

Kurkumin, Timpanostomi Tüpleri Yüzeyinde *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilminin Oluşmasına Engel Olabilir mi?

Can Curcumin Prevent the Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on the Surface of Tympanostomy Tubes?

Zafer ÇİFTÇİ¹, Mahmut DENİZ¹, Hayati GÜNEŞ², Abdullah GÜMÜŞ², Erdoğan GÜLTEKİN¹, Aynur EREN TOPKAYA²

¹ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Tekirdağ.

¹ Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology, Tekirdağ, Turkey.

² Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

² Namık Kemal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Tekirdağ, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.01.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.05.2015

ÖZ

Timpanostomi tüpü konulduktan sonra gelişen otorelerden, en çok tüp yüzeyinde oluşan bakteriyel biyofilm sorumlu tutulmaktadır. Bu durumun önlenmesi için çok değişik yöntemler denenmiş ve bu yöntemlerin bazılarıyla da değişen oranlarda başarı elde edilebilmiştir. Ancak yöntemlerin hiçbiri biyofilm oluşumunu tamamen önleyememiştir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, Curcuma longa (zerdeçal)'nın fenolik formu olan kurkuminin *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörlerini etkilediğine dikkat çekilmiştir. Bu çalışmanın amacı, kurkuminin, in vitro ortamda, silikon timpanostomi tüplerinin yüzeyinde *P.aeruginosa* biyofilminin oluşumuna engel olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu amaçla, azalan konsantrasyonlarda kurkumin içeren kuyucuklar içerisinde 48 saatlik bir inkübasyonu takiben, timpanostomi tüpleri yüzeyinde oluşan *P.aeruginosa* biyofilminin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Kalitatif analiz için, tüpler çevresel taramalı elektron mikroskopu ile incelenerek biyofilm varlığı açısından değerlendirilmiştir. Kantitatif analiz için, öncelikle tüp yüzeyinde tutunmuş olan bakteriler vorteksleme ve sonikasyon işlemleri kullanılarak tüp yüzeylerinden ayrıştırılmış; elde edilen bakteri solüsyonlarının seri (10'un katları olacak şekilde) dilüsyonları yapılmıştır. Seri dilüsyonlardan kalibre özeler kullanılarak koyun kanlı agarlara sayım plağı şeklinde ekim yapılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında kültürler değerlendirilerek sayım sonuçları koloni oluşturan birim (CFU)/mL olarak kaydedilmiştir. Çevresel taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 100 µg/mL'lik kurkumin konsantrasyonun biyofilm oluşumunu önleyebildiğini ortaya koymuştur. Daha düşük konsantrasyonlarda, kurkuminin biyofilm oluşumunu azalttığı, ancak tamamen önleyemediği görülmüştür. Kantitatif analiz sonuçları da, kuyucuklardaki kurkumin konsantrasyonu azaldıkça, CFU/

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Aynur Eren Topkaya, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 59100, Tekirdağ, Türkiye. Tel (Phone): +90 282 250 5171, E-posta (E-mail): aynurtopkaya@yahoo.com

mL değerlerinde anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir. 100 µg/mL ve 12.5 µg/mL gruplarındaki CFU/mL değerleri sırasıyla, 35 ± 7.07 ve 650 ± 494 olarak tespit edilmiştir. Kurkuminin in vitro ortamda, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinden daha düşük konsantrasyonlarda timpanostomi tüplerinin yüzeyinde *P.aeruginosa* biyofilminin oluşumunu engellediği saptanmıştır. Çalışmamızın bulguları, kurkuminin lokal olarak uygulanmasının, timpanostomi tüpü konulması sonrası süpüratif otitis media gelişimine engel olabileceğini, tüpün lümeninin açık kalmasını sağlayabileceğini ve tedavi başarısızlık oranlarını azaltabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, kurkuminin in vitro koşullarda saptadığımız *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu önleyici etkisinin in vivo çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Biyofilm; kurkumin; otore; P.aeruginosa; timpanostomi tüpü.*

ABSTRACT

Formation of bacterial biofilm on the surface of tympanostomy tubes are held responsible in the pathogenesis of post-tympanostomy tube otorrhea. To prevent the formation of biofilm, various methods were employed and varying degrees of success have been achieved. In some recent studies curcumin, which is the fenolic form of *Curcuma longa* (turmeric), has been pointed out to have inhibitory effects on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this study was to investigate whether the administration of curcumin is able to prevent the formation of *P.aeruginosa* biofilm on the surface of silicone tympanostomy tubes in vitro conditions. For this purpose, qualitative and quantitative analysis of *P.aeruginosa* biofilm created on the surface of the tympanostomy tubes were performed following a period of 48 hours incubation in microplate wells that contained decreasing concentrations of curcumin. For qualitative analysis, specimens were evaluated with an environmental scanning electron microscope for the existence of biofilm. For the quantitative analysis, bacteria attached to the tube surface was detached using a combination of vortexing and sonication. Following serial dilutions, the obtained solution was then inoculated on the sheep blood agar plates using calibrated loop, incubated for 24 hours and the colony forming unit (CFU) per mL were recorded. Environmental scanning electron microscope analysis revealed that 100 µg/mL of curcumin could prevent formation of the biofilm. Lower concentrations of curcumin could not prevent the biofilm formation. Qualitative analysis also revealed that when the concentrations of curcumin in the wells were decreased, the number of CFU/mL was increased significantly. Mean number of CFU in 100 µg/mL and 12.5 µg/mL groups were 35 ± 7.07 and 650 ± 494 , respectively. Curcumin could prevent formation of *P.aeruginosa* biofilm on the surface of tympanostomy tubes in vitro with concentrations lower than the MIC value. The results of the present study show that local administration of curcumin may prevent suppurative otitis media following tympanostomy tube insertion, keep the patency of the tube and decrease the rate of treatment failure. In vivo studies are needed to support the in vitro anti-biofilm action of curcumin on tympanostomy tubes.

