

Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinden Elde Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Çeşitli Virülans Faktörlerine Kurkuminin Etkisi

Reyhan MUTLU, Aynur EREN TOPKAYA

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

ÖZ

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa* sahip olduğu virülans faktörleri ve antibiyotiklere direnç mekanizmaları ile kistik fibrozlu hastalarda tedavisi zor olan solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Kurkuminin anti-inflamatuvar, anti-tümör gibi etkilerinin yanı sıra antibakteriyel etkiye de sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı, kistik fibrozlu hastaların solunum yolu örneklerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının çeşitli virülans faktörlerine (biyofilm, elastaz, alkali proteaz) kurkuminin etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, *P. aeruginosa* izolatlarının (n=65) kurkumin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemiyle çalışıldı. Virülans faktörlerinden biyofilm, elastaz ve alkali proteaz mikropakta absorpsiyon ölçümüne dayalı yarı kantitatif yöntemlerle araştırıldı. Virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar aynı anda hem sub-MİK konsantrasyondaki kurkumine maruz bırakılarak hem de bırakılmadan virülans faktörü üretimini araştırmak için yeniden çalışıldı ve ölçülen absorpsiyon değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda, izolatların 11'inin (%16) kurkumin MİK değeri 250-500 µg/ml arasında, 7'sinin (%11) kurkumin MİK değeri 501-1000 µg/ml arasında, 5'inin (%8) kurkumin MİK değeri 1001-1500 µg/ml arasında ve 42'sinin (%65) kurkumin MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde saptandı. İzolatların %54'ünde biyofilm üretimi, %74'ünde elastaz üretimi ve %68'inde alkali proteaz üretimi pozitif bulundu. Çalışılan bu üç virülans faktörünün üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorpsiyon değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorpsiyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre, in-vitro ortamda bir kez kurkumine maruz bırakılan kistik fibroz izolatlarının virülans faktörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmamıştır. Bununla birlikte, kurkuminin toksik olmayan, anti-inflamatuvar ve anti bakteriyel bir madde olması nedeniyle bu hasta gruplarında uzun süreli kullanımının in-vivo etkilerinin de araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, kistik fibröz, kurkumin

ABSTRACT

The Effect of Curcumin on Several Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained From Respiratory Tract Samples of Cystic Fibrosis Patients

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* causes respiratory tract infections that are difficult to treat in patients with cystic fibrosis because of the antibiotic resistance mechanisms and virulence factors. Curcumin has been found to possess antibacterial as well as antitumoral and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to investigate the effect of curcumin on several virulence factors (biofilm, elastase, alkaline protease) of *P. aeruginosa* isolates which were obtained from respiratory tract samples of cystic fibrosis patients.

Material and Methods: In our study, minimal inhibitory concentration (MIC) values of curcumin for *P. aeruginosa* isolates (n=65) were determined by agar dilution method. Production of three different virulence factors (elastase, alkaline protease, and biofilm) were investigated by semi-quantitative methods which relied on the measurement of absorbance in microtiter plates. The isolates which had a positive virulence factor production were retested for the production of virulence factors at the presence and absence of sub-MIC curcumin concentrations simultaneously and measured absorbance values were compared statistically.

Results: In our study, curcumin MICs of the 11 (16%) isolates were 250-500 µg/ml 501-1000 µg/ml for 7 (11%), 1001-1500 µg/ml for 5 (8%), and above 1500 µg/ml for 42 (65%) isolates. Out of 65 isolates in 54% biofilm, in 74% elastase, and in 68% alkaline protease production were positive. In terms of virulence factor production, results didn't indicate a statistically significant difference between the absorbance values obtained with and without exposure to sub-MIC concentrations of curcumin.

Conclusion: In conclusion, there was no statistically significant decrease in the virulence factors of cystic fibrosis isolates which were once exposed to in vitro curcumin. However, because curcumin is a non-toxic, anti-inflammatory and anti-bacterial agent, it will be suitable to investigate the in vivo effects of long-term curcumin use in these patient groups.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, curcumin

Alındığı tarih: 31.01.2017

Kabul tarihi: 02.05.2017

Yazışma adresi: Aynur Eren Topkaya, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

e-posta: aynurtopkaya@yahoo.com

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa en önemli *Pseudomonas* türü olup, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda mortalite ve morbidite ile sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* enfeksiyonları; bakterinin bağlanması ve kolonize olması, lokal invazyon, yayılım ve sistemik hastalık olarak birbirini takip eden üç basamağa ayrılabilir⁽¹⁻³⁾.

