	Kolistin	<1	2	<1	<1	2	>8	>8	2	>8	>8	1	4	2	2	4	MİK(mg/lt)



Resim 1. %10 Gliserinli ‘’Triptic Soy Broth’’ (TSB) İçinde -20ºC’de Saklanan Suşlar

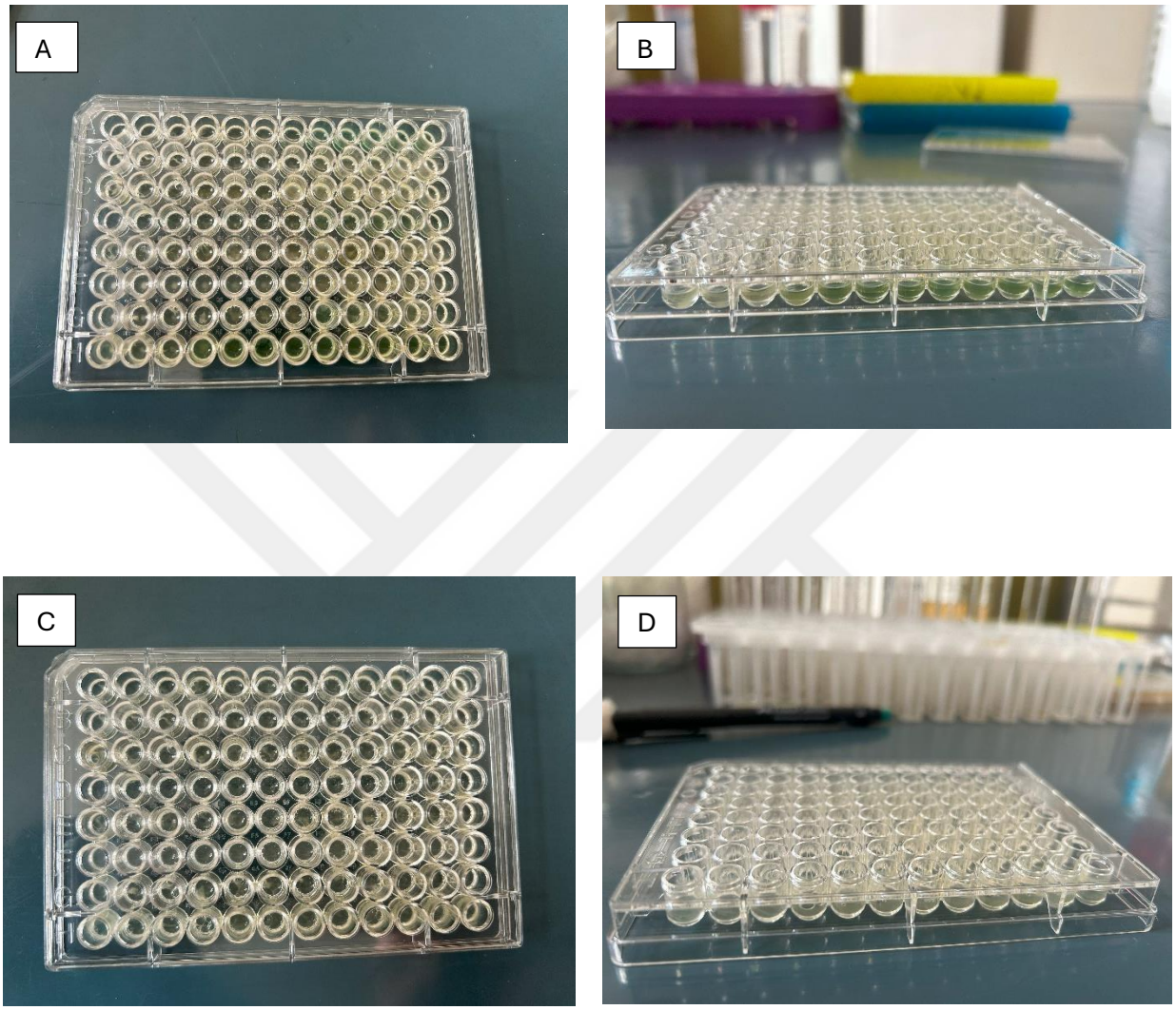


Resim 2. Kanlı Agarda Üreyen Pseudomonas Spp

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi:

İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi KÜKENS Laboratuvarı’nda 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplakların her kuyucuğuna 0.1 ml katyon ilaveli Mueller-Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstad, Almanya) konuldu. İlk kuyucuğa başlanmak istenen antibiyotik konsantrasyonunun iki katı konsantrasyonda hazırlanmış antibiyotik çözeltisinden 0.1 ml eklendi. İlk kuyuda elde edilen 0.2 ml hacimdeki karışımdan (0.1 ml MHB + 0.1 ml antibiyotik çözeltisi) steril pipet uçlarıyla 0.1 ml alınarak diğer kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem son kuyucuğa kadar tekrarlanarak 0.1 ml’lik seri dilüsyonlar elde edildi. Son kuyucuktaki karışım işleminden sonra pipet ucunda kalan 0.1 ml çözelti dışarı atıldı ve son kuyuda da 0.1 ml çözelti olması sağlandı. İlk kuyudaki antibiyotik konsantrasyonu 4096 µg/ml olacak şekilde ilk kuyuya 0.1 ml MHB ve 0.1 ml 8192 µg/ml antibiyotik çözeltisi konuldu. Antibiyotik konsantrasyonlarının 4096 µg/ml, 2048 µg/ml, 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonları oluşturuldu. Yaklaşık 18-24 saatlik inkübasyon sonunda kanlı agarda saf kültür halinde üretilen Pseudomonas spp. kolonileri alınarak 5 ml katyon ilaveli MHB içeren tüplerde homojenize edilerek 0.5 McFarland standardı (1x108 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonları elde edildi. Daha sonra bu bakteri süspansiyonları 1:10 oranında dilüe edildi ve her kuyucuğa 10 µl bakteri süspansiyonu (1x106 CFU/ml) eklenerek mikroplak 37ºC’de 16-24 saat etüvde inkübe edildi. Çıplak gözle kuyucuklardaki üremenin

tamamını inhibe ettiği görülebilen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi **(Resim 3)** [75, 146, 147].

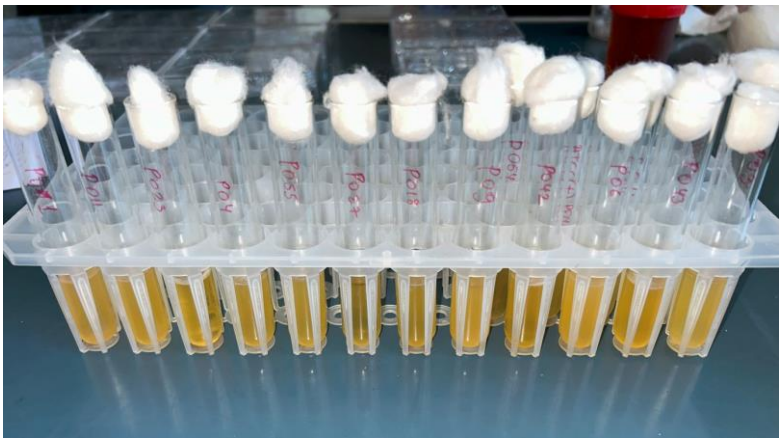


Resim 3. A, B, C, D Mikrodilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibator Konsantrasyonu (MİK) tespiti

D. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

1. Spektrofotometre ile Gösterilmesi

İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi KÜKENS Laboratuvarı'nda kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik P. aeruginosa suşlarının saf kültürleri alınarak 5 ml Triptik Soy Brot (TSB) içeren tüplere 0.5 Mcfarland Standardı bulanıklığında süspansiyon olacak şekilde aktarıldı. Bu tüpler 37ºC'de 18-24 saat inkübe edildi **(Resim 4)**.



Resim 4. Suşların 5 Ml Triptik Soy Brot (TSB) İçeren Tüplerde 37ºc'de 18-24 Saat İnkübe Edilmesi

Ertesi gün, bakteri süspansiyonu 5 ml hacimde 1% glikoz içeren TSB ile 1:50 oranında dilüe edilip 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü mikroplağının her kuyucuğuna 200'er µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bakteri için değerlendirme sonucu ortalaması alınmak üzere ikişer kuyucuk kullanıldı. Mikroplak 37ºC'de 18-24 saat inkübe edildi. Kuyucukların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp steril distile su ile 3 kere yıkandı. Ardından mikroplak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Her kuyucuğa 200 µl 99% konsantrasyonunda metanol konulduktan sonra 15 dk beklenerek fiksasyon yapıldı. Bu işlemin ardından mikroplak boşaltılıp tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ardından kuyucuklara 200 µl 1%'lik kristal viyole solüsyonu konuldu **(Resim 5, 6)**. 15 dk beklenip kuyucuklar çeşme suyu ile yıkanıp kurumaya bırakıldı. Devamında kuyucuk tabanına yapışmış hücrelere bağlanan boya 200 µl 95% etanol ile çözdürülüp kuyucuklardaki çözeltilerin optik dansiteleri İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan spektrofotometre (Epoch, Biotek, Germany) ile 595 nanometre dalga boyunda ölçüldü. Biyofilm negatif kontrol olarak E. coli ATCC 25922 kullanıldı. Negatif kontrolü üzerindeki değerler biyofilm pozitif, negatif kontrole eşit ve altındaki değerler ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi ve bütün suşların değerleri (OD) negatif kontrolün üzerinde çıktı ve bu suşlar biyofilm-pozitif olarak saptandı (**Tablo 5**) [75, 146, 148].

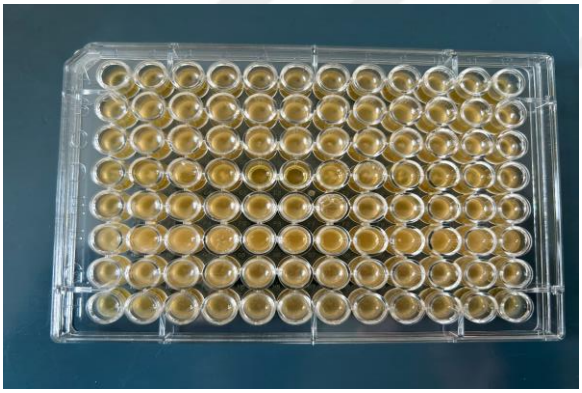
Tablo 5. A, B P. aeruginosa Suşlarının (N=15) ve Kontrol Suşlarının Mikroplak Üzerinde Yerlerinin Gösterilmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PO54	PO54		E.Coli(-)	E.Coli(-)		P.Aeruginosa(+)	P.Aeruginosa(+)		PO47	PO47	
B												
C	PO01	PO01		PO11	PO11		PO23	PO23		PO04	PO04	
D												
E	PO55	PO55		PO27	PO27		PO18	PO18		PO09	PO09	
F												
G	PO42	PO42		PO06	PO06		PO43	PO43		PO03	PO03	
H	PO40	PO40										

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,507	0,53		0,139	0,18		0,39	0,385		0,256	0,272		595
B													595
C	0,418	0,497		0,227	0,283		0,384	0,253		0,317	0,433		595
D													595
E	0,339	0,192		0,501	0,495		0,227	0,239		0,232	0,273		595
F													595
G	0,322	0,338		0,328	0,333		0,246	0,28		0,3	0,366		595
H	0,315	0,366											595

B



Resim 5. 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakta bazal biyofilm oluşumu

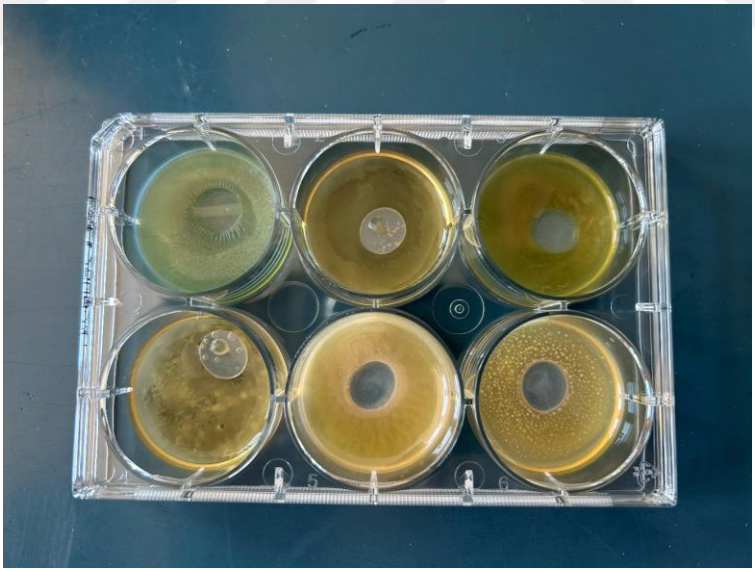


Resim 6. 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakta kristal viyole boyama işlemi