Keywords: *Biofilm; curcumin; otorrhea; P.aeruginosa; tympanostomy tube.*

GİRİŞ

Tıbbi tedaviye yanıt alınamayan efüzyonlu otitis media olguları için genellikle cerrahi bir girişime ihtiyaç duyulabilmektedir. Olası yapısal ve fonksiyonel komplikasyonları nedeniyle, reküren veya persistan efüzyonlu otitis media tanısı ile izlenen hastaların büyük bir çoğunluğu, timpanostomi tüpü (TT) yerleştirilmesi ve efüzyonun cerrahi olarak uzaklaştırılması amacıyla kulak burun boğaz hekimlerine yönlendirilmektedir¹. Bununla beraber, cerrahi tedavinin kendisinin de bir dizi komplikasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu komplikasyonlar arasında en çok öne çıkan, "timpanostomi tüpü sonrası

otore”(TTSO) adı verilen durumdur. Operasyonu takiben hastaların %5-38’inde bu durumun gelişebildiği bildirilmiştir². TTSO, tedavi başarısını olumsuz bir şekilde etkilemekte, hasta memnuniyetini azaltmakta ve sağlık bakım harcamalarını artırmaktadır. Etiyolojide; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*’nin da dahil olduğu bir dizi patojen sorumlu tutulmaktadır³. Bu patojenlerin arasında özellikle *P.aeruginosa*’nın çocuklarda yaş veya mevsim farkı gözetmeksizin etken olarak izole edilebildiği ve TTSO’nun ampirik tedavisinin planlanmasında mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir⁴.

TTSO’nun önlenmesi ve tedavi edilmesi için lokal veya sistemik yollarla kullanılabilen çeşitli tedavi seçenekleri önerilmiştir⁵. Minimum ototoksosite potansiyelleri ve kulak patojenlerine karşı geniş etkinlik spektrumları nedeniyle, topikal florokinolonlar TTSO’nun tedavisinde tercih edilmektedir. Buna rağmen, bu ilaçların aşırı kullanımı ile ilişkili olarak bakteriyel direncin indüklenebildiği ve bu durumun da tedavi başarısızlığını artırdığı bildirilmiştir⁶.

Tedavi başarısızlığının diğer bir nedeni olarak, enfeksiyon bölgesinde biyofilm üreten bakterilerin kolonize olduğu öne sürülmüştür. Biyofilm içerisindeki bakterilerin, çeşitli fiziksel ve kimyasal mekanizmaları kullanarak, antimikrobialer tarafından yok edilmeye karşı koyabildikleri gösterilmiştir⁷. Otitis media, tonsillit ve rinosinüzit gibi birçok enfeksiyonun kronikleşmesinden biyofilm üreten bakterilerin varlığı sorumlu tutulmaktadır⁸. TTSO’nun ortaya çıkması ile tüp yüzeyinde bakteriyel patojenler tarafından biyofilm oluşturulması arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir⁹. Pediatrik hasta grubunda yapılan bir çalışmada, siprofloksasin içeren kulak damlaları ile tedavi edilmeye çalışılan TTSO’larda *P.aeruginosa*’nın oluşturduğu biyofilm, tedaviye yanıtızlığın sorumlusu olarak saptanmıştır¹⁰. Timpanostomi tüpleri yüzeyindeki matür biyofilmleri eradike etmek veya tüp yüzeyinde biyofilm oluşumunu önleyebilmek amacıyla, timpanostomi tüplerinin içerisine çeşitli topikal ilaçlar damlatılmış veya tüp yapısına dahil edilmiştir. Ayrıca tüp yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak modifiye edilmesi gibi birçok metot kullanılmış ve bunların değişen oranlarda anti-biyofilm etkinlik gösterdiği belirtilmiştir^{11,12}. Bununla beraber, Wang ve arkadaşları¹³, yakın zamanda yayınladıkları bir derlemede, bakterilerin yüzeyine tutunamayacağı ideal bir timpanostomi tüpünün olmadığı gerçeğinin altını çizmiş ve biyofilm ile mücadele için yeni stratejiler geliştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Toksik olmayan diyetsel bir fitokimyasal ve diferuloilmetan olan kurkuminin, *P.aeruginosa*’ya karşı antibakteriyel etkinliği olduğu bildirilmiştir^{14,15}. Kurkumin, zerdeçalın (*Curcuma longa*) aktif bileşenidir ve bakterisidal aktivitesinin yanında, biyofilm oluşumuna da engel olabilme yeteneği vardır. Kurkuminin bu etkisinin, bakterinin virülans faktörlerini azaltarak, hücreler arası haberleşme mekanizmalarını (quorum sensing) inhibe ederek ve biyofilm başlatma genlerini baskılayarak gerçekleştirebildiği öne sürülmüştür. Kurkuminin, minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinden daha düşük dozlarda bile uygulanması durumunda, biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği gösterilmiştir¹⁶. Bu çalışmada, in vitro ortamda kurkuminin silikon timpanostomi tüpleri yüzeyinde *P.aeruginosa*’nın biyofilm oluşturmasını engelleyebilme yeteneğinin araştırılması ve bu etkiyi sağlayabilecek minimum kurkumin konsantrasyonunun saptanması amaçlanmıştır.