Mukozalara *Pseudomonas* kolonizasyonu, pili veya fimbria aracılığıyla bakterinin epitel hücrelerine bağlanmasıyla olur⁽³⁾. Sağlıklı bireylerde farengal kolonizasyonu sıklığı %0.6-6 olup, nazal mukozada %0.3-3, deride %0-2, dışkıdan %2.6-24 oranlarında saptanabilmektedir. Hastanede yatan risk altındaki bireylerde ise *P. aeruginosa* kolonizasyon oranı %50'lere ulaşabilmektedir⁽⁴⁾. Elastaz, alkali proteaz, ekzotoksin A, fosfolipaz C gibi tip 2 sekresyon sistemini kullanarak hücre dışına salınan virülans faktörleri de, solunum yolu epitelinin koruyucu glikokaliks yapısını bozarak epitelyal ligandları açığa çıkarır ve bakterinin invazyonunda görev alırlar^(1,5).

Otozomal resesif geçişli kistik fibroz (KF) hastalığında, ya epitel hücresi membranında klorür iletiminden sorumlu kanalın düzenleyici proteini olan Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) proteini üretilmez ya da işlevsel olmayan bir protein üretilir. CFTR üretiminde kayıp veya fonksiyonlarında bozulma sonucu akciğerlerde mukosilyer klirens bozulur ve mukus birikimine neden olur. Bu da KF'li hastalarda inflamasyona ve ciddi pnömoniye neden olabilen *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonuna yol açar. KF hastalarının %80'inden fazlası yetişkin döneme kadar *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonu geçirirler⁽⁶⁾.

Pseudomonas aeruginosa'nın tanımlanmış birçok virülans faktörü vardır. En önemlilerinden

birisi elastazdır. Bu enzim solunum yolu mukozasında epiteller arasındaki sıkı bağlantıları parçalayarak geçirgenlik artışına ve enfeksiyon bölgesinde nötrofillerin çoğalmasına yol açar⁽⁵⁾. Elastaz ayrıca, fibronektini yıkar ve mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak silyer aktiviteyi engeller. Damar duvarındaki kollajenin yıkılması ve damar bütünlüğünün bozulması ile hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına ve böylece akciğerde alveol yapısının bozulmasına yol açar⁽⁷⁾. *P. aeruginosa*'nın diğer bir virülans faktörü olan alkali proteazın fibrin eritici etkisi vardır. 49 kDa ağırlığında apr geni tarafından kodlanan bir metalloproteazdır. Akut akciğer hasarında erken dönemde etkili olduğu gösterilmiştir⁽⁸⁾. Biyofilmler, KF zemininde gelişen akciğer enfeksiyonları, dış çürükleri, endokardit, kontak lenslerle ilgili göz enfeksiyonları, iç kulak enfeksiyonları ve böbrek taşları gibi birçok enfeksiyon gelişiminde önem taşır⁽⁹⁾. KF'da *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik solunum yolu enfeksiyonları biyofilm oluşumu ile karakterize enfeksiyonlara en iyi örneklerden biridir. Bu olguların yaşları ilerledikçe solunum yolları biyofilm oluşumu ile karakterize mukoid koloni fenotipinde *P. aeruginosa* ile kolonize ve enfekte olmakta ve bu aşamadan sonra eradikasyon hemen hemen olanaksız hâle gelmektedir⁽¹⁰⁾. *P. aeruginosa*'nın erken eradikasyonu için inhale tobramisin ve kolistin kullanımının uzun süreli başarısı değerlendirilmekte olup, eradikasyon tedavisinde kullanılabilecek yeni antibiyotikler araştırılmaktadır. Kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının inhale antibiyotiklerle tedavisi ise halen aktif bir araştırma konusudur. Akut pulmoner alevlenmeler morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir ve intravenöz kombine antibiyotik tedavisi önerilmektedir. Kistik fibrozlu hastalarda enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa* izolatlarında çoklu ilaç direncinin yaygın olması nedeniyle yeni antibiyotiklere ve başka tedavi stratejilerine acil olarak gereksi-

nim duyulmaktadır⁽¹¹⁾.