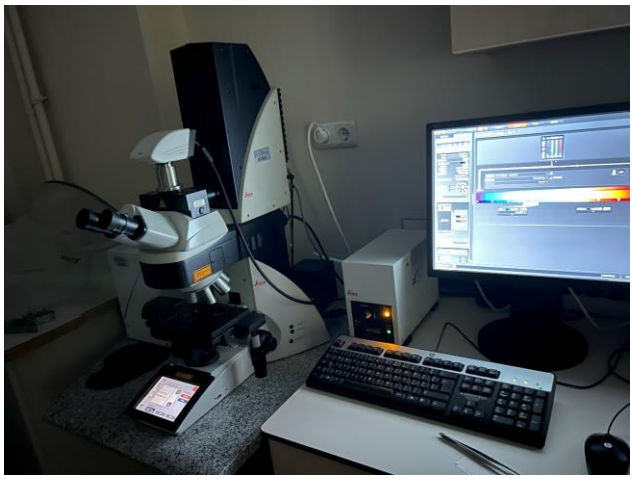
2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Gösterilmesi

İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi KÜKENS Laboratuvarı'nda kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik P. aeruginosa suşlarının saf kültürleri alınarak 5 ml Triptik Soy Brot (TSB) içeren tüplere 0.5 Mcfarland Standardı bulanıklığında süspansiyon olacak şekilde aktarıldı. Bu tüpler 37ºC'de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün, bakteri süspansiyonu 5 ml hacimde 1% glikoz içeren TSB ile 1:50 oranında dilüe edilip 6 kuyucuklu hücre kültürü plağı her kuyucuğuna 1 ml olacak

şekilde dağıtıldı. İçine 10 mm çapında 1 mm kalınlığında, steril, yuvarlak, polivinil klorür (PVC) disk konuldu **(Resim 7)**. Mikroplak 37ºC'de 18-24 saat inkübe edildi. Yuvarlak diskte oluşturulan biyofilm tabakası, kuyucukların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp Fosfat tamponlu salin (PBS, pH ~ 7.4) ile 3 kere yavaşça yıkandı. Ardından bu diskler, canlı, metabolizması aktif hücreleri yeşil renkte gösteren Fluorescein Diacetate (FDA) boyası ve ölü, metabolizması yavaşlamış hücreleri kırmızı renkte gösteren Propidium İodür (PI) boyası ile boyandı. Bu boyama işlemi; FDA/PI 25/ 2.5 µl/ml oranında ve konsantrasyonunda olacak şekilde boyalar hazırlandıktan sonra boyadan 20 µl alınarak PBS ile yıkanan yuvarlak disk üzerine koyuldu. Devamında hazırlanan numuneler ışık görüntüleme işlemine kadar karanlık ve +4 ºC'de bekletildi. Görüntüleme işlemi İÜ. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde bulunan lazer taramalı konfokal mikroskobunda (Leica, TCS SP8 Ted, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) $10\mathcal{X}$ objektif ve $1\mathcal{X}$ büyütme faktörü kullanılarak yapıldı **(Resim 8)**. PI ve FDA boyaları sırasıyla 532 nm ve 488 nm dalga boyu lazerlerle uyarıldı. Her yuvarlak disk için, disk üzerinde 3 farklı odakta fotoğraf çekildi. Her odağa ait 22 adet kesit gösteren fotoğraflama yapıldı [75, 149].



Resim 7. İçinde Steril Disk Bulunan 6 Kuyucuklu Mikroplakta Bazal Biyofilm Oluşumu



Resim 8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (Leica, TCS SP8 Ted, Leica Microsystems CMS Gmbh, Mannheim, Germany)

E. Grupların Belirlenmesi

Çalışmada her gruptaki suş için ayrı mikroplaklara ekim yapılmak üzere 4 farklı grup belirlendi. Bunlar: a) Kontrol b) Sadece Kolistin c) Sadece HBO d) Kolistin ve HBO kombine gruplarıdır.

F. Kolistin ve Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması

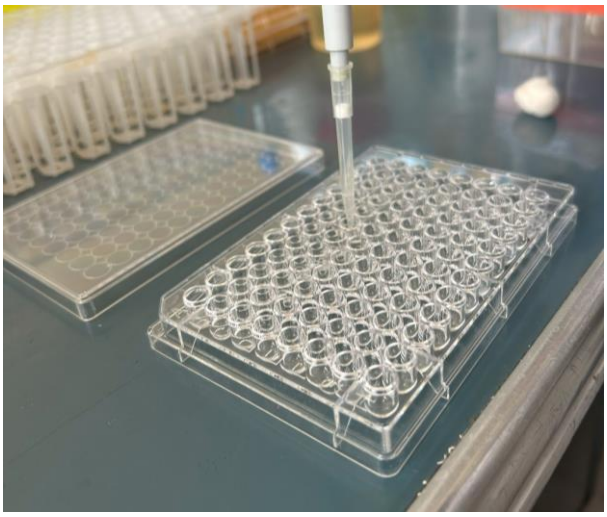
1. Kolistin Sülfat Uygulanması

Kültür işlemleri daha önce belirtilen şekilde yapıldı ve mikroplaklarda bazal biyofilm oluşumu sağlandı.

Bazal biyofilm oluştuktan sonra kuyucuklar içindeki sıvı besiyeri boşaltıldı. Ayrı bir plakta katyon ilaveli TSB ile hazırlanan (512 µg/ml) konsantrasyonunda toz halindeki kolistin sülfattan (Biosynth®) antibiyotik çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyondan, her bir kuyucuk için 200 µl alınarak kuyucuklara koyuldu **(Resim 9)**. Devamında plak 37ºC'de 24 saat incelemesi için belirtilen sürenin sonuna kadar etüvde inkübe edildi [75,77].

Koloni sayım yöntemi ile araştırma için de aynı işlemler uygulandı ancak düz tabanlı plak yerine U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı.

Lazer taramalı konfokal mikroskop ile araştırma için ise aynı işlemler uygulandı ancak 6 kuyucuklu mikroplaklara 200 µl yerine 1 ml'lik çözelti koyuldu.

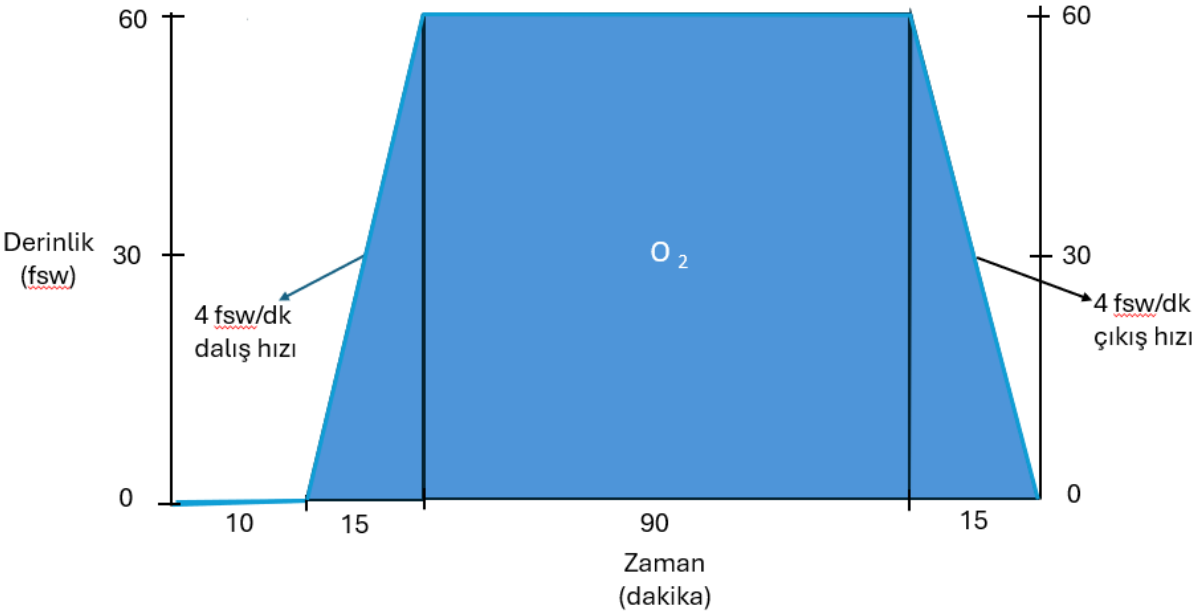


Resim 9. Kolistin Sülfat (512 µg/ml) Solüsyonunun Hazırlanması İşlemi

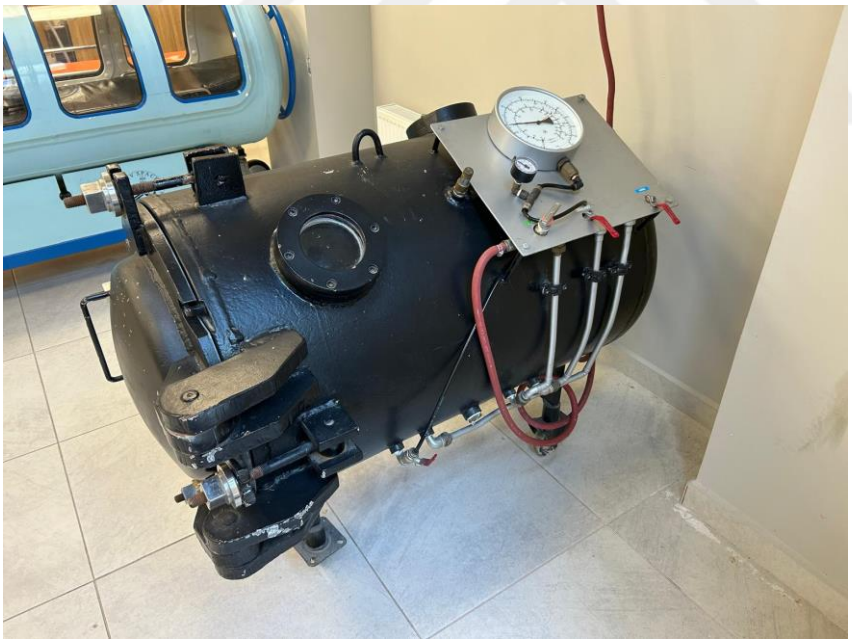
2. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması

Bir önceki alt başlıkta anlatıldığı şekilde kültür işlemleri yapıldıktan sonra mikroplaklarda bazal biyofilm oluşturuldu. Hiperbarik Oksijen Tedavisi (HBOT), İÜ. İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda bulunan deneysel basınç odasında düzenlendi (Resim 10). Kullanılan basınç odasının (Silver Elektromekanik, 1992) boyu 100 cm çapı 68 cm olup hacmi 0.363 metreküptür (m^3). (silindir hacmi formülü $V = \pi \times r^2 \times h$) Kullanılan basınç odası deneysel çalışmalar için üretilmiştir ve 760 mmHg = 1 ATA (Atmosphere Absolute) üzeri basınçta bir ortam oluşturabilen kapalı bir tüptür. İçerisi %100 oksijen ile basınçlanmaktadır.

Çalışmamızda basınç odasının içine koyulan mikroplaklara 2.8 ATA (Atmosphere Absolute)'da 90 dk HBO uygulandı. Tedavi başlamadan önce basınç odasının içi 10 dakika boyunca oksijen ile ventile edilip doyuruldu. Kompresyon işlemi 15 dk (4 fsw/dakika) sürdü ve maksimum derinlikte (18 msw/60 fsw/2.8 ATA) 90 dk süren bir tedavi verildi. Maksimum derinlikteyken daimi şekilde basınç odasındaki havanın ventilasyonu sağlandı. Devamında dekompresyon işlemi 15 dk (4 fsw/dakika) sürdü **(Şekil 2)** [7, 77, 114, 122, 123].



Şekil 2. HBO Tedavi Tablosu (Fsw: Feet Sea Water, Msw: Meter Sea Water)



Resim 10. Deneysel Basınç Odası

Tedavi bitiminde kapakları kapatılan mikroplaklar 24 saat incelemesi belirtilen sürenin sonuna kadar etüvde 37ºC'de inkübe edildi.

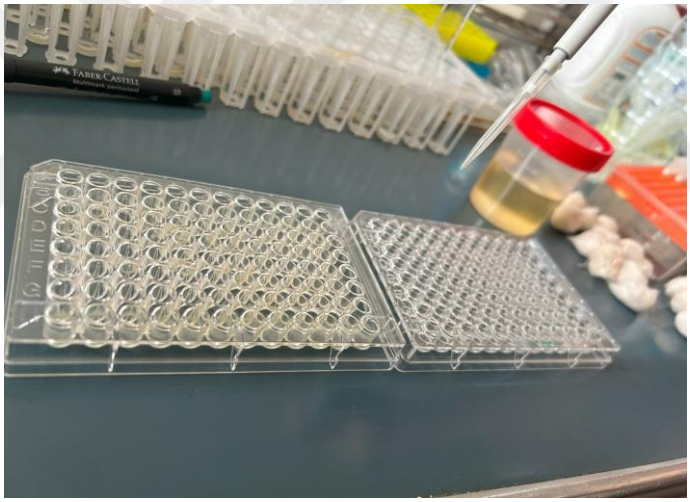
G. Kolistin ve Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Biyofilm Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması

1. Spektrofotometre ile Araştırılması

Çalışmada 4 farklı grup oluşturuldu. Bunlar; kontrol grubu, sadece Kolistin (512 µg/ml) grubu, sadece HBO grubu ve Kolistin (512 µg/ml) ve HBO kombine gruplarıdır. Çalışmada, 2 tanesi kontrol olmak üzere toplamda 17 suş kullanıldı. Biyofilm negatif kontrol olarak E. coli ATCC 25922, pozitif kontrol olarak P. aeruginosa ATCC 27853 kullanıldı **(Resim 11)**.