Kurkuminin *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmaya etkisi, hem kalitatif hem de kantitatif yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Silikon timpanostomi tüpleri (TT), steril bistüri ile dikdörtgen şeklinde 2x5 mm boyutlarında parçalara ayrıldı. Bu çalışmada kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Mikroskopik analiz için, çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscope; ESEM) (Quanta 250 FEG, ESEM, Fei Company, Oregon) kullanıldı. Tüplerin vortekslenmesi için vorteks cihazı (Ika Vortex 1, Almanya) ve sonikasyonları için ultrasonik banyo (Banderin Sonorex Digital 10P, Almanya) kullanıldı.

Deneyler düz tabanlı kuyucuklu steril mikropalaklar kullanılarak ve Rudrappa T ve arkadaşlarının¹⁶ yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Birinci mikropalkta, ilk sırasındaki altı kuyucuğun içerisine, kesilerek hazırlanmış olan TT parçaları yerleştirildi. Daha sonra kuyucuklara 100 µg Mueller-Hinton sıvı besiyeri eklendi. Hazırlanan kurkumin solüsyonu ilk kuyucuğa eklendi ve seri dilüsyonları yapılarak iki, üç ve dördüncü kuyucuklara da konuldu. *P.aeruginosa*'nın ATCC 27853 suşu kullanılarak, biyofilm oluşumunun incelenmesi 24 saatlik inkübasyonu takiben 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri solüsyonu elde edildi. Solüsyon 100 kat dilüe edilerek 106 CFU (koloni oluşturan ünite)/mL bakteri içerecek şekilde hazırlandı. Mikroplağın ilk sırasındaki ilk beş kuyucuğun içerisine bu solüsyondan 100'er µL eklendi. Böylece ilk dört kuyucuktaki kurkumin konsantrasyonunun sırasıyla 100, 50, 25, ve 12,5 µg/mL olması sağlandı. *P.aeruginosa* solüsyonu içeren ancak kurkumin içermeyen beşinci kuyucuk pozitif kontrol; *P.aeruginosa* solüsyonu ve kurkumin içermeyen altıncı kuyucuk ise negatif kontrol olarak değerlendirildi. Aynı işlemler ilk mikroplağın ikinci sırasında bulunan altı kuyucuk için de uygulandı. Analitik hataları en aza indirebilmek adına, iki mikropalak kullanılarak yukarıdaki deney protokolü ikinci kez gerçekleştirildi.

Mikropalaklar, 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra TT'ler planktonik bakterileri uzaklaştırmak amacıyla üç kez steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı. İlk sırada bulunan kuyucukların içerisindeki tüp parçaları, ESEM kullanılarak biyofilmin kalitatif analizinin yapılması amacıyla incelendi. İkinci sıradaki örnekler ise kantitatif analiz için mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi.

Kalitatif Analiz

Tüplerin üzerindeki biyofilm tabakası ESEM kullanılarak dehidrate edilmeden incelendi. Yüksek vakum için FEG iyon pompaları kullanıldı. Görüntüler 100 Pa'lık bir basınçta vakum modunda kaydedildi. TT yüzeyi, biyofilm matrisi ve bakterilerin mikrokolonilerinin morfolojisi değerlendirildi.

Kantitatif Analiz

Deney gruplarındaki tüpler, 0.5 mL PBS içeren endorf tüplere konularak 2800 rpm'de vortekslenildi. Takiben, endorf tüpleri ultrasonik banyo içerisine konularak, 37°C'de 35 kHz'de sonikasyon yapıldı. Sonikasyon sonrası örnekler bir dakika daha vortekslenildi. Tu-

tunmuş bakterilerin tüp yüzeyinden ayrılmaları sağlandıktan sonra, ependorf tüpler içindeki solüsyonlar 10^5 kat dilüe edildi. Seri dilüsyonlarla elde edilen solüsyonlardan 100'er μL alınarak koyun kanlı agara inokülasyon yapıldı. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası koloniler sayıldı. Elde edilen rakamlar 10 ile çarpılarak CFU/mL değerleri kaydedildi. Elde edilen veriler, ortalama değer \pm standart deviasyon (SD) olarak sunuldu.