Kurkumin, turmerik (zerdeçal) olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilmektedir⁽¹²⁾. *C. longa*, Çin ve Hindistan'da yaygın olarak üretilen büyük yapraklı, sarıçiçekli bitki olup, *Zingiberaceae* ailesinde yer almaktadır⁽¹³⁾. Antik çağlardan bu yana turmerik bir baharat olarak Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde popüler olmuştur⁽¹²⁾. Baharat, gıda katkı maddesi ve renklendirici madde olarak kullanılmasının yanında turmerik, geleneksel olarak artrit, ülser, sarılık, yara, ateş, travma ve psöriazis gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır⁽¹⁴⁾.

Kurkuminin antioksidan, anti-inflamatuvar, antiviral, antifungal, antibakteriyel etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, kurkuminin sub-MİK düzeylerinde, KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden etken olarak izole edilen *P. aeruginosa* izolatları tarafından üretilen elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz gibi çeşitli virülans faktörlerine etkisinin belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kistik Fibrozis Polikliniği'ne başvuran KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatları (n=65) kullanıldı. Tanımlama, MacConkey agarda üreyen gram negatif, basil morfolojisindeki laktoz negatif görünümlü nonfermentatif kolonilere oksidaz testi uygulanması yanısıra, tipik koloni morfolojisi ve pigment üretimine göre konvansiyonel yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bu şekilde tanımlanamayan izolatlar 2013 Eylül tarihine kadar Phoenix otomatize bakteri tanımlama sistemiyle (Becton Dickinson, ABD), 2013 Eylül sonrası da VITEK-MS (bioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışma Namık Kemal Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alı-

arak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak izolatların kurkumin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra izolatların virülans faktörleri üretimi (elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz) araştırılmıştır. Virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar sub-MİK düzeyde kurkumine maruz bırakılarak ve maruz bırakılmadan yeniden virülans faktörü üretimi çalışıldı ve her iki absorbans değeri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri kullanıldı.

Agar Dilüsyon Yöntemi ile İzolatların Kurkumin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Stok çözeltilerin hazırlanması: Çözelti hazırlanırken, tartılacak kurkumin (Sigma) miktarı veya sulandırma hacmi, antimikrobiyal maddenin potansi dikkate alınarak hesaplandı⁽¹⁵⁾. Kurkumin stok çözeltileri hazırlanırken çözücü olarak dimetilsülfoksit (DMSO), sulandırıcı olarak fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) kullanılmıştır⁽¹⁶⁾. Firma tarafından bildirilen %76 saflıktaki kurkuminin 269.4 mg'ı önce beş ml DMSO içerisinde çözüldükten sonra PBS ile sulandırılarak 5120 µg/ml konsantrasyonda 40 ml'lik kurkumin stok ana çözeltisi elde edildi. 5120 µg/ml konsantrasyondaki bu ana kurkumin çözeltisinden PBS ile çift katlı seri sulandırmalar yapılarak 2560 µg/ml, 1280 µg/ml, 640 µg/ml, 320 µg/ml, 160 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml kurkumin içeren ara konsantrasyonlar hazırlandı.

Agar dilüsyon plaklarının hazırlanması: Kurkuminin ara konsantrasyonlarından bir kısım, sıcaklığı su banyosunda 45-50°C'ye getirilen dokuz kısım Mueller-Hinton (MH) agar besiyerine eklendi. Böylece final kurkumin konsantrasyonları 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml,

1 µg/ml olan agar dilüsyon plakları elde edildi.

İnokulumun hazırlanması, inokülasyon ve değerlendirme: Hasta izolatlarının %5 koyun kanlı ağara pasajları yapılarak $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası besiyeri üzerindeki tek düşmüş kolonilerden alınarak serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklığında 2×10^8 koloni oluşturan birim/ml (KOB/ml) bakteri süspansiyonu elde edildi. Bu bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak kurkumin içeren MH agar plaklara inoküle edildi. Plaklar $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 16-18 saat inkübe edildi ve koyu renkli ışığı yansıtmayan bir yüzey üzerinde değerlendirildi. Üremeyi inhibe eden en düşük kurkumin konsantrasyonu MİK olarak belirlendi⁽¹⁶⁾. Bazı izolatların kurkumin MİK değerlerinin 256 µg/ml'nin üzerinde çıkması üzerine bu izolatların kurkumin MİK değerleri hazırlanan 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml ve 1500 µg/ml kurkumin konsantrasyonlarıyla aynı yöntem kullanılarak yeniden çalışıldı.