Bu suşlar aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Daha önce belirtiği gibi kültür işlemi yapıldı ve bazal biyofilmler oluşturuldu. Bazal biyofilm oluştuktan sonra belirtilen şekilde tedaviler uygulandı.



Resim 11. Hazırlanan Kolistin Sülfat (512 mg/ml) Solüsyonunun Mikroplaklara Koyulması İşlemi

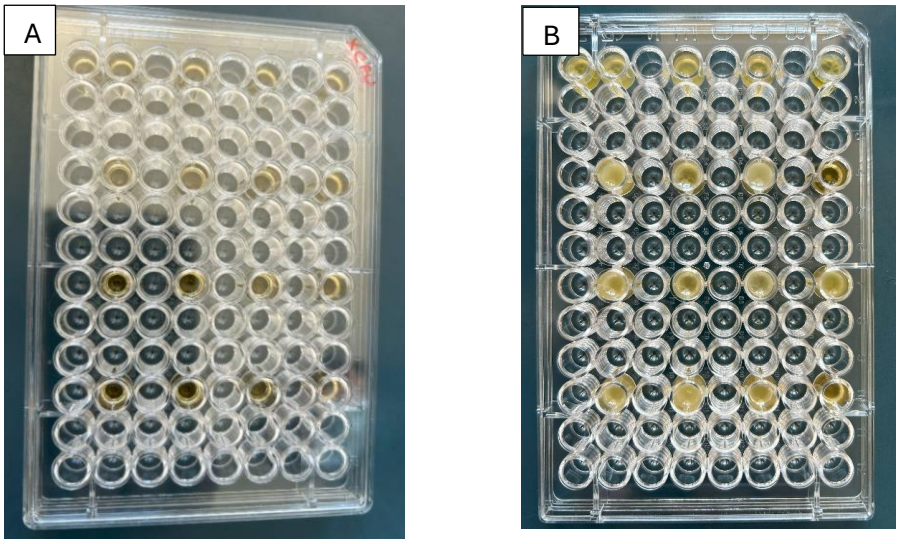
Bazal biyofilm oluşumunun 24. Saatinde daha önce belirtilen şekilde spektrofotometre (Epoch, Biotek, Germany) ile optik dansite ölçümü yapıldı **(Resim 12)**.



Resim 12. Spektrofotometre ile Optik Dansite Ölçümü

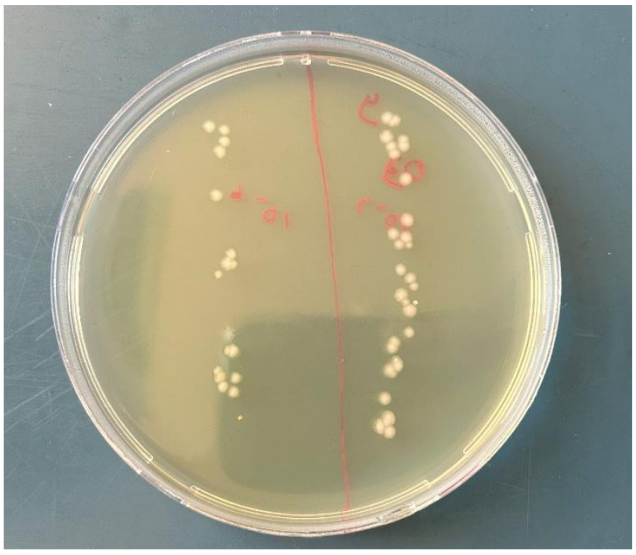
2. Koloni Sayımı Yöntemi ile Araştırılması

Yine dört grup oluşturuldu ve üstte belirtildiği üzere kültür işlemleri yapıldı. Her grup için ayrı ayrı hazırlanan mikroplaklarda bazal biyofilm oluşturuldu. Tedavi protokollerinde belirtiği şekilde gruplara göre tedavileri uygulandı.

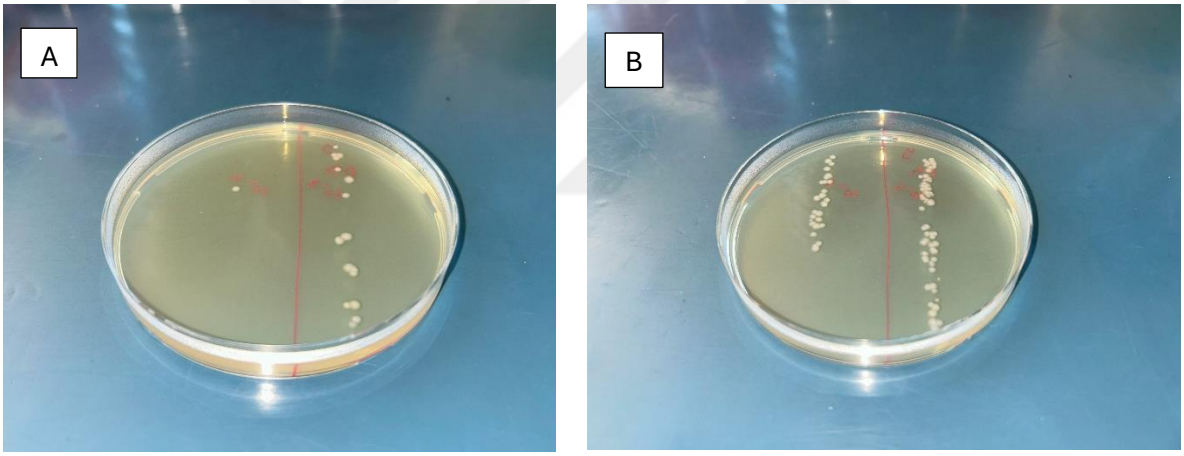


Resim 13. A, B 96 Kuyucuklu U Tabanlı Mikroplakta Bazal Biyofilm Oluşumu Öncesi ve Sonrası (24 Saat)

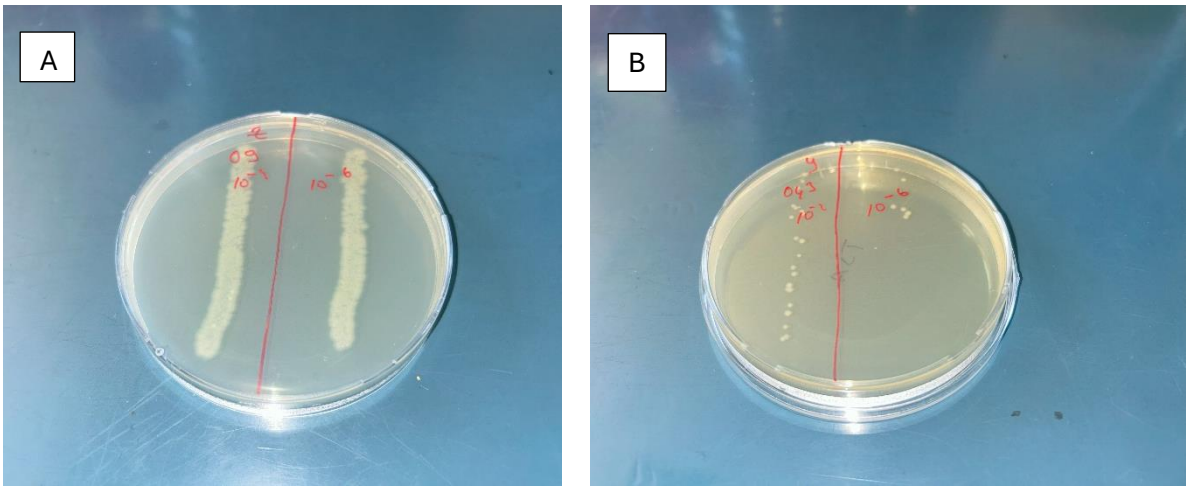
Bazal biyofilm oluşumunun 24. Saatinde bütün plaklardaki kuyucukların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp PBS ile 3 kere yıkandı **(Resim 13)**. Yıkamadan sonra tüm kuyucuklara 100 µl PBS konuldu. Kuyucukların tabanı steril pipet ucuyla iyice kazındı. Devamında plakların üzeri parafilm ile kaplandı, bu sayede kuyucuklar sıvı geçirmez hale getirildi. Sonra plaklara sonikatör (Elmasonic P30H, Germany) cihazında 30 ºC'de 10 dk banyo sonifikasyon işlemi uygulandı. Sonrasında tüm kuyucuklardaki alınan 10 µl'lik solüsyon, PBS ile 10^{-4} ve 10^{-6} (-4, -6) katlarında dilüe edildi. Bu dilüsyonlardan alınan 10 µl solüsyon, 45 derecelik açıyla tutulan triptic soy agara (TSA) akıtma yöntemi ile ekildi. Bu besiyerleri 24 saat 37ºC'de etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda TSA besiyerlerinde üreyen kolonilerin sayımı yapıldı **(Resim 14-18)** [75, 146].



Resim 14. Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO03 Suşunun Triptic Soy Agar'da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler



Resim 15. A, B Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO09 ve PO04 Suşlarının Triptic Soy Agar'da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler.



Resim 16. A, B Sadece HBO Uygulanan Gruptaki PO09 Suşunun ve Sadece Kolistin Uygulanan Gruptaki PO43 Suşunun Triptic Soy Agar'da (TSA) -4 ve -6 Dilüsyonları ile Üreyen Koloniler



Resim 17. Sonikatör Cihazı (Elmasonic P30H, Germany)



Resim 18. Plaklara 30 ºC'de 10 dk Banyo Sonifikasyon İşlemi Uygulanması

3. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Araştırılması

Oluşturulan dört grubun tedavileri üstte belirtildiği şekilde uygulandı. Daha önce belirtilen ile protokol ile lazer taramalı konfokal mikroskobunda (Leica, TCS SP8 Ted, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) fotoğraflamaları yapıldı.

H. İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen verilerin analizinde SPSS (Statistical Package for Social Science, IBM Corp., Armong, NY, ABD) 29.0 programı kullanıldı. Sürekli veriler için ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Sürekli değişkenlerin analizinde dağılımın normal olup olmadığı Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testleriyle kontrol edildi. Dağılımın normal olması halinde parametrik test olan bağımsız T testi kullanıldı. Dağılımın normal olmadığı durumda non-parametrik test olan Mann-Whithey U testi kullandı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

V. BULGULAR

Endotrakeal aspirasyon ve bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleri kullanılan hastaların 13'ü erkek, 2'si kadındır. Yaş ortalamaları 57,64 ± 18,85 yıldır. Hastaların 9'u Anestezi Yoğun Bakım ünitesinde, 2'si Nöroloji Yoğun Bakım ünitesinde, 1'i Beyin ve Sinir Cerrahisi Yoğun Bakım ünitesinde, 1'i Hematoloji servisinde, 1'i Göğüs Hastalıkları servisinde, 1'i Travma Cerrahisi Yoğun Bakım ünitesinde yatmıştır.

A. Spektrofotometrik Yöntem Sonuçları

Uygulanan tedavilerin biyofilm üzerine etkinliğinin spektrofotometrik yöntemle gösterilmesi aşamasında tüm gruplarda elde edilen değerlerin normal dağıldığı saptanmıştır ($p<0,05$).

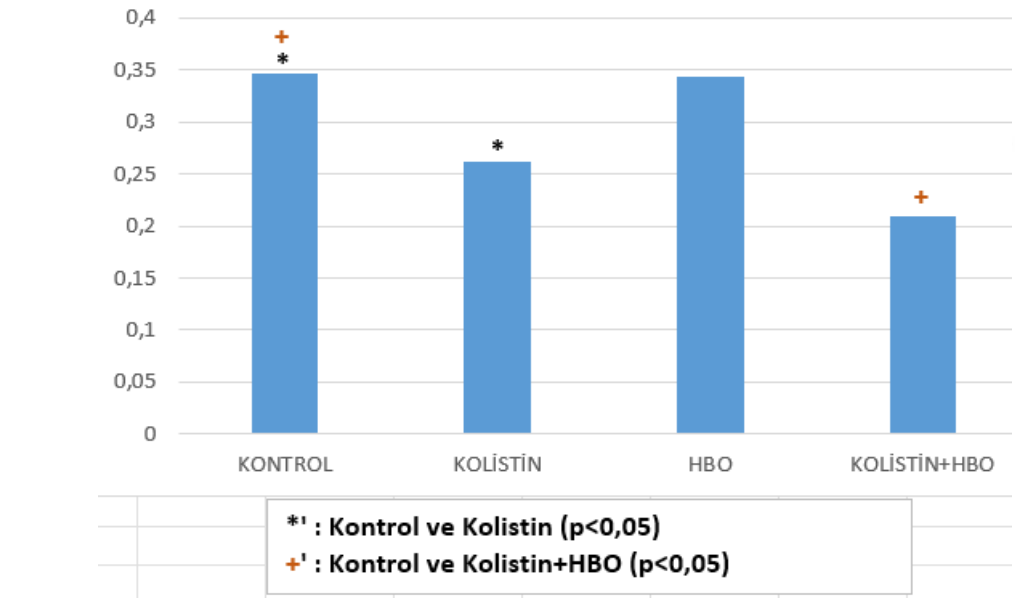
Suşların (n=15) optik dansite ölçümlerinde kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. (**p=0,009**). Ancak HBO ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı **(P=0,955).** Kolistin ve HBO kombine tedavi uygulanan grup değerleri ise kontrol grubundan anlamlı bir biçimde düşük bulundu **(p<0,001).**

Tedavi grupları birbiriyle karşılaştırıldığında; Kolistin grubu ile HBO grubu arasında fark saptanmadı **(p=0,090).** Değerler Kolistin+HBO kombine tedavi grubunda yalnızca HBO grubundan anlamlı biçimde düşüktü **(p=0,008).** Ancak Kolistin+HBO kombine tedavi grupları ile yalnızca kolistin grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuyordu **(p=0,130).**

Gruplarda elde edilen verilerin ortalama ve standart sapmaları ile istastistik analiz sonuçları (T testi) **Tablo 6** ve **Şekil 3**'te yer alan grafikte özetlenmiştir.

