

Pseudomonas aeruginosa Suşlarında İmipenem, Tobramisin ve Curcuminin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi*

Effects of Imipenem, Tobramycin and Curcumin on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Meral KARAMAN¹, Fatih FIRINCI², Zeynep ARIKAN AYYILDIZ², İsmail Hakkı BAHAR³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Multidisciplinary Laboratories, İzmir, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, İzmir, Turkey.

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ve halen devam eden bir araştırmadır.

Geliş Tarihi (Received): 09.04.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.11.2012

ABSTRACT

Aminoglycoside antibiotics and imipenem are reported to stimulate exopolysaccharide alginate production and cause an increased biofilm volume in *Pseudomonas aeruginosa*. Recently, some remarkable studies have been conducted on the effects of curcumin (Turmeric), which is the fenolic form of *Curcuma longa* plant, on virulence factors of *P.aeruginosa*. In this study, we aimed to investigate the effects of MIC and sub-MIC concentrations of imipenem, tobramycin, and curcumin on biofilm formation of *P.aeruginosa* strains. *P.aeruginosa* strains (n= 2) used in this study were isolated from deep oropharyngeal swab samples of two cystic fibrosis patients. Antimicrobial susceptibilities of the two strains to imipenem, tobramycin, and curcumin were investigated by broth microdilution method, and biofilm production was assessed by using crystal violet staining method. In our study, MIC values of imipenem, tobramycin and curcumin for strain-1 were 8 µg/ml, 8 µg/ml and 16 µg/ml, respectively, while those values were 4 µg/ml, 8 µg/ml and 16 µg/ml for strain-2. Biofilm optical density values of the strain-1 and strain-2 before being treated with the test substances were 0.937 and 0.313 (control: 0.090), respectively, Biofilm optical densities of the both strains showed an increase following treatment with MIC concentrations of imipenem and tobramycin. The treatment of the strains with MIC and sub-MIC concentrations of curcumin led to no significant increase in biofilm optical density. The data obtained in this study supported the promising inhibitory effect of curcumin on *P.aeruginosa* biofilms. However, further more comprehensive studies are required to provide satisfactory data about the use of curcumin to treat *P.aeruginosa* infections characterized by biofilm formation.

Key words: Biofilm; curcumin; imipenem; *Pseudomonas aeruginosa*; tobramycin.

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Multidisipliner Laboratuvarları, 35340 İnciraltı, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 2222, **E-posta (E-mail):** meral.karaman@deu.edu.tr

Sayın Editör,

Pseudomonas aeruginosa hastane kökenli enfeksiyonlardan ve kistik fibrozis gibi kronik hastalıklardan sıklıkla soyutlanan mortalite ve morbiditesi yüksek bir enfeksiyon etkenidir. Kistik fibrozisli hastalarda *P.aeruginosa*'nın neden olduğu akciğer enfeksiyonlarının gelişmesinde biyofilm oluşumu önem taşır. Kistik fibrozisli olgular erken yaşlardan itibaren tekrarlayan ve kronik enfeksiyonlara bağlı olarak sıklıkla ve uzun süreli antibiyotik tedavisine maruz kalmaktadır. Tedavide imipenem ve aerosol formda tobramisin sıklıkla kullanılmaktadır; ancak aminoglikozitlerin ve imipenemin bakteride ekzopolisakkarit alginat üretimini yarıdığı ve biyofilm hacminde artışa neden olduğu bildirilmiştir^{1,2}.