Virülans faktör üretiminin saptanması

Kökenlerin stok kültürlerinden Kanlı agar besiyerine pasajlanarak bir gece inkübasyondan sonra elde edilen saf kültürlerden, bulanıklık 0.5 Mc Farland olacak şekilde üç ml LB sıvı besiyeri içeren tüplere alınarak bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu karışımdan 0.1 ml alınarak 9.9 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aktararak, 10^6 KOB/ml bakteri içeren 10 ml'lik süspansiyon elde edildi. Hazırlanan bu süspansiyondan 2.5 ml alınıp 2.5 ml sıvı besiyerine eklenip 5×10^5 KOB/ml bakteri içeren beş ml karışım elde edilerek 35°C 'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aşağıda tanımlandığı gibi virülans faktörlerinin (elastaz, biyofilm üretimi, alkali proteaz) üretimi çalışıldı.

Biyofilm üretiminin saptanması: Biyofilm üretiminin saptanması amacıyla, *P. aeruginosa*

linik izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1: 100 oranında sulandırılmaları yapıldı ve bu sulandırılardan her bir köken için 100'er µl mikrodilüsyon plaklarındaki üç kuyucuğa dağıtıldı. 35°C 'de 8 saat inkübasyon sonrasında plaklar üçer kez distile su ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa %0.1'lik kristal viyole çözeltisinden onar µl eklenerek plaklar oda ısısında 15 dakika beklendi. Bu işlemten sonra plaklar yine üçer kez distile su ile yıkanarak serbest boya çözeltisi uzaklaştırıldı. Oluşan biyofilmin kantitasyonu amacıyla kuyucuklara 200 µl %95'lik etanol eklenerek biyofilm ile bileşik oluşturan kristal viyolenin çözülmesi gerçekleştirildi. Beş dakika beklendikten sonra absorbans değerleri 550 nm'de ELISA plak okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Sci) ile ölçüldü⁽¹⁷⁾. Eşik değerin (cut-off) belirlenmesi Karatuna ve ark.⁽¹⁸⁾ tarif ettiği gibi, biyofilm üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri için elde edilen absorbans değerlerinin ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0.173 olarak belirlendi, 550 nm'de absorbans değeri >0.173 saptanan kökenler biyofilm üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda biyofilm üretimine etkisinin araştırılması:

Biyofilm üretimi pozitif bulunan 16 izolat aynı zamanda hem sub-MİK dozlarda kurkumine maruz bırakılarak hem de kurkumine maruz bırakılmadan biyofilm üretimi ölçülerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bunun için 67.1 mg kurkumin iki ml DMSO içinde çözüldükten sonra karışım PBS ile 10 ml'ye tamamlanarak 5000 µg/ml'lik kurkumin solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon PBS ile sulandırılarak 2500 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml'lik kurkumin solüsyonları elde edildi. 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml kurkumin solüsyonlarından 0.5 ml alınıp iki

ml LB sıvı besiyeri ile karıştırılarak 2.5 ml 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml kurkumin içeren solüsyonlar hazırlandı. Yukarıda virülans faktörü üretiminin saptanması bölümünde anlatıldığı gibi izolatlar sıvı besiyeri içerisinde sulandırılarak 10⁶ KOB/ml bakteri içeren 10 ml süspansiyon elde edildi. 10⁶ KOB/ml bakteri içeren bu süspansiyondan 2.5 ml alınıp kurkumin MİK değeri 256 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 200 µg/ml, 500 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 300 µg/ml, 1200 µg/ml bulunan izolatlar için 2.5 ml 500 µg/ml, 1500 µg/ml üzerinde bulunan izolatlar için 2.5 ml 1000 µg/ml kurkumin içeren solüsyonlarla karıştırıldı. Böylece kurkumin MİK değeri 256 µg/ml bulunan izolatlar 100 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 500 µg/ml olarak bulunan izolatlar 150 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 1200 µg bulunan izolatlar 250 µg/ml kurkumine, kurkumin MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde bulunan izolatlar 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlardan eşzamanlı olarak kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örnekler aynı anda biyofilm üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Elastaz üretiminin saptanması: İzolatların elastaz üretimi Iglewski'nin⁽¹⁹⁾ yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Klinik *P. aeruginosa* izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonları soğutmalı santrifüjde çevrilerek elde edilen süpernatantlardan 0.5 ml alınarak 1 ml deney karışımı (30