Tablo 6. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Optik Dansite (OD) Sonuçlarının Ortalamaları(µm) ve Kontrol Grubu ile İstatistik Karşılaştırmaları

	KONTROL	KOLİSTİN	HBO	KOLİSTİN+HBO
Ort±SD	0,346±0,08	0,261±0,09	0,344±0,16	0,209±0,1
P (kontrol grubuna göre)		**0,009**	0,955	**<0,001**



Şekil 3. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Optik Dansite (OD) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması

B. Koloni Sayımı Sonuçları

Uygulanan tedavilerin biyofilm üzerine etkinliğinin koloni sayımı yöntemi (CFU) ile gösterilmesi aşamasında tüm gruplarda elde edilen değerlerin normal dağılmadığı saptanmıştır.

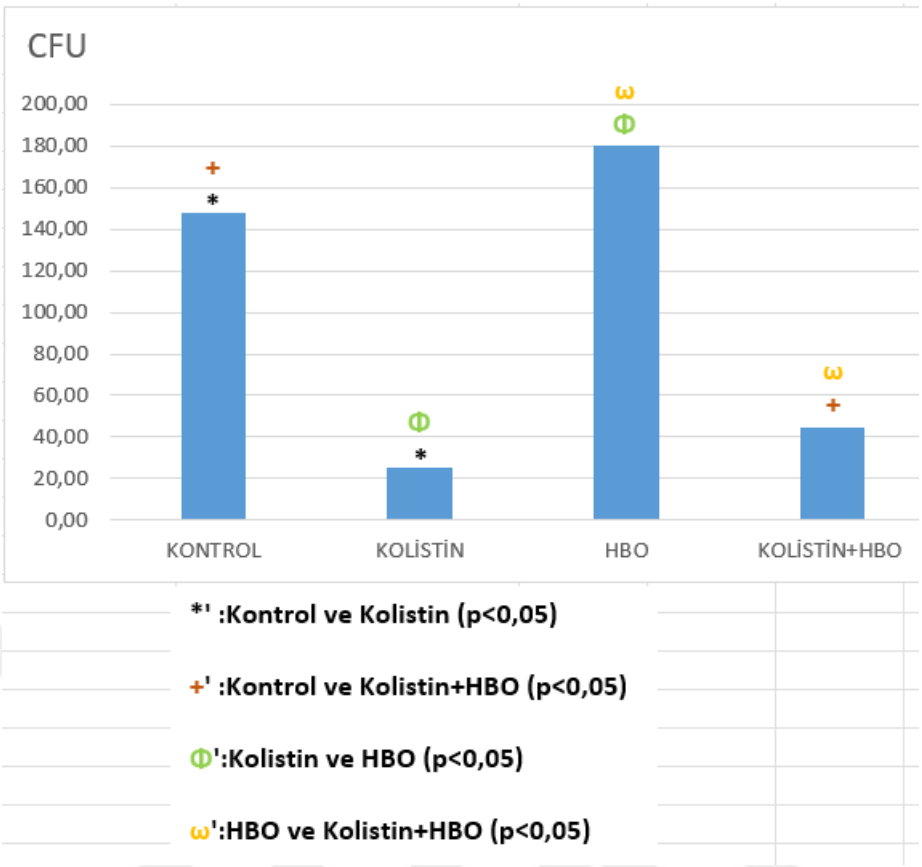
Suşların (n=15) $1/10^6$ (10-6) oranında dilüsyonu ile Triptik Soy agara (TSA) ekimi ile üreyen koloni sayılarının (CFU) karşılaştırılmasında kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (**p<0,001**). Ancak HBO ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı **(p=0,193)**. Kolistin ve HBO kombine tedavi uygulanan grup değerleri ise kontrol grubundan anlamlı bir biçimde düşük bulundu **(p=0,002).**

Tedavi grupları birbiriyle karşılaştırıldığında; Kolistin grubu ile HBO grubu arasında anlamlı fark saptandı **(p<0,002).** Değerler Kolistin+HBO kombine tedavi grubunda yalnızca HBO grubundan anlamlı biçimde düşüktü **(p<0,001).** Ancak Kolistin+HBO kombine tedavi grupları ile yalnızca kolistin grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuyordu **(p=0,355).**

Gruplarda elde edilen verilerin ortalama ve standart sapmaları ile istastistik analiz sonuçları (Mann-Whitney) **Tablo 7** ve **Şekil 4**'te yer alan grafikte özetlenmiştir.

Tablo 7. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU) Sonuçlarının Ortalamaları ve Standart Sapmaları

GRUPLAR	KONTROL	KOLİSTİN	HBO	KOLİSTİN+HBO
Ort±SD	148,06±81,13	25,50±48,66	180±48,66	44,69±48,66
P (kontrol grubuna göre)		**<0,001**	0,193	**0,002**



Şekil 4. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması

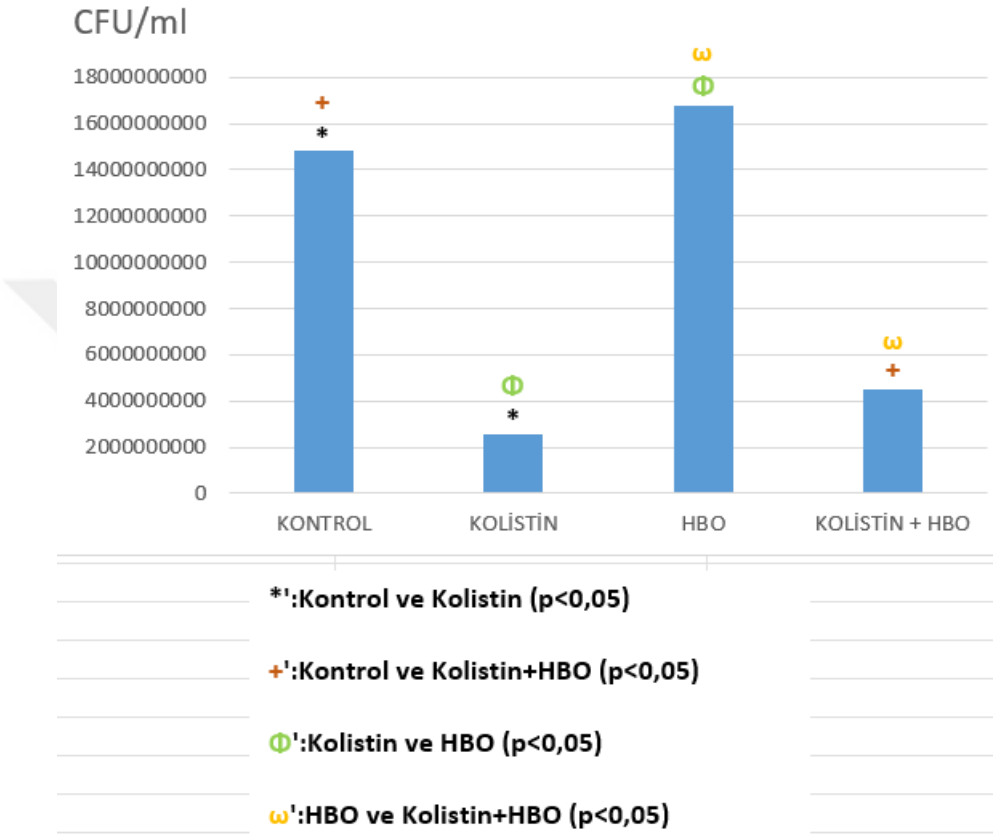
CFU/ml ile uygulanan tedavilerin biyofilm üzerine etkinliğinin gösterilmesi aşamasında tüm gruplarda elde edilen değerlerin normal dağılmadığı saptanmıştır.

Suşların (n=15) $1/10^6$ (10^{-6}) oranında dilüsyonu ile Triptik Soy agara (TSA) ekimi ile üreyen koloni sayılarının (CFU/ml = (koloni sayısı(cfu) x seyreltme faktörü) / kültür plakasının hacmi(ml)) karşılaştırılmasında kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü (**p<0,001**). Ancak HBO ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı **(p=0,428**). Kolistin ve HBO kombine tedavi uygulanan grup değerleri ise kontrol grubundan anlamlı bir biçimde düşük bulundu **(p=0,002).**

Tedavi grupları birbiriyle karşılaştırıldığında; Kolistin grubu ile HBO grubu arasında anlamlı fark saptandı **(p<0,001).** Değerler Kolistin+HBO kombine tedavi grubunda yalnızca HBO grubundan anlamlı biçimde düşüktü **(p<0,001).** Ancak Kolistin+HBO kombine tedavi grupları ile yalnızca kolistin grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuyordu **(p=0,355).**

Gruplarda elde edilen verilerin ortalama ve standart sapmaları ile istatistik analiz sonuçları (Mann-Whitney) **Tablo 8** ve **Şekil 5**'te yer alan grafikte özetlenmiştir.

Tablo 8. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU/ml) Sonuçlarının Ortalamaları ve Standart Sapmaları



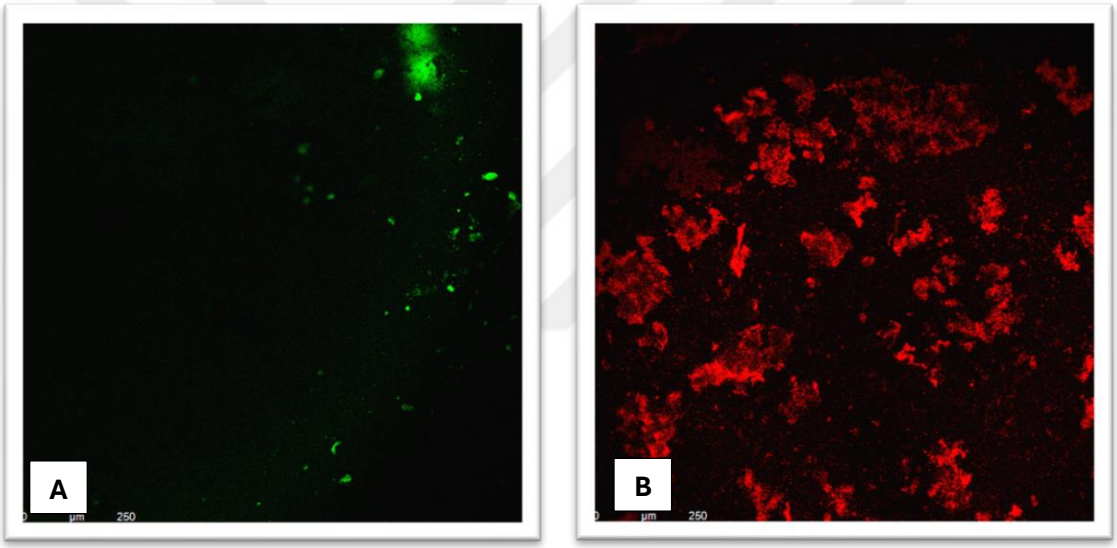
GRUPLAR	KONTROL	KOLİSTİN	HBO	KOLİSTİN + HBO
Ort±SD	14806250000±8112744603	2550000000±4866210024	16800000000±6931666466	4468750000±6489552501
P (kontrol grubuna göre)		**<,001**	0,428	**0,002**

Şekil 5. P. aeruginosa Suşlarının (N=15) Koloni Sayımı (CFU/ml) Sonuçlarının Ortalamalarının Gruplara Göre Karşılaştırılması

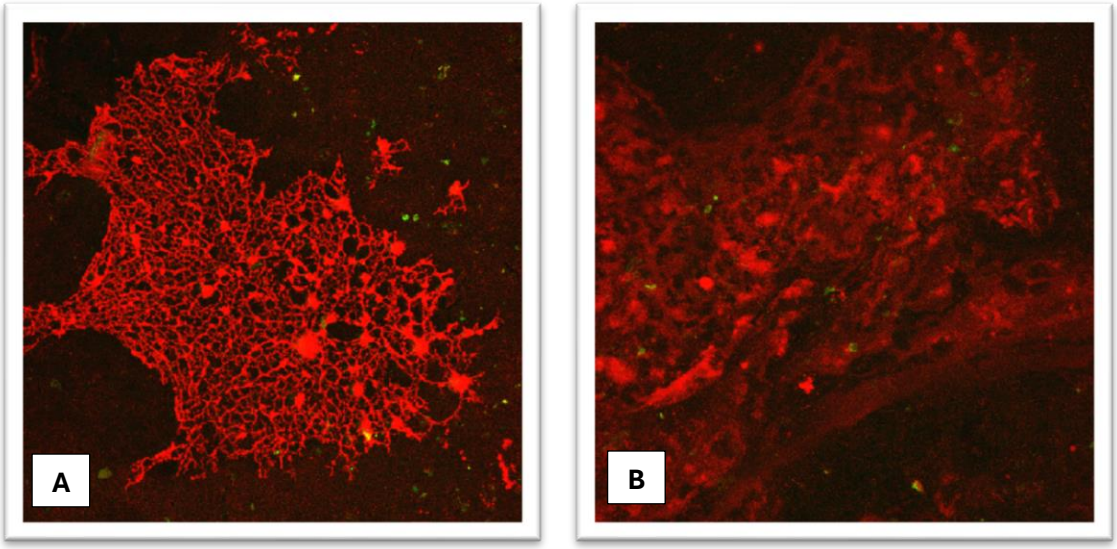
C. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop Sonuçları

Gruplara göre kolistin ve/veya HBO uygulandı ve örnekler boyanarak konfokal lazer taramalı mikroskobu ile disk üzerinde 3 farklı odakta görüntülemesi yapıldı. Diskler üzerinde oluşan biyofilm tabakasının önemli bir kısmının kaymış olduğu ve FDA boyasının (yeşil, canlı hücreler) hücrelere tutunmadığı görüldü. Grupların sayısal ve görsel olarak karşılaştırılması yapılamadı.