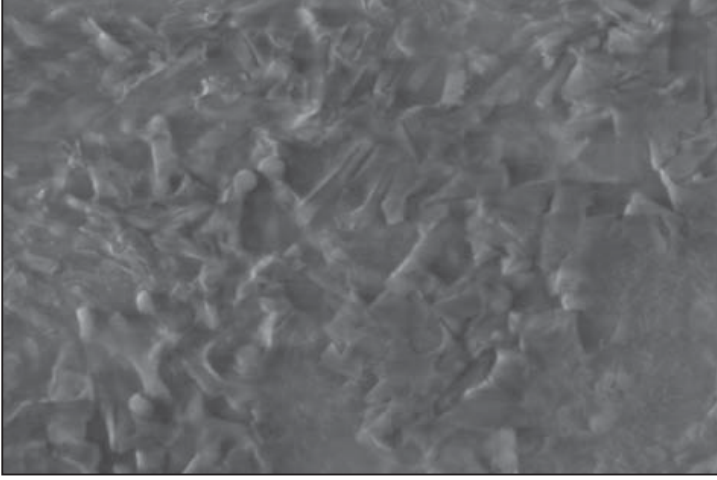
BULGULAR

Tüplerin ESEM kullanılarak dehidrate edilmeden ve kaplanmadan analizi sayesinde, tüp yüzeyindeki biyofilmin doğal halinin incelenmesi mümkün olmuştur. Yüzeyin düzgünlüğü, mikrokolonilerin varlığı ve biyofilm matriksi kalitatif olarak değerlendirilebilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki tüplerde kalın bir biyofilm matriksi ve çok sayıda yoğun *P.aeruginosa* kolonileri izlenmiştir. Belirgin ve kompleks biyofilm yapısı ve mikrokolonilerin oluşturduğu "kule"ler incelenen alanların tamamında izlenmiştir (Resim 1). Negatif kontrol grubuna ait örneklerde ise bakteri kümelenmesi veya biyofilm oluşumuna dair herhangi bir kanıt saptanmamıştır (Resim 2).

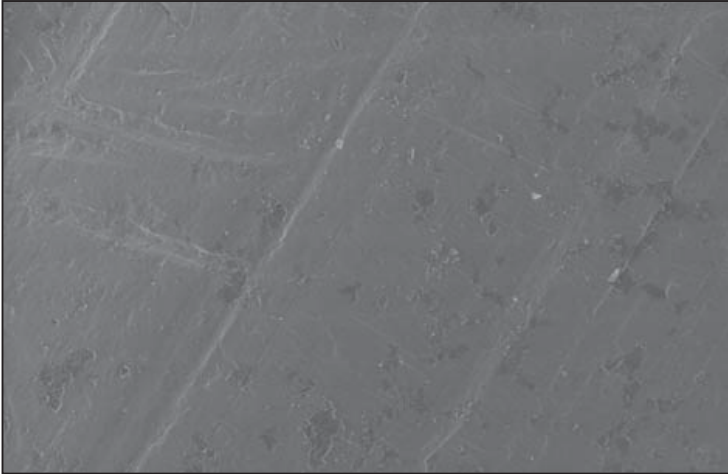
Kurkuminin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik grubunda yer alan örneklerin incelenmesinde, tüp yüzeyini örten bir bakteri kolonisi veya biyofilm matriksi gözlenmemiştir. İncelenen alanlarda tüp yüzeyinin oldukça düzgün olduğu görülmüştür (Resim 3). 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin grubunda yer alan tüplerin yüzeylerinin yoğun bir biyofilm tabakası ile kaplı olduğu ve bu tabakanın içerisinde ve yüzeyinde çok sayıda bakteriyel mikrokoloninin olduğu görülmüştür. İncelenen alanların %50-60'ında, üzerindeki biyofilm tabakası nedeniyle silikon tüp yüzeyi görülememiştir (Resim 4). 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin grubunda yer alan tüplerin, pozitif kontrol grubundaki örneklere benzer şekilde, yoğun bir matriks ve mikrokolonilerle örtülü olduğu saptanmıştır. İncelenen örneklerin yüzeylerinin tamamen biyofilm ile kaplanmış olduğu görülmüştür (Resim 5). 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin grubunda yer alan tüplerin incelenmesi ve pozitif kontrol grubundakine benzer bir şekilde mükemmel bir biyofilm tabakası oluştuğunun saptanması üzerine kalitatif analiz sonuçlandırılmış ve 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin grubu değerlendirmeye alınmamıştır. Deney gruplarındaki TT'lerin yüzeyinde tutunmuş olan bakterilerin kantitatif analizi sonucunda, kurkumin konsantrasyonu azaldıkça, CFU/mL sayısının arttığı izlenmiştir (Şekil 1). 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin ve 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kurkumin gruplarında tespit edilen CFU/mL sayısı sırasıyla 35 ± 7.07 ve 650 ± 494 olarak belirlenmiştir (Tablo I).