Curcuma longa (Turmeric; Zerdaçal), Eski Mısır ve Hindistan'da 6000 yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan antiinflamatuvar, antioksidan ve antitümör etkilere sahip bir bitki olup, bu bitkinin rizomlarından elde edilen curcumin, güçlü antiinflamatuvar etkinliği gösterilmiş sarı bir pigmenttir³. Son zamanlarda curcuminin *P.aeruginosa*'nın virülans faktörleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar dikkati çekmektedir⁴. Bu çalışmada imipenem, tobramisin ve curcuminin MK ve sub-MK yoğunluklarında, *P.aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, kistik fibrozis tanısı ile izlenen, klinik yakınmaları nedeniyle polikliniğe başvuran ve akciğer dinleme bulguları olan iki hastanın derin orofaringeal sürüntü örneklerinden soyutlanan iki *P.aeruginosa* suşu alınmıştır. Suşların tobramisin ve imipenem için MK ve sub-MK değerleri CLSI⁵ standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile, curcumin (Sigma, ABD) için MK ve sub-MK değerleri ise, üretici firma önerilerine göre, maddenin çözündürülmesinin ardından sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır⁶. İzolatların, bu maddelerle karşılaşma sonrası biyofilm üretimleri kristal viyole boyama yöntemiyle spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz için Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılmış; anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda, imipenem, tobramisin ve curcumin MK değerleri suş-1 için sırasıyla; 8 µg/ml, 8 µg/ml ve 16 µg/ml iken, suş-2 için 4 µg/ml, 8 µg/ml ve 16 µg/ml olarak bulunmuştur. Suşların etken maddelerle karşılaşma öncesi biyofilm sonuçlarına bakıldığında; optik dansite suş-1 için 0.937 ve suş-2 için 0.313 olarak bulunmuştur (kontrol kuyucukları ortalaması: 0.090). İmipenem, tobramisin ve curcuminin MK yoğunlukları ile karşılaşma sonrası her iki suşun da biyofilm optik dansitelerinde artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Biyofilm optik dansitelerinde görülen artış, curcuminde, imipenem ve tobramisine göre daha düşük oranda gözlenmiştir ($p = 0.01$). Suşların imipenem ve tobramisin sub-MK yoğunlukları ile karşılaşma sonrasında genel olarak biyofilm optik dansite artışının devam ettiği görülmüştür. Curcuminin MK değerlerinde ise her iki suş için biyofilm optik dansiteleri benzer oranlarda bulunurken, sub-MK yoğunluklarına bakıldığında optik dansite aralıklarında dalgalanmalar olmakla birlikte genel olarak MK düzeylerinde seyrettiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda kistik fibrozisli hastalarda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin MK değerlerine bakıldığında, suş-1'in imipenem ve tobramisine orta duyarlı, suş-2'nin ise imipeneme duyarlı, tobramisine orta duyarlı olduğu saptanmıştır. Biyofilm pozitif olan bu suşların, antibiyotiklerin MK yoğunluklarında biyofilm optik dansitelerine bakıldığında ise, imipenem için özellikle suş-1'in biyofilm yoğunluğunda yüksek oranda artış olduğu saptanmış, sub-MK yoğunluklarında dalgalanmalar olmakla birlikte artışın devam ettiği gözlenmiştir. Aerosol formda tobramisin, kistik fibrozis hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gibson ve arkadaşları⁷, bu ilacın tükürükte yüksek konsantrasyonlara ulaşabildiğini, buna karşılık alveolar bölgede ve bronşiyollerde azalan oksijen miktarına bağlı olarak gerekli konsantrasyonlara ulaşamadığını belirtmektedir. Çoban ve arkadaşları⁸ da kistik fibrozisli hastalardan izole edilen 60 *P.aeruginosa* suşundan 20'sinin biyofilm ürettiğini, bunların dokuzunun mukoid koloni morfotipinde olduğunu, biyofilm üreten ve üretmeyen her iki grupta da en düşük etkili ilacın tobramisin olduğunu bildirmişlerdir. Landry ve arkadaşları⁹ *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci üzerine yaptıkları bir çalışmada, biyofilmlerin, tobramisin toleransını artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, suşların izole edildiği iki hastanın son 16 ay içindeki klinik izlemlerine bakıldığında, tekrarlayan aerosol tobramisin kullanımları olduğu görülmüştür. Tobramisin MK ve sub-MK yoğunluklarında *P.ae-*

ruginosa biyofilm oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde ise, her iki suşta da biyofilm optik dansitelerinde belirgin artış olduğu izlenmiştir.

Son yıllarda, biyofilm oluşumunun önlenmesi ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif yaklaşımlar gündeme gelmiştir. Bunlar arasında bitkisel maddeler önemli yer tutmaktadır. Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin fenolik formudur ve antiseptik özelliği nedeniyle yiyecek endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Curcuminin antifungal ve antibakteriyel etkinliği de bildirilmiştir¹⁰⁻¹². Yüksek dozlarında bile toksik olmadığı bildirilen bu madde, *National Cancer Institute* tarafından da GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak sınıflandırılmıştır¹³. Rudrappa ve arkadaşları⁴, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinden ve çeşitli virülan faktörlerinin üretiminden sorumlu tutulan "quorum sensing" sisteminin kontrolünde curcuminin alternatif olabileceğini belirtmektedir. Sonuç olarak, *P.aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde halen yaygın olarak kullanılan aerosol formda tobramisin ve imipenem kullanımını dikkatli olunması gerektiği; verilerimizin, literatürde *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde bitkisel ajan curcuminin kullanılabilirliği yönündeki bilgileri desteklediği, ancak bu konuda daha fazla suş sayısı ile yapılacak kapsamlı çalışmalara gerek olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4): 1175-87.
2. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; 436(7054): 1171-5.
3. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 1-75.
4. Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem* 2008; 56(6): 1955-62.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M07-A8. 2008, 8th ed. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
6. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(2): 337-9.
7. Gibson RL, Emerson J, McNamara S, et al; Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network Study Group. Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(6): 841-9.
8. Coban AY, Ciftci A, Onuk EE, et al. Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(4): 563-73.
9. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 2006; 59(1): 142-51.
10. Egan ME, Pearson M, Weiner SA, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 2004; 304(5670): 600-2.
11. Wang Y, Lu Z, Wu H, Lv F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2009; 136(1): 71-4.
12. Karaman M, Ankan Ayyıldız Z, Fırıncı F, et al. Effects of curcumin on lung histopathology and fungal burden in a mouse model of chronic asthma and oropharyngeal candidiasis. *Arch Med Res* 2011; 42(2): 79-87.
13. Itokawa H, Shi Q, Akiyama T, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med* 2008; 3: 11.