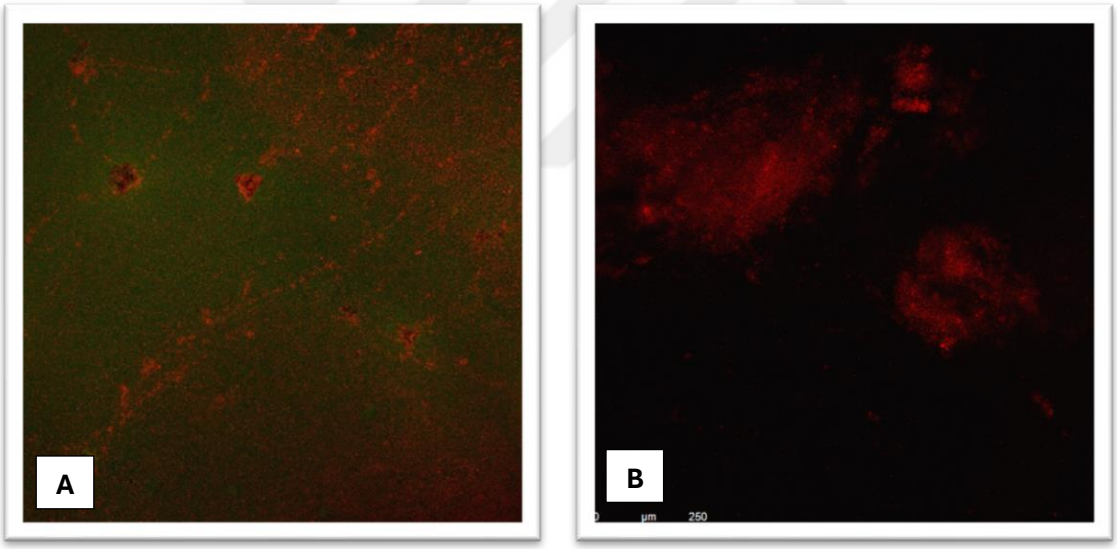
Aşağıdaki fotoğraflarda, bütün suşların konfokal taramalı lazer mikroskobu ile üç odakta yapılan fotoğraflamaları gösterilmiştir **(Resim 19-26)**. Suşların tamamında biyofilm oluşumu saptanmıştır.



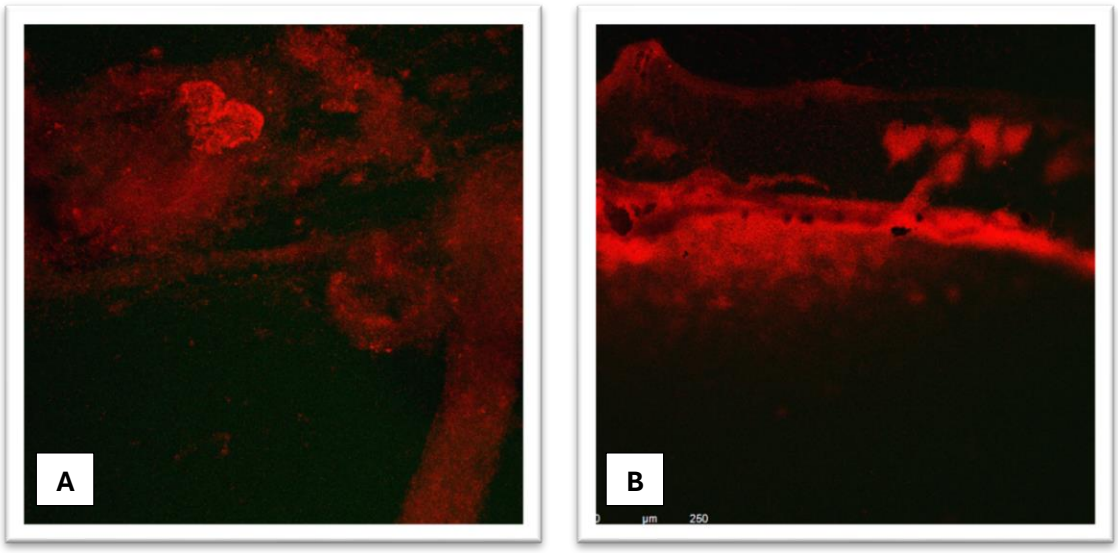
Resim 19. PO01 (A) Ve PO03 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler)



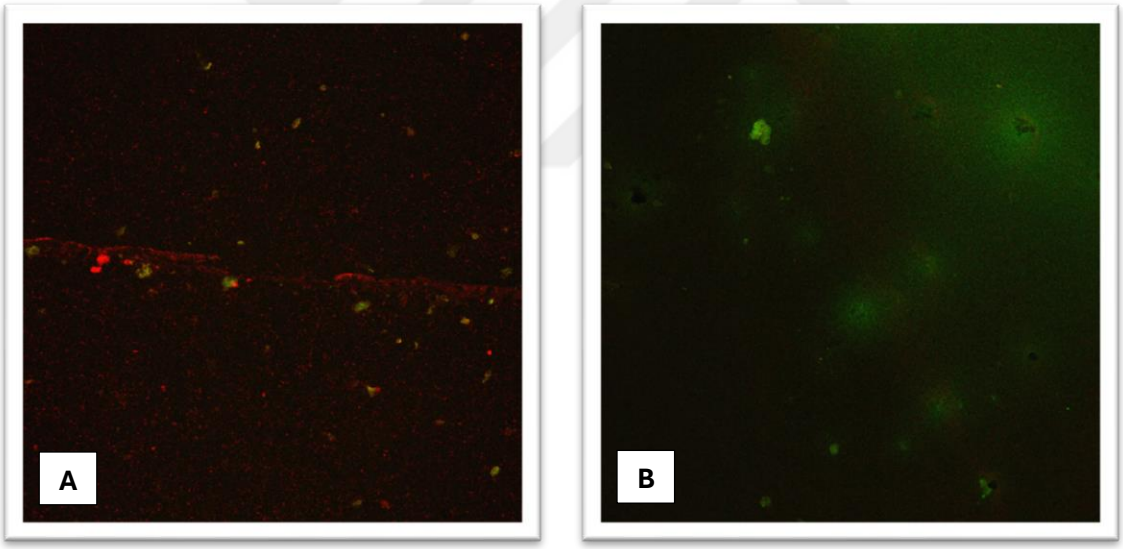
Resim 20. PO04 (A) Ve PO06 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler)



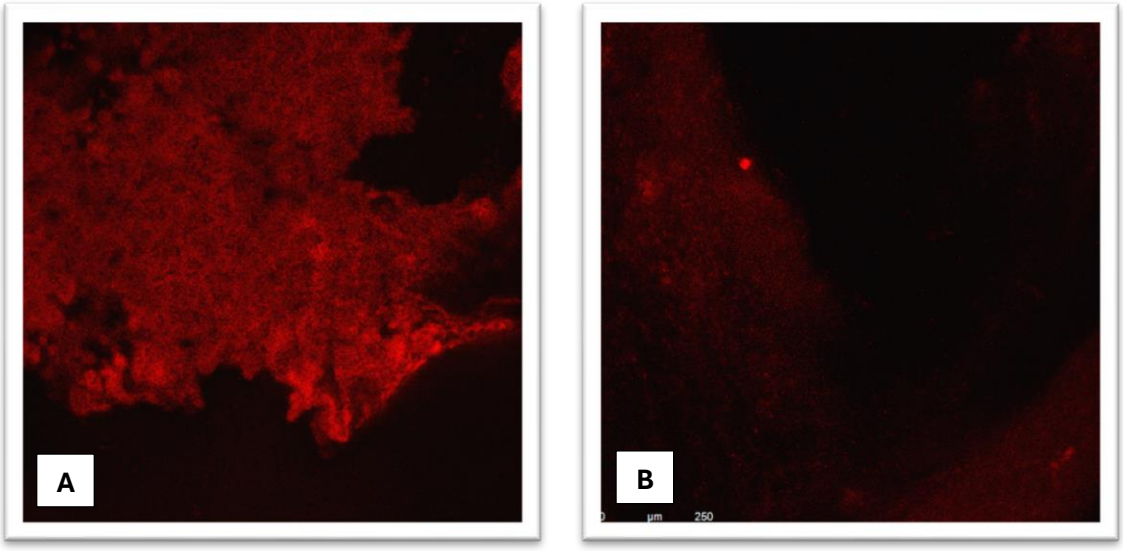
Resim 21. PO09 (A) Ve PO11 (B) Numaralı Suşlarda FDA/Pİ Boyası ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi (Yeşil: Canlı Bakteriler, Kırmızı: Ölü Bakteriler)



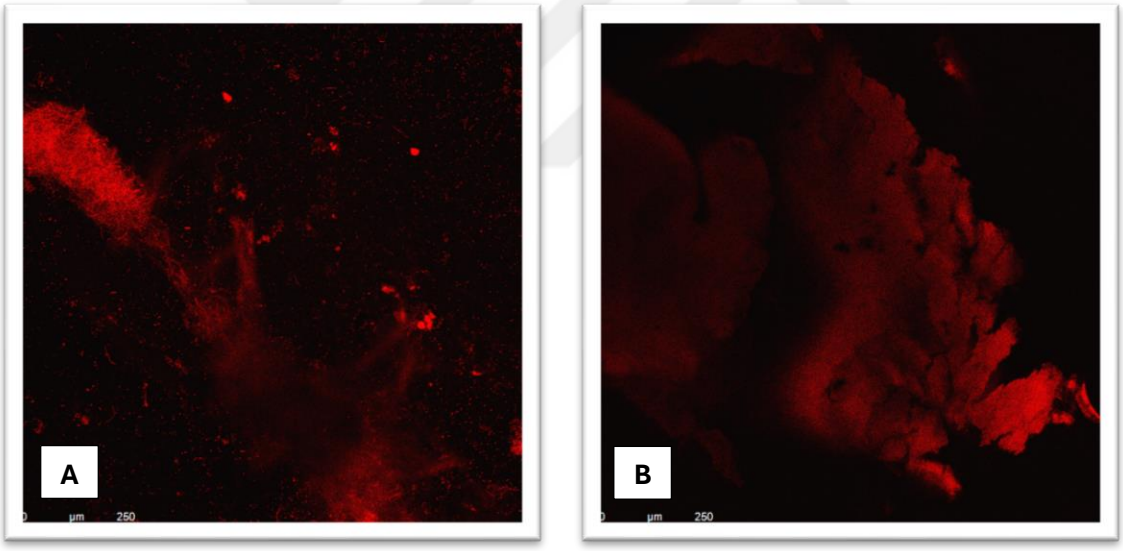
Resim 22. PO18 (A) ve PO23 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler)



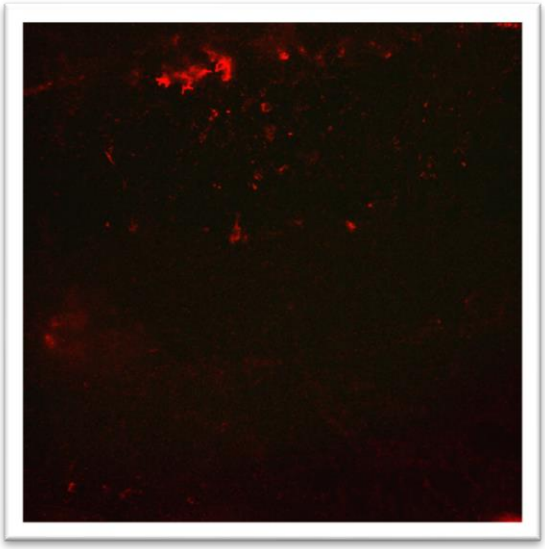
Resim 23. PO27 (A) ve PO40 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler)



Resim 24. PO42 (A) ve PO43 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler)



Resim 25. PO47 (A) ve PO54 (B) numaralı suşlarda FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler)



Resim 26. PO55 numaralı suşun FDA/Pİ boyası ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Yeşil: Canlı bakteriler, Kırmızı: Ölü bakteriler)

VI. TARTIŞMA

Biyofilm tabakasının canlı ve/veya cansız yüzeylerde oluştuğu, kronik osteomyelit, periodontit, diyabetik ayak enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklarla mücadeleyi daha zor hale getirdiği bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız ve hastanemizde yattıkları süreçte hastalardan alınan örneklerden üreyen çok ilaca dirençli P. aeruginosa suşlarının ise birçok çalışmada gösterildiği gibi biyofilm oluşturma kapasitesinin yüksek olduğu daha önce yapılmış araştırmalar ile saptanmıştır [7,114].