TARTIŞMA

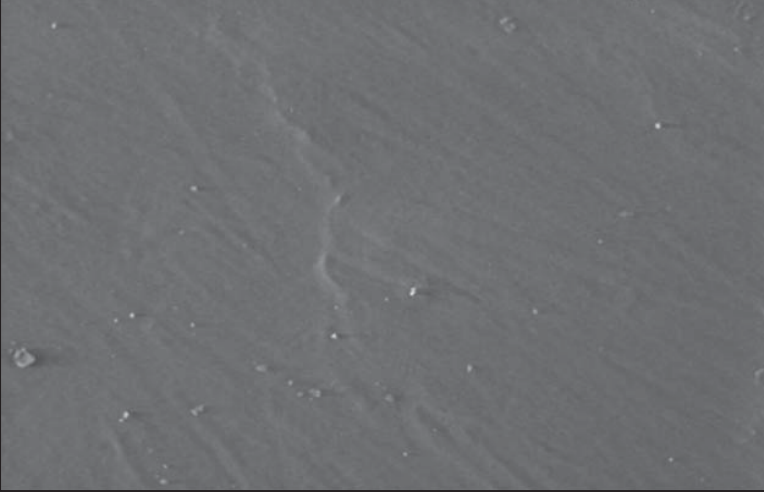
Bu çalışmada in vitro ortamda kurkuminin silikon TT'leri üzerinde biyofilm oluşumunu engelleyebilme yeteneğinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kurkuminin tüp yüzeyinde *P.aeruginosa* biyofilminin oluşumuna engel olabildiğini ortaya koymuştur. Bunun da ötesinde, biyofilm inhibisyonunu sağlamak için gereken kurkumin konsantrasyonunun, *P.aeruginosa* için daha önceden bildirilmiş¹⁴ olan MİK değeri olan 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'den daha düşük bir değer olan, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, kurkuminin MİK değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda kullanıldığında bile, çeşitli patojenler tarafından biyofilm oluşumunu engelleyebildiğini gösteren literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur^{17,18}.



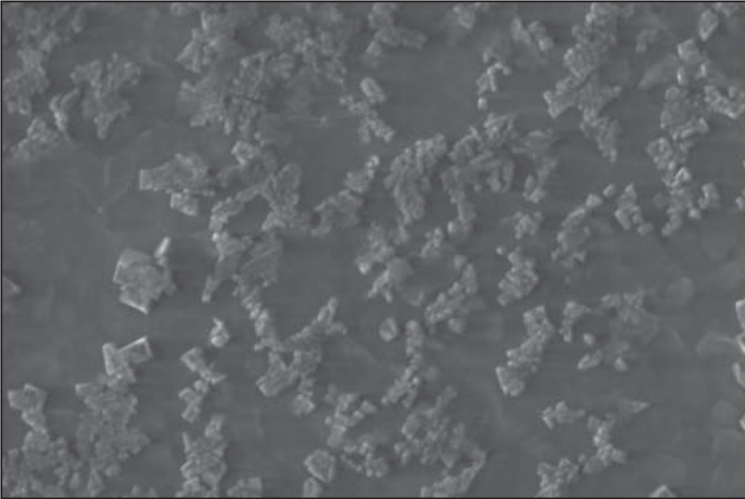
Resim 1. Pozitif kontrol grubunun ESEM görüntülerinde belirgin biyofilm matrisi ve mikrokoloni agregatları izlenmektedir.



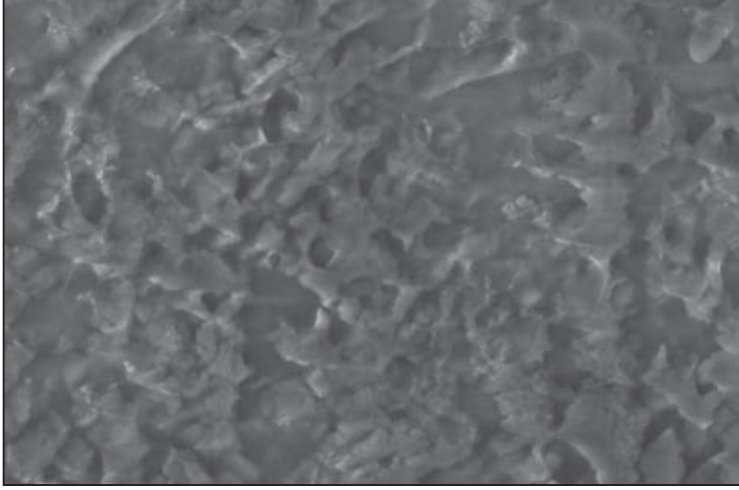
Resim 2. Negatif kontrol grubunun ESEM görüntülerinde pürüzsüz ve koloni içermeyen bir yüzey izlenmektedir.



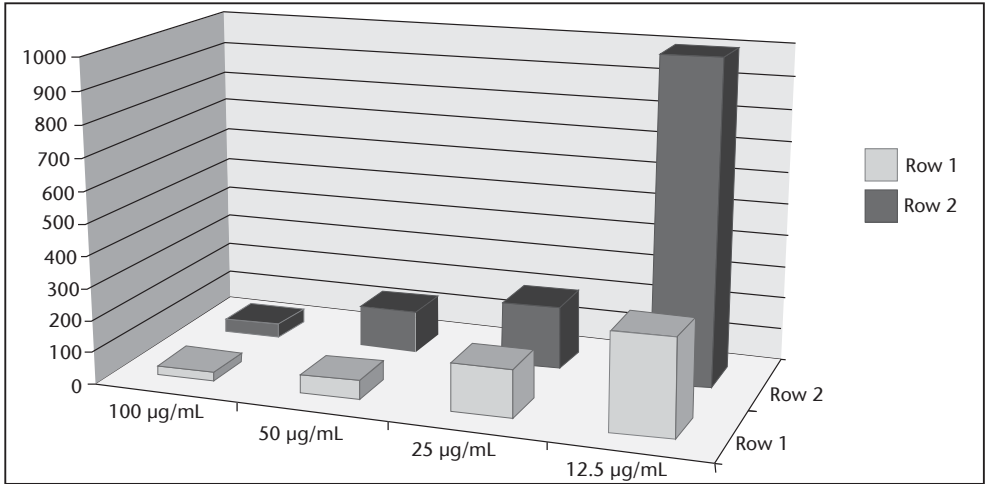
Resim 3. 100 µg/ml kurkumin grubunun yüzeyi. Birkaç bakteriyel agregat dışında, yüzeyde herhangi bir biyofilm oluşumu izlenmemektedir.