Çalışmamızda kullanılan P. aeruginosa suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri yapılırken dünyaca kabul gören European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartları kullanılmıştır. Ayrıca izole ettiğimiz suşları deneylerin gerçekleşeceği zamana kadar Triptic Soy Brot (TSB) içinde -20ºC'de muhafaza edebileceğimiz laboratuvar imkanlarına da sahiptik. Bu sebeple yeterli sayıda örnek toplanması için zamanımız oldu.

Deneylerimizi yaparken daha önce yapılmış araştırmalarda kullanıldığı ve başarı sağlandığını gördüğümüz hücre kültürü plaklarını kullandık. Bu plaklar suşların üremesi, muhafaza edilmesi, transferi ve değerlendirilmesinde bize kolaylık sağladı [7,75,114,146].

Biyofilmi görüntülemek için spektrofotometre ile optik dansite ölçümü yötemi ve konfokal lazer taramalı mikroskopta 3 odakta fotoğraflama yöntemlerini kullandık. Bu iki cihaz da üniversitemizde ve başka birçok merkezde biyofilm görüntülemesinde kullanılan ve sonuç alındığı bilinen yöntemlerdendir [7,75,146].

Çalışmamızı in vitro olarak yapmayı tercih ettik. Çünkü in vivo çalışmada hastadan tedavi öncesi ve sonrası örnek almak kontaminasyon riskini doğuracaktı ve aynı protokolle tedavi verebileceğimiz yeterli sayıda hastaya ulaşmak zor olacaktı. Ayrıca hastalara tedavi için yüksek doz kolistin vermemiz gerekecek ve bu da kolistinden kaynaklı komplikasyon riskini arttıracaktı.

İzole ettiğimiz P. aeruginosa suşlarına uyguladığımız kolistin dozunu belirlerken mikrodilüsyon yöntemiyle belirlediğimiz dozun biyofilm oluşumu ile gelişen antibiyotik direnci 10-1000 kat artabileceğinden bunun alt limiti olan 10 katını aldık. Çünkü kolistin etkinliğini görmek için yeterli doza ihtiyaç vardı ancak suşlarımıza da yüksek doz verip onları öldürmek çalışmayı anlamsız kılacaktı.

Ayrıca suşlara uyguladığımız hiperbarik oksijen (HBO) tedavisini daha önce yapılmış çalışmalarda denendiği şekilde tek seans 2.8 ATA'da 90 dk olarak uyguladık [7,114]. Bunun sebebi örneklerin basınç odasına transferi ve tedavisi esnasında kontaminasyon riskini minimuma indirmek ve standart tedavi basıncı olan 2.4 ATA'ya göre daha yüksek oksijen basıncını sağlamaktı. Ayrıca kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla HBO seansı öncesi basınç odası temizlendi.

Çalışmamızda 4 farklı grup kullandık. Kolistinin biyofilm üzerine etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olup HBO ile kolistinin kombine etkisini tam olarak aydınlatılamamıştır. Grupların dizaynını, kombine tedavinin etkisini değerlendirebileceğimiz şekilde yaptık.

Deneylerimizdeki bir zorluk ise HBO seansı esnasında oksijenin besiyerlerine yeterli difüzyonun sağlanmasıydı. Bunun için daha önce denenen çalışmaları örnek alarak, biyofilm oluşumuna ve sığ bir derinliğe sahip olduğundan oksijenin besiyerine difüzyonuna olanak sağlayan hücre kültürü plaklarını kullandık [7,75,114,146].

Bulgularda hem spektrofotometrede ölçtüğümüz optik dansite sonuçlarında hem de koloni sayım sonuçlarında sadece kolistin uygulanan grupta biyofilm tabakasındaki azalmanın kontrole göre anlamlı derecede fazla olduğunu saptadık. Bununla birlikte sadece HBO uygulanan grup ile kontrol grubu arasında bir fark göremedik. Ek olarak sadece kolistin ve

kolistin ile HBO kombine olarak uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edemedik. İki farklı ölçüm yöntemiyle de aynı sonuca ulaştık.

Farklı bulgulara ulaşan çalışmaları incelediğimizde, örneğin Kolpen ve arkadaşları Pseudomonas aeruginosa suşlarının oluşturduğu biyofilm tabakasının hiperbarik oksijenin etkisiyle siprofloksasine duyarlı hale geldiği sonucuna ulaştıkları görülmektedir. Bu çalışmanın çalışmamızdan farkı antibiyotik olarak kolistin yerine siprofloksasin seçilmesi ve suşlara hiperbarik oksijen tedavisi verilmeden önce onları anoksik ortamda tutarak etkinin maksimum olmasını sağlamalarıdır [7].

Kolpen ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada da benzer olumlu sonuçlara ulaşılmıştır. Pseudomonas aeruginosa suşlarının oluşturduğu biyofilm tabakasına uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinin (2.8 ATA'da) siprofloksasinin etkisini güçlendirdiği sonucuna varılmıştır. Çalışmanın yönteminde oksijenin sıvı besiyerine penetrasyonunu gözlemlemek için oksijen indikatörü olarak metilen mavisi kullanılmıştır. 2 saatlik HBO tedavisi sonrası besiyerinin tamamına yakınında mavi rengin yayıldığı gözlenmiştir. Aynı HBOT protokolünü, fakat farklı antibiyotik kullandığımız deneyimizde bu çalışmadan farklı olarak HBOT'un antibiyotiğin etkisini artırmadığını gözlemledik [114].

Laulund ve arkadaşlarının fareler üzerinde yürüttükleri in vivo bir çalışmada farelerde oluşturulan yara Pseudomonas aeruginosa ile enfekte edilmiştir. Devamında 3 gruba bölünen farelerin bir grubuna sadece siprofloksasin, bir grubuna siprofloksasin ve HBO (Günde iki seans 2.8 ATA'da 90 dk %100 Oksijen), son gruba sadece salin verilmiştir. Bu tedaviler 4 gün boyunca uygulanmış ve 4. günün sonunda sakrifiye edilen farelerden yara yerleri eksize edilip CFU yöntemiyle sayım yapılmıştır. Sonuç olarak kombine tedavi alan grupta en az bakteri üremesi olmuştur. Bu çalışmanın bizim çalışmamızdan temel farkı in vivo olması ve günde 2 seans HBO uygulanmasıdır [122].

Jorgensen ve arkadaşları ise farelerde oluşturulan S. Aureus kaynaklı implant ilişkili osteomyelitte daptomisin ve rifamsine adjuvan olarak uygulanan hiperbarik oksijen tedavisi etkisiz bulunmuştur. In vivo olan bu çalışmada, fareler tedaviye başlanmadan 11 gün önce enfekte edilmiştir. Yöntem olarak 3 ATA'da 14 gün boyunca HBOT, rifampisin ve/veya daptomisin tedavileri uygulanmıştır [121].

Laulund ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, termal yanık yarası oluşturulup Pseudomonas aeruginosa ile enfekte edilmiştir. 3 gruba ayrılan farelerin bir grubuna sadece tobramisin, birine HBO (2.8 ATA'da 90 dk %100 Oksijen) ve

tobramisin kombine tedavi ve son gruba kontrol olarak sadece salin uygulanmıştır. Burada da CFU'ya bakıldığında kombine tedavi alan grupta anlamlı bir azalma saptanmıştır [123].

Kistik fibröz hastalarından alınan akciğer ve paranazal sinüs örneklerinden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşları üzerinde Moller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise tobramisin ile HBO'nun (2.8 ATA'da 90 dk %100 Oksijen) etkisi araştırılmıştır. HBO'nun kısa sürede besiyerine difüze olduğu iğne tipi oksijen mikrosensörü ile tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız HBO protokolünün aynısının uygulandığı bu deneyde bizim bulduğumuz sonuçtan farklı olarak HBO'nun antibiyotiğin etkisini artırdığı gözlenmiştir [77].

Deney modelimizde konfokal lazer taramalı mikroskopta kullandığımız, canlı, metabolizması aktif hücreleri yeşil renkte gösteren Fluorescein Diacetate (FDA) boyasının yeterince tutulum göstermediğini farkettik. Bu sebepten gruplar arasında karşılaştırmayı bu yöntem ile yapamadık ancak bütün suşların biyofilm tabakası oluşturduğunu gösterdik. Boya yeterince karanlık ve soğuk bir ortamda uygulanamadı. Ek olarak transfer esnasında yaşanan zaman kaybından böyle sonuçlandığını düşünüyoruz çünkü herhangi bir tedavi uygulamadığımız kontrol grubumuzda dahi bunu gözlemledik. Bizden sonra yapılacak çalışmalarda bu hususlara dikkat edilmesini öneriyoruz.

Çalışmamızın kısıtlılıklarından bir diğeri de tek seans HBOT uygulanmasıdır. Besiyerlerinin kontaminasyon riskini göze almak istemediğimizden böyle bir yöntem uyguladık. Ayrıca çalışmanın daha fazla örnek ile yapılması sonuçların kesinliğini artıracaktır.

VII. SONUÇ

Bu tıpta uzmanlık tezi çalışmasında fakültemiz dahili ve cerrahi servislerinde yatmakta olan 15 hastadan alınmış endotrakeal aspirat (ETA), bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde üretilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesiyle Çok İlaca Dirençli (MDR) olanları ile biyofilm oluşturulmuş ve bu biyofilmlere kolistin ve HBO tedavilerinin etkileri araştırılmıştır. Kolistinin gerek tek başına gerek HBOT ile kombine verildiğinde biyofilm tabakasında anlamlı ölçüde azalmayı sağladığı saptanmıştır. HBO tedavisinin biyofilm tabakasına karşı etkisiz olduğu gözlemlenmiştir.

VIII. KAYNAKLAR

1. Zhao G, Usui ML, Lippman SI, James GA, Stewart PS, Fleckman P, Olerud JE. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013; 2(7): 389-399. doi: 10.1089/wound.2012.0381.

2. Bjarnsholt T. Introduction to biofilms. In Biofilm Infections. Springer New York. 2011, pp. 1-9. doi: 10.1007/978-1-4419-6084-9_1

3. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med Chem. 2015;7(4): 493-512. doi: 10.4155/fmc.15.6.

4. Aktaş Ş, Ertuğrul MB. Diyabetik Ayak ve Kronik Yaralarda Biyofilm. In: Sakarya S (Ed) Biyofilm Enfeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.26-32.

5. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. QJM. 2004; 97(7): 385-95. doi: 10.1093/qjmed/hch074.

6. Eggleton P, Bishop A, Smerdon G. Safety and efficacy of hyperbaric oxygen therapy in chronic wound management: current evidence. Chronic Wound Care Management and Research. 2015; 2: 81-93. doi: 10.2147/CWCMR.S60319

7. Kolpen M, Lerche CJ, Kragh KN, et al. Hyperbaric oxygen sensitizes anoxic Pseudomonas aeruginosa biofilm to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2017 24;61(11):e01024-17. doi: 10.1128/AAC.01024-17.

8. Lerche CJ, Christophersen LJ, Kolpen M, et al. Hyperbaric oxygen therapy augments tobramycin efficacy in experimental Staphylococcus aureus endocarditis. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50(3): 406-412. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.025.

9. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T, Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years ?(*). Int Wound J. 2012; 9(Suppl 2):1-19. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01097.x.

10. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002; 8(9): 881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063.

11. Kragh KN, Richter K. Introduction: Biofilms 101. In: Richter K, Kragh KN. (eds) Antibiofilm Strategies. Springer Series on Biofilms, vol 11. Springer, pp: 3-15, 2022. doi: 10.1007/978-3-031-10992-8_1

12. Ehrlich GD, Arciola CR. From Koch's postulates to biofilm theory. The lesson of Bill Costerton. Int J Artif Organs. 2012; 35(10): 695-9. doi: 10.5301/ijao.5000169.

13. Armbruster CR, Parsek MR. New insight into the early stages of biofilm formation. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115(17): 4317-4319. doi: 10.1073/pnas.1804084115.

14. Bazaka K, Jacob MV, Crawford RJ, Ivanova EP. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95(2): 299-311. doi: 10.1007/s00253-012-4144-7.

15. Geiger CJ, Wong GCL, O'Toole GA. A bacterial sense of touch: T4P retraction motor as a means of surface sensing by Pseudomonas aeruginosa PA14. J Bacteriol. 2024; 206(7): e0044223. doi: 10.1128/jb.00442-23.

16. Fernández-Grajera M, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón MC, González-Martín ML, Gallardo-Moreno AM. Dynamic adhesive behavior and biofilm formation of Staphylococcus aureus on polylactic acid surfaces in diabetic environments. Materials (Basel). 2024; 17(13): 3349. doi: 10.3390/ma17133349.

17. Chao Y, Zhang T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. Anal Bioanal Chem. 2012; 404(5): 1465-75. doi: 10.1007/s00216-012-6225-y.

18. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. MRS Bull. 2011; 36(5): 347-355. doi: 10.1557/mrs.2011.65

19. Crouzet M, Senechal CL, Brözel VS, et al. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. BMC Microbiol. 2014;14: 253. doi: 10.1186/s12866-014-0253-z.

20. Ferrari BC, Binnerup SJ, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(12): 8714-20. doi: 10.1128/AEM.71.12.8714-8720.2005.

21. Matysik A, Kline KA. Streptococcus pyogenes capsule promotes microcolony-independent biofilm formation. J Bacteriol. 2019; 201(18): e00052-19. doi: 10.1128/JB.00052-19.

22. Johnson LR. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. J Theor Biol. 2008; 251(1): 24-34. doi: 10.1016/j.jtbi.2007.10.039.

23. Conibear TCR, Collins SL, Webb JS., Role of mutation in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. PLoS One. 2009; 4(7): e6289. doi: 10.1371/journal.pone.0006289

24. Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by Streptococcus mutans in biofilms. J Appl Microbiol. 2010; 108(6): 2103-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04616.x

25. Sherman E, Bayles K, Moormeier D, Endres J, Wei T. Observations of shear stress effects on Staphylococcus aureus biofilm formation. mSphere. 2019; 4(4): e00372-19. doi: 10.1128/mSphere.00372-19

26. Moormeier DE, Bayles KW. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. Mol Microbiol. 2017; 104(3): 365-376. doi: 10.1111/mmi.13634

27. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev. 2009; 73(2): 310-47. doi: 10.1128/MMBR.00041-08

28. Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm matrix proteins. Microbiol Spectr. 2015; 3(2): 201-222. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.

29. Kundukad B, Seviour T, Liang Y, Rice SA, Kjelleberg S, Doyle PS. Mechanical properties of the superficial biofilm layer determine the architecture of biofilms. Soft Matter. 2016; 12(26): 5718-26. doi: 10.1039/c6sm00687f

30. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Braz J Microbiol. 2021; 52(4): 1701-1718. doi: 10.1007/s42770-021-00624-x

31. Serra DO, Klauck G, Hengge R. Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of E scherichia coli. Environ Microbiol. 2015; 17(12): 5073-88. doi: 10.1111/1462-2920.12991

32. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiol Rev. 2015; 39(5): 649-69. doi: 10.1093/femsre/fuv015.

33. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. Trends Microbiol. 2020; 28(8): 668-681. doi: 10.1016/j.tim.2020.03.016.

34. McCrate OA, Zhou X, Reichhardt C, Cegelski L. Sum of the parts: composition and architecture of the bacterial extracellular matrix. J Mol Biol. 2013; 425(22): 4286-94. doi: 10.1016/j.jmb.2013.06.022

35. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(9): 623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415.

36. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000; 54: 49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.

37. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(6): 588-94. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.003.

38. Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S-İ. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in Escherichia coli K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. Microbiol Immunol. 2005; 49(9): 875-84. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03678.x.

39. Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, Piveteau P, Guzzo J. Agr system of Listeria monocytogenes EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(19): 6125-33. doi: 10.1128/AEM.00608-07.

40. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals. 2014; 42(1): 1-7. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.11.001.

41. Tolker-Nielsen T. Biofilm development. Microbiol Spectr. 2015; 3(2): MB-0001-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014.

42. van Gestel J, Vlamakis H, Kolter R. Division of labor in biofilms: the ecology of cell differentiation. Microbiol Spectr 2015; 3(2): MB-0002-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0002-2014.

43. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 2010; 89(3): 205-18. doi: 10.1177/0022034509359403

44. Barraud N, Kjelleberg S, Rice SA. Dispersal from microbial biofilms. Microbiol Spectr. 2015; 3(6). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0015-2014.

45. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. Curr Opin Microbiol. 2014; 18: 96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.

46. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. Nat Rev Microbiol. 2011; 10(1): 39-50. doi: 10.1038/nrmicro2695.

47. Guilhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. Mol Microbiol. 2017; 105(2): 188-210. doi: 10.1111/mmi.13698.

48. Wood TK, Hong SH, Ma Q. Engineering biofilm formation and dispersal. Trends Biotechnol. 2011; 29(2): 87-94. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.11.001.

49. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol. 2020; 18(10): 571-586. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0.

50. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, et al. Pseudomonas aeruginosa adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. Nat Rev Microbiol. 2021; 19(5): 331-342. doi: 10.1038/s41579-020-00477-5.

51. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2010; 5(11): 1663-74. doi: 10.2217/fmb.10.125

52. Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. Pseudomonas aeruginosa biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010; 59(3): 292-305. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x.

53. Taylor PK, Yeung ATY, Hancock REW. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. J Biotechnol. 2014; 191: 121-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003.

54. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(5): 1053-6. doi: 10.1093/jac/dkn044.

55. Faure E, Kwong K, Nguyen D. Pseudomonas aeruginosa in chronic lung infections: how to adapt within the host? Front Immunol. 2018; 9: 2416. doi: 10.3389/fimmu.2018.02416.

56. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to antimicrobial agents—how P. aeruginosa can escape antibiotics. Front Microbiol. 2019; 10: 913. doi: 10.3389/fmicb.2019.00913.

57. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2012; 10(12): 841-51. doi: 10.1038/nrmicro2907.

58. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. Pseudomonas aeruginosa biofilms. Int J Mol Sci. 2020; 21(22): 8671. doi: 10.3390/ijms21228671.

59. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. Pseudomonas aeruginosa evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. Trends Microbiol. 2016; 24(5): 327-337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.

60. Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. J Mol Biol. 2015; 427(23): 3628-45. doi: 10.1016/j.jmb.2015.08.016.

61. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(7): 3838-47. doi: 10.1128/AAC.00433-15.

62. Singh S, Datta S, Narayanan KB, Rajnish KN. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. J Genet Eng Biotechnol. 2021; 19(1): 140. doi: 10.1186/s43141-021-00242-y.

63. Liu HY, Prentice EL, Webber MA. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. NPJ Antimicrob Resist. 2024; 2(1): 27. doi: 10.1038/s44259-024-00046-3.

64. Haunreiter VD, Boumasmoud M, Häffner N, et al. In-host evolution of Staphylococcus epidermidis in a pacemaker-associated endocarditis resulting in increased antibiotic tolerance. Nat Commun. 2019; 10(1): 1149. doi: 10.1038/s41467-019-09053-9.

65. Stewart PS, White B, Boegli L, et al. Conceptual model of biofilm antibiotic tolerance that integrates phenomena of diffusion, metabolism, gene expression, and physiology. J Bacteriol. 2019; 201(22): e00307-19. doi: 10.1128/JB.00307-19.

66. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. JJ Med Microbiol. 2011; 60(Pt 6): 699-709. doi: 10.1099/jmm.0.030932-0.

67. Niu H, Gu J, Zhang Y. Bacterial persisters: molecular mechanisms and therapeutic development. Signal Transduct Target Ther. 2024; 9(1): 174. doi: 10.1038/s41392-024-01866-5.

68. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(23): 7116-21. doi: 10.1128/AEM.02636-13.

69. Wu Y, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(9): 4922-6. doi: 10.1128/AAC.00921-12.

70. Xue J, Li S, Wang L, et al. Enhanced fatty acid biosynthesis by Sigma28 in stringent responses contributes to multidrug resistance and biofilm formation in Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 2024; 68(9): e0085024. doi: 10.1128/aac.00850-24.

71. Nasrollahian S, Graham JP, Halaji M. A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. ront Cell Infect Microbiol. 2024; 14: 1387497. doi: 10.3389/fcimb.2024.1387497.

72. Singkham-In U, Phuengmaung P, Makjaroen J, et al. Chlorhexidine promotes Psl expression in Pseudomonas aeruginosa that enhances cell aggregation with preserved pathogenicity demonstrates an adaptation against antiseptic. Int J Mol Sci. 2022; 23(15): 8308. doi: 10.3390/ijms23158308.

73. Varga JJ, Barbier M, Mulet X, et al. Genotypic and phenotypic analyses of a Pseudomonas aeruginosa chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. BMC Genomics. 2015; 16: 883. doi: 10.1186/s12864-015-2069-0.

74. Ding L, Wang J, Cai S, Smyth H, Cui Z. Pulmonary biofilm-based chronic infections and inhaled treatment strategies. Int J Pharm. 2021; 604: 120768. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120768.

75. Tuncer G, Aktas Z, Basaran S, Cagatay A, Eraksoy H. Effect of N-acetyl cysteine, rifampicin, and ozone on biofilm formation in pan-resistant Klebsiella pneumoniae: an experimental study. Sao Paulo Med J. 2024; 142(4): e2023113. doi: 10.1590/1516-3180.2023.0113.R1.29112023.

76. Hilliam Y, Moore MP, Lamont IL, et al. Pseudomonas aeruginosa adaptation and diversification in the non-cystic fibrosis bronchiectasis lung. Eur Respir J. 2017; 49(4): 1602108. doi: 10.1183/13993003.02108-2016.

77. Møller SA, Jensen PØ, Høiby N, et al. Hyperbaric oxygen treatment increases killing of aggregating Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2019; 18(5): 657-664. doi: 10.1016/j.jcf.2019.01.005.

78. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases. Respirology. 2010; 15(7): 1037-56. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x.

79. Vatan A, Saltoğlu N. Biyofilm ve diyabetik ayak infeksiyonları. Klimik Derg. 2017; 30(3): 101-7. doi: 10.5152/kd.2017.27.

80. Wu Y-K, Cheng N-C, Cheng C-M. Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. Trends Biotechnol. 2019;37(5):505-517. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.011.

81. Afonso AC, Oliveira D, Saavedra MJ, Borges A, Simões M. Biofilms in diabetic foot ulcers: impact, risk factors and control strategies. Int J Mol Sci. 2021; 22(15): 8278. doi: 10.3390/ijms22158278.

82. Durand BARN, Pouget C, Magnan C, Molle V, Lavigne J-P, Dunyach-Remy C. Bacterial interactions in the context of chronic wound biofilm: a review. Microorganisms. 2022; 10(8): 1500. doi: 10.3390/microorganisms10081500.

83. Pouget C, Dunyach-Remy C, Pantel A, Schuldiner S, Sotto A, Lavigne J-P. Biofilms in diabetic foot ulcers: significance and clinical relevance. Microorganisms. 2020; 8(10): 1580. doi: 10.3390/microorganisms8101580.

84. Versey Z, Nizer WSdC, Russell E, et al. Biofilm-innate immune interface: contribution to chronic wound formation. Front Immunol. 2021; 12: 648554. doi: 10.3389/fimmu.2021.648554.

85. Neut D, Tijdens-Creusen EJA, Bulstra SK, van der Mei HC, Busscher HJ. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers—a study of 2 cases. Acta Orthop. 2011; 82(3): 383-5. doi: 10.3109/17453674.2011.581265.

86. Barrigah-Benissan K, Ory J, Dunyach-Remy C, Pouget C, Lavigne J-P, Sotto A. Antibiofilm properties of antiseptic agents used on Pseudomonas aeruginosa isolated from diabetic foot ulcers. Int J Mol Sci. 2022; 23(19): 11270. doi: 10.3390/ijms231911270.

87. Wolcott R. Economic aspects of biofilm-based wound care in diabetic foot ulcers. J Wound Care. 2015; 24(5): 189-90, 192-4.

88. Roy S, Santra S, Das A, et al. Staphylococcus aureus biofilm infection compromises wound healing by causing deficiencies in granulation tissue collagen. Ann Surg. 2020; 271(6): 1174-1185. doi: 10.1097/SLA.0000000000003053.

89. Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2018; 36(6): 375-381. doi: 10.1016/j.eimc.2017.04.006.

90. Gunardi WD, Karuniawati A, Umbas R, Bardosono S, Lydia A, Soebandrio A, Safari D. Biofilm-Producing bacteria and risk factors (gender and duration of catheterization) characterized as catheter-associated biofilm formation. Int J Microbiol. 2021; 2021: 8869275. doi: 10.1155/2021/8869275.

91. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. Biomatter. 2012; 2(4): 176-94. doi: 10.4161/biom.22905.

92. Werneburg GT, Nguyen A, Henderson NS, et al. The natural history and composition of urinary catheter biofilms: early uropathogen colonization with intraluminal and distal predominance. J Urol. 2020; 203(2): 357-364. doi: 10.1097/JU.0000000000000492.

93. Zhang J-M, Liu J, Wang K, Zhang X, Zhao T, Luo H-M. Observations of bacterial biofilm on ureteral stent and studies on the distribution of pathogenic bacteria and drug resistance. Urol Int. 2018; 101(3): 320-326. doi: 10.1159/000490621.

94. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(5): 877-86. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.

95. Kaushik A, Kest H, Sood M, Steussy BW, Thieman C, Gupta S. Biofilm producing methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in humans: Clinical implications and management. Pathogens. 2024; 13(1): 76. doi: 10.3390/pathogens13010076.

96. Ghimire N, Pettygrove BA, Pallister KB, et al. Direct microscopic observation of human neutrophil-Staphylococcus aureus interaction in vitro suggests a potential mechanism for initiation of biofilm infection on an implanted medical device. Infect Immun. 2019; 87(12): e00745-19. doi: 10.1128/IAI.00745-19.

97. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. J Hosp Infect. 2001; 49(2): 87-93. doi: 10.1053/jhin.2001.1052.

98. Li B, Webster TJ. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. J Orthop Res. 2018; 36(1): 22-32. doi: 10.1002/jor.23656.

99. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Arch Microbiol. 2016; 198(1): 1-15. doi: 10.1007/s00203-015-1148-6.

100. Almatroudi A. Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. Open Life Sci. 2020; 15(1): 819-839. doi: 10.1515/biol-2020-0094.

101. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. Int J Mol Sci. 2013; 14(9): 18488-501. doi: 10.3390/ijms140918488.