Resim 4. 50 µg/ml kurkumin grubunun yüzeyi. Bakteri kolonilerinin yoğun bir biyofilm matrisi içerisinde gömülü olduğu ve yüzeyde de mikrokolonilerin oluşturduğu kulelerin olduğu görülmektedir.



Resim 5. 25 µg/ml kurkumin grubunun yüzeyi. Çok sayıda mikrokoloni ve yoğun bir biyofilm matrisi izlenmektedir.



Şekil 1. Azalan kurkumin konsantrasyonlarında, TT'lerin yüzeyinde tutunmuş olan bakterilere ait CFU/ml değerleri.

Daha önce yapılan çalışmalarda, kurkumin etkisine karşı biyofilmlerin davranışlarını araştırmak için cam lameller kullanılmıştır¹⁷. Oysaki mikroorganizmaların bir yüzeye tutunma özelliklerinde, sadece yüzey düzensizliği değil, inkübasyon ortamı ve yüzey kimyası gibi birçok faktör etkili olmaktadır¹⁹. Literatürde bu güne kadar yapılmış olan ve kurku-

Tablo 1. Farklı gruplardaki tüplerin yüzeyindeki ortalama bakteri yükü (CFU)

Deney grupları	1. deney (CFU)	2. deney (CFU)	Ortalama ± SD
100 µg/mL	30	40	35 ± 7.07
50 µg/mL	60	130	95 ± 49.49
25 µg/mL	150	200	175 ± 35.35
12.5 µg/mL	300	1000	650 ± 494

CFU: Koloni oluşturan unite (Colony Forming Unit); SD: Standart deviasyon.

minin, medikal silikondan imal edilmiş timpanostomi tüplerinin yüzeyinde *P.aeruginosa* tarafından biyofilm oluşturulmasını engelleyebilme yeteneğini araştırarak herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, daha önce araştırılmamış olan bu konu üzerine odaklanılmış ve in vitro ortamda kurkuminin silikon TT'leri üzerinde *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu engelleyebildiği ortaya konulmuştur. Kurkuminin bu başarısının desteklenmesi için, ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

P.aeruginosa aerobik gram-negatif bir bakteridir ve kronik otitis media, otitis eksterna, pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonları gibi bir dizi hastalığın patogenezinin sorumlu tutulmaktadır²⁰. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, *P.aeruginosa* tarafından biyofilm oluşturulması ile antibiyoterapiye rağmen tedavi başarısızlığı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Hastalara yerleştirilen kateter veya protezlerde *P.aeruginosa* kolonizasyonu, özellikle yoğun bakım hastalarında, enfeksiyonların eradikasyonunun önündeki en büyük engellerden biri olmaya devam etmektedir^{21,22}. Otorinolarenjolojik açıdan bakıldığında, TT'ler üzerinde biyofilm oluşumu, tedavi sonuçlarını olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktördür. Otojik implantların ve TT'lerin üzerinde bakteri kolonizasyonu gelişmesi sonucu, çeşitli implant sekelleri ile karşılaşılabilir ve bu implantların çıkarılmasının kaçınılmaz hale gelebileceği bildirilmiştir²³. Bakteriyel biyofilmlerin ayrıca tüp lümenini tıkayarak, orta kulak kavitesinde bulunan mukoid sekresyonların drenajını engelleyebileceği ve bu nedenle tedavi başarısını azaltabileceği de ortaya konmuştur²⁴. Bunun da ötesinde, TTSO ile TT'lerin yüzeyinde biyofilm oluşumu arasında bir ilişkinin olduğu da gösterilmiştir¹¹.

Bugüne kadar TT'lerin yüzeylerinde *P.aeruginosa* biyofilminin oluşmasına engel olabilmek amacıyla çeşitli girişimler yapılmıştır. Polivinilpirolidon veya kitosan-piperasiltazobaktam ile kaplı tüp kullanmanın, bir dereceye kadar biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği bildirilmiştir^{11,25}. Ancak, tek başına yüzey modifikasyonu yapılmasının biyofilm oluşumuna engel olamayacağı da öne sürülmüştür. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, iyon bombardımanına maruz bırakılmış silikon TT'lerin, *P.aeruginosa* biyofilminin oluşumunu engelleyemediği gösterilmiştir²⁶.