102. Tariq S, Wani S, Rasool W, et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microb Pathog. 2019; 134: 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580.

103. Fleming D. Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. Microorganisms. 2017; 5(2): 15. doi: 10.3390/microorganisms5020015.

104. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. Biochim Biophys Acta. 2016; 1858(5): 1044-60. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.013.

105. Gade PAV, Gade W, Olsen TB, et al. Modelling of ciprofloxacin killing enhanced by hyperbaric oxygen treatment in Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilms. PLoS One. 2018; 13(6): e0198909. doi: 10.1371/journal.pone.0198909.

106. Jensen, P.Ø. et al. Hyperbaric Oxygen Treatment May Advance the Outcome of Antibiotic Treatment of Biofilm Infections. In: Richter, K., Kragh, K.N. (eds) Antibiofilm Strategies. Springer Series on Biofilms, vol 11. Springer, Cham. 2022, pp: 201-233. doi.org/10.1007/978-3-031-10992-8_9.

107. Hu X, Huang Y-Y, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. Front Microbiol. 2018; 9: 1299. doi: 10.3389/fmicb.2018.01299.

108. Martinho I, Braz M, Duarte J, et al. The potential of phage treatment to Inactivate Planktonic and Biofilm-Forming Pseudomonas aeruginosa. Microorganisms. 2024; 12(9): 1795. doi: 10.3390/microorganisms12091795.

109. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

110. Crabbé A, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Coenye T. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms. Trends Microbiol. 2019; 27(10): 850-863. doi: 10.1016/j.tim.2019.05.003.

111. Fang RC, Galiano RD. Adjunctive therapies in the treatment of osteomyelitis. Semin Plast Surg. 2009; 23(2): 141-7. doi: 10.1055/s-0029-1214166.

112. Coulson A, Peek A, Haugen D. Femoral vein cannulation in the treatment of osteomyelitis. Wounds. 2016; 28(6): 194-9.

113. Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. Int J Antimicrob Agents. 2018; 51(3): 299-303. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029.

114. Kolpen M, Mousavi N, Sams T, et al. Reinforcement of the bactericidal effect of ciprofloxacin on Pseudomonas aeruginosa biofilm by hyperbaric oxygen treatment. Int J Antimicrob Agents. 2016; 47(2): 163-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.12.005.

115. Lerche CJ, Schwartz F, Pries-Heje MM, et al. Potential advances of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in infective endocarditis. Front Cell Infect Microbiol. 2022; 12: 805964. doi: 10.3389/fcimb.2022.805964.

116. Jensen PØ, Møller SA, Lerche CJ, et al. Improving antibiotic treatment of bacterial biofilm by hyperbaric oxygen therapy: Not just hot air. Biofilm. 2019; 1: 100008. doi: 10.1016/j.bioflm.2019.100008.

117. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. Adv Ther. 2017; 34(3): 599-610. doi: 10.1007/s12325-017-0478-y.

118. Sanford NE, Wilkinson JE, Nguyen H, Diaz G, Wolcott R. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy in bacterial biofilm eradication. J Wound Care. 2018; 27(Sup1): S20-S28. doi: 10.12968/jowc.2018.27.Sup1.S20.

119. Kim PJ, Steinberg JS. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. Semin Vasc Surg. 2012; 25(2): 70-4. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2012.04.008.

120. Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, Canepari P. Microbiological evaluation of the effects of hyperbaric oxygen on periodontal disease. New Microbiol. 2007; 30(4): 431-7.

121. Jørgensen NP, Hansen K, Andreasen CM, et al. Hyperbaric oxygen therapy is ineffective as an adjuvant to daptomycin with rifampicin treatment in a murine model of Staphylococcus aureus in implant-associated osteomyelitis. Microorganisms. 2017; 5(2): 21. doi: 10.3390/microorganisms5020021.

122. Laulund AS, Schwartz FA, Christophersen L, et al. Hyperbaric oxygen therapy augments ciprofloxacin effect against Pseudomonas aeruginosa biofilm infected chronic wounds in a mouse model. Biofilm. 2022; 5: 100100. doi: 10.1016/j.bioflm.2022.100100.

123. Laulund AS, Schwartz FA, Høiby N, Thomsen K, Moser C. Hyperbaric oxygen therapy counteracts Pseudomonas aeruginosa biofilm micro-compartment phenomenon in murine thermal wounds. Biofilm. 2023; 6: 100159. doi: 10.1016/j.bioflm.2023.100159.

124. Çimşit M. Hiperbarik tedavinin tarihçesi. In: Çimşit M (ed) Hiperbarik Tıp Teori ve Uygulama, Eflatun Yayınevi. Ankara, 2009; pp:1-12

125. Kemer A, Muth C, Mathieu D. Patient Management. In: Mathieu D (ed). Handbook on Hyperbaric Medicine. Springer, Nederlands, 2006; pp: 651-670.

126. Jain K. History Of Hyperbaric Medicine. In: Jain KK (ed). Textbook Of Hyperbaric Medicine. Hogrefe&Huber Publishers. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, 6rd ed., 2017; pp 3-9

127. Wattel F. A history of hyperbaric medicine. In: Mathieu D (ed). Handbook On Hyperbaric Medicine. Springer, Nederlands, 2006, pp: 1-13.

128. Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WH, at al. Life without blood. Ned Tijdschr Geneeskd 1960; 104: 949-54.

129. Kindwall E. A history of hyperbaric medicine. In: Whelan HT, Kindwall EP. (Eds) Hyperbaric Medicine Practice. Best Publ, Arizona, Rev ed, 2002: pp: 1-20.

130. Aktaş, Ş. Sualtı hekimliği ve hiperbarik tıp uzmanlık dalının tarihçesi. In: Ertin H, Salduz A, Yüksel Salduz Zİ (Eds) Tıp Dallarındaki Gelişmelerin Tarihi. Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı, Beşikçizade Tıp ve İnsani Bilimler Merkezi. İstanbul, 2022; pp: 466-479.

131. Kindwall, E., The physics of diving and hyperbaric pressures. In: Whelan HT, Kindwall EP. (Eds) Hyperbaric Medicine Practice. Best Publ, Arizona, Rev ed, 2002: p. 21-35.

132. Lippmann J. Physics and physiology, In: Edmonds C, Bennett M, Lippmann J, Mitchell S (Eds) Diving and Subaquatic Medicine. CRC Press, Florida,5 th ed, 2016; pp: 15-26.

133. Hammarlund C. Physiologic effects of hyperbaric oxygen. In: Whelan HT, Kindwall EP. (Eds) Hyperbaric Medicine Practice. Best Publ, Arizona, Rev ed, 2002: p. 37-68.

134. Çimşit M. Hiperbarik oksijenin etki mekanizması. In: Çimşit M (ed) Hiperbarik Tıp Teori ve Uygulama, Eflatun Yayınevi. Ankara, 2009; pp:35-58.

135. Dean JB, D'Agostino DP. Pressure Effects on Human Physiology. In: Neuman TS, Thom SR (Eds) Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy, W.B. Saunders, 2008; pp: 187-201.

136. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Uygulanan Özel Sağlık Kuruluşları Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete: 24480 Tarih: 1 Ağustos 2001.

137. UHMS. Hyperbaric Oxygen Therapy Indications 15th Edition. Moon RE (ED) Best Publishing Company; 2023.

138. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. Diving Hyperb Med. 2017; 47(1): 24-32. doi: 10.28920/dhm47.1.24-32.

139. Kindwall EP. Contraindications and relative risks of hyperbaric oxygen treatment. In: Whelan HT, Kindwall EP. (Eds) Hyperbaric Medicine Practice. Best Publ, Arizona, Rev ed, 2002: p. 83-98.

140. Çimşit M. İndikasyon, kontrindikasyon ve yan etkiler. In: Çimşit M (ed) Hiperbarik Tıp Teori ve Uygulama, Eflatun Yayınevi. Ankara, 2009; pp:127-144.

141. Edmonds C. Ear barotrauma. In: Edmonds C, Bennett M, Lippmann J, Mitchell S (Eds) Diving and Subaquatic Medicine. CRC Press, Florida,5 th ed, 2016; pp: 81-10.

142. Le PNJ, Slade JB, Kelly JA, Wolf EG. Side effects and complications: Selected overview and brief guide to management. In: Kindwall EP, Whelan HT (Eds), Hyperbaric Medicine Practice. 4th ed, Best Publ, 2017.

143. Annis H, Keval A, Whelan HT. Oxygen toxicity. In: Kindwall EP, Whelan HT (Eds), Hyperbaric Medicine Practice. 4th ed, Best Publ, 2017.

144. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(3): 268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

145. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. https://www.eucast.org

146. Betül Sadıç. Ventilatörle ilişkili pnömonilere neden olan etkenlerde biyofilm oluşumunun ve biyofilm tabakalarına etkili antibiyotiklerin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, 2017, YÖK Ulusal Tez Merkezi, Tez no: 477962.

147. Leber AL, Burnham C-AD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 2. Fourth ed. Washington, DC: ASM Press, 2016: 5.1.12-23.

148. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000; 40(2): 175-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6.

149. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. Clin Oral Investig. 2013; 17(3): 841-50. doi: 10.1007/s00784-012-0792-3.

EK-1

İ.Ü. İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP ANABİLİM DALI
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu bilgilendirilmiş gönüllü olur formu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran kişileri **'Çok İlaca Dirençli Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Oluşturduğu Biyofilme Antibiyotikler Birlikte Hiperbarik Oksijenin Etkinliği'** isimli araştırmaya davet etmek üzere hazırlanmıştır.

Araştırmayı Yürüten Merkez: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Şamil Aktaş

Yardımcı Araştırmacı: Dr. Muhammed Yıldırım

I. Bölüm: Araştırma Hakkında Bilgiler

'Çok İlaca Dirençli Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Oluşturduğu Biyofilme Antibiyotikler Birlikte Hiperbarik Oksijenin Etkinliği' ismini verdiğimiz çalışmaya davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama konusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonucu özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz. Bu belgedeki son bölüm onam işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.

Bu çalışmada, hipoksik bir ortam olan biyofilm katmanı içindeki bakterilerde antibiyotik direnci ve toleransına sebep olan düşük metabolik aktivitenin, Hiperbarik Oksijen Tedavisi verilerek hiperoksi ile tersine çevrilip çevrilemeyeceği araştırılacaktır. Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2 sene boyunca gönderilen balgam, endotrakeal aspirat örneklerinde Pseudomonas aeruginosa üreyen izolatlarla ile çalışılacaktır.

Araştırmada hastalara herhangi bir girişimsel işlem yapılmayacağı için zarar görmeniz beklenmemektedir.

Bu bilgiler tamamen bilimsel amaçlarla kullanılacak olup, kimliğiniz gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırmaya katılmak istememeniz durumunda takip ve tedaviniz bu durumdan etkilenmeyecektir.

II. Bölüm: Katılımcının Beyanı

Prof. Dr. Şamil Aktaş ve ekibi tarafından (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı) **'Çok İlaca Dirençli Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Oluşturduğu Biyofilme Antibiyotikler Birlikte Hiperbarik Oksijenin Etkinliği'** konuda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı Bu bilgilendirmeden sonra böyle bir araştırmaya "gönüllü" olarak katılmak üzere davet edildim, Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim İle aramda kalması gereken bana ait bilgilerin, gizlilik içinde, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile korunacağı güvencesi verildi. Araştırma sonuçlarının eğitim se bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında da kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Tarafıma bir ücret ödenmeyecektir. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle olabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak parasal bir yük altına da girmeyeceğim.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde gönüllü olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir örneğinin bana verileceğini de biliyorum.

III. Bölüm: Gönüllünün Onayı

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırına konusu hakkında bana sözlü ve yazılı açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla dosya bilgilerimin araştırılma için incelenmesini kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Telefon:

Tarih ve İmza:

Velayet veye vesayet altında bulunanlar için veli ve vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Telefon:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Telefon:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonunda kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/göriişme tanığının,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Telefon:

Tarih ve İmza:

Araştırmacılar

Prof. Dr. Şamil Aktaş

İmza

Dr. Muhammed Yıldırım

İmza

Tanığının:

Adı-Soyadı.

Adresi:

Telefon.

Tarih ve İmza:

EK-2

Tarih ve Sayı: 05.12.2024-3053193

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :E-29624016-050.99-3053193
Konu :Prof. Dr. Şamil AKTAŞ hk.

Sayın Prof. Dr. Şamil AKTAŞ
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

İlgi : Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalının 23/10/2024 gün ve 2979575 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Dr. Muhammed YILDIRIM' ın yürüteceği 2024/2081 dosya numaralı "Çok İlaca Dirençli Pseudomonas Aeruginosa Suşlarının Oluşturduğu Biyofilme Antibiyotikle Birlikte Hiperbarik Oksijenin Etkinliği" başlıklı çalışma, kurulumuzun 29/11/2024 tarih ve 23 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ali Yağız ÜRESİN
Kurul Başkanı

Ek:İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSD347Y35VP Pin Kodu :63833 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-ebys
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Çapa/Fatih/ISTANBUL
Tel : 0 212 414 21 38/414 20 00-31561 Faks : 0 212 414 21 38 / 635 11 93
e-posta : itf-dekanlik@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : http://istanbultip.istanbul.edu.tr
Kep Adresi: istanbuluniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için : Cihan KILIÇ
Dahili : 31346