Literatürde, biyomedikal araçların yüzeyinde biyofilm varlığı ve miktarını belirleyebilmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Biyofilmin kalitatif analizini yapabilmek veya mimarisini inceleyebilmek için SEM'in etkin bir araç olduğu bildirilmiştir¹⁰. Bununla beraber, örneğin dehidrate edilmesi ve buna bağlı olarak biyofilm yapılarının büzülmesi nedeniyle, konvansiyonel SEM analizi ile biyofilmin ekzopolisakkarit matriksinin doğru

bir şekilde değerlendirilmesi her zaman mümkün olamamaktadır. Holling ve arkadaşlarının²⁷ çalışmasında, ESEM'in, hidrate örneklerin incelenebilmesi nedeniyle, biyofilm yapısının ve mikrokoloni agregatlarının gösterilmesinde daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada *P.aeruginosa* biyofilminin analizi için ESEM kullanılmıştır. Hidrate hallerinde incelenebilen tüp yüzeylerindeki biyofilm yapısı detaylı bir şekilde görüntülenebilmiş ve yüksek çözünürlüklü resimler elde edilebilmiştir.

Literatürde, bir yüzeyde bulunan biyofilm yükünü tespit edebilmek, başka bir deyişle biyofilmin kantitatif analizini yapabilmek için, bir dizi yöntem tanımlanmıştır. Bunlardan, yüzeyin kazınması, biyomateryal ve protezlerin ultrasonikasyonu veya vortekslenmesi gibi yöntemlerin, biyofilmin kantitatif analizini gerçekleştirmede başarılı olduğu bildirilmiştir. Bu tekniklerin bir kombinasyonu olan vorteksleme ve sonikasyon işleminin, biyomedikal materyallerin yüzeyine tutunmuş olan bakterileri uzaklaştırmada diğer tekniklere göre daha üstün olduğu kabul edilmiştir²⁸. Bizim çalışmamızda da, bildirilmiş yüksek etkinliği göz önüne alınarak, minör bir modifikasyon yapılmış ve örnekler vorteks-sonikasyon-vorteks yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle elde edilen süspansiyonların kültürleri yapılmış ve raporlanan sonuçların ESEM analizi ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Kantitatif analiz sonuçları, ortamdaki kurkumin konsantrasyonu azaldıkça, yüzeye tutunmuş olan bakteri yoğunluğunun arttığını göstermiştir. Yapılan kantitatif ve kantitatif analizlerin sonucunda, kurkuminin MİK değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda bile *P.aeruginosa*'nın silikon TT yüzeyine tutunmasını engelleyebildiği belirlenmiştir. Kantitatif incelemelerde, biyofilm inhibisyonunun 100 µg/mL kurkumin ile engellenebilmesine rağmen, daha düşük dozlarda bu etkinin gerçekleşmediği saptanmıştır. Kantitatif incelemelerde izlenen kurkumin konsantrasyonunda azalma ile orantılı bir şekilde artan CFU/mL sayıları da, kantitatif incelemelerde saptanan bulguları destekler niteliktedir.

Kurkuminin, enfeksiyonların önlenmesinde veya tedavisinde kullanılacak ucuz ve güvenli bir seçenek olduğu öne sürülmüştür. Kurkuminin deneysel olarak oluşturulmuş akut otitis media tablosundaki etkilerini belirlemek amacıyla sıçanlarda yapılan bir çalışmada, kurkuminin orta kulak mukozası ve timpanik membran epitelinde anlamlı bir hasara yol açmadığı bildirilmiştir²⁹. Yakın zamanda kobaylar üzerinde yapılmış bir çalışmada da, kurkuminin iç kulak yapıları için toksisite potansiyeli taşımadığı saptanmıştır³⁰.

Kurkuminin *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ve *Staphylococcus aureus* gibi birçok bakteriye karşı bakterisidal etkisinin yanı sıra, *P.aeruginosa*'ya karşı benzersiz özellikleri vardır. *P.aeruginosa*'nın virülans faktörleri, biyofilm başlatma genleri ve "quorum-sensing" adı verilen hücreler arası haberleşme mekanizmalarının kurkumin tarafından bloke edilebildiği ve *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kurkuminin etkili bir molekül olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur^{14,16}. Kurkuminin TTSO'yu önleyebilmek için topikal bir solüsyon içerisinde kullanılmasının, *P.aeruginosa* enfeksiyonu ile ilişkili lokal veya sistemik komplikasyonların insidansını azaltabileceğini ve biyofilm oluşumuna bağlı tüp lümeninin obstrüksiyonunu engelleyebileceğini düşünmekteyiz. Bu sayede hem tedavi başarısızlıkları azalacak hem de hastalık ile ilişkili ekonomik yük hafifletilebilecektir.

Sonuç olarak çalışmamızın verileri, in vitro ortamda lokal olarak uygulanan kurkumin solüsyonu, silikon TT'lerin yüzeyinde *P.aeruginosa* biyofilminin oluşumunu, MİK değer-

lerinin altındaki konsantrasyonlarda bile engelleyebilmektedir. 100 µg/mL'lik kurkumin konsantrasyonunun biyofilm oluşumunu etkin bir şekilde engelleyebildiği belirlenmiştir. Ucuz, antibiyotik direnç geliştirme riski olmayan ve kulak üzerine toksik olmadığı gösterilmiş olan kurkuminin, TT yerleştirilmesi sonrası *P.aeruginosa* ile ilişkili süpüratif otitis media gelişimini önleyebileceğini, tüp lümeninin açık kalmasını sağlayabileceğini ve tedavi başarısızlık oranlarını azaltabileceğini düşünüyoruz. Bu ön çalışmanın sonuçları, kurkumin molekülünün timpanostomi tüpleri yüzeyindeki anti-biyofilm etkinliğinin, ileri in vivo çalışmalarda test edilmesinin uygun olacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Van Cauwenberge P, Watelet JB, Dhooge I. Uncommon and unusual complications of otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 5(49 Suppl 1): S119-25.
2. Coates H. Post-tympanostomy tube otorrhea in children: a clinical overview. *Ear Nose Throat J* 2002; 81(8 Suppl 1): 3-5.
3. Fishman I, Sykes KJ, Horvat R, Selvarangan R, Newland J, Wei JL. Demographics and microbiology of otorrhea through patent tubes failing ototopical and/or oral antibiotic therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 145(6): 1025-9.
4. Dohar J. Microbiology of otorrhea in children with tympanostomy tubes: implications for therapy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67(12): 1317-23.
5. Hochman J, Blakley B, Abdoh A, Aleid H. Post-tympanostomy tube otorrhea: a meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 135(1): 8-11.
6. Oberman JP, Derkay CS. Posttympanostomy tube otorrhea. *Am J Otolaryngol* 2004; 25(2): 110-7.
7. Conley J, Olson ME, Cook LS, Ceri H, Phan V, Davies HD. Biofilm formation by group a streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4043-8.
8. Ciftci Z, Develioglu O, Arbak S, Ozdoganoglu T, Gultekin E. A new horizon in the treatment of biofilm-associated tonsillitis. *Ther Adv Respir Dis* 2014; 8(3): 78-83.
9. Jang CH, Park H, Cho YB, Choi CH, Park IY. The use of piperacillin-tazobactam coated tympanostomy tubes against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas* biofilm formation: an in vitro study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73(2): 295-9.
10. Jang CH, Cho YB, Choi CH. Structural features of tympanostomy tube biofilm formation in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas* otorrhea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(4): 591-5.
11. Gan CW, Chooi WH, Ng HC, Wong YS, Venkatraman SS, Lim LH. Development of a novel biodegradable drug-eluting ventilation tube for chronic otitis media with effusion. *Laryngoscope* 2013; 123(7): 1770-7.
12. Ojano-Dirain CP, Silva RC, Antonelli PJ. Biofilm formation on coated silicone tympanostomy tubes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77(2): 223-7.
13. Wang JC, Hamood AN, Saadeh C, Cunningham MJ, Yim MT, Cordero J. Strategies to prevent biofilm-based tympanostomy tube infections. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2014; 78(9): 1433-8.
14. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Eren Topkaya A. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health* 2013 [Epub ahead of print] doi: 10.1177/0748233713498458.
15. Karaman M, Fıncı F, Arkan Ayyıldız Z, Bahar IH. Effects of imipenem, tobramycin and curcumin on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 192-4.
16. 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.

17. Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 2014; 148: 453-60.
18. Song JJ, Noh I, Chae SW. Inhibition of biofilm formation on ventilation tubes by surface modification. *In Vivo* 2012; 26(6): 907-11.
19. Almaguer-Flores A, Ximénez-Fyvie LA, Rodil SE. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92(1): 196-204.
20. Bergogne-Berezin E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram-negative bacilli, pp. 2203-26 In: Cohen J, Powderly WG (eds), *Infectious Diseases*. 2004, 2nd ed. Mosby, Philadelphia.
21. Djeribi R, Bouchloukh W, Jouenne T, Mena B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am J Infect Control* 2012; 40(9): 854-9.
22. Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C, et al. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(6): 1318-23.
23. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Könönen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol* 2005; 26(3): 380-4.
24. Mehta AJ, Lee JC, Stevens GR, Antonelli PJ. Opening plugged tympanostomy tubes: effect of biofilm formation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134(1): 121-5.
25. Antonelli PJ, Sampson EM, Ojano-Dirain C. Biofilm formation on silicone tympanostomy tubes with polyvinylpyrrolidone coating. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 137(1): 19-23.
26. Humphreys H. Self-disinfecting and microbicide-impregnated surfaces and fabrics: what potential in interrupting the spread of healthcare-associated infection? *Clin Infect Dis* 2014; 58(6): 848-53.
27. Jang CH, Cho YB, Choi CH. Effect of ion-bombarded silicone tympanostomy tube on ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76(10): 1471-3.
28. Holling N, Dedi C, Jones CE, et al. Evaluation of environmental scanning electron microscopy for analysis of *Proteus mirabilis* crystalline biofilms in situ on urinary catheters. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 355(1): 20-7.
29. Birdane L, Muluk NB, Cingi C, Burukoglu D, Fidan V, Incesulu A. Evaluation of the efficacy of curcumin in experimentally induced acute otitis media in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2014; 123(5): 325-32.
30. Salehi P, Akinpelu OV, Waissbluth S, et al. Attenuation of cisplatin ototoxicity by otoprotective effects of nanoencapsulated curcumin and dexamethasone in a guinea pig model. *Otol Neurotol* 2014; 35(7): 1131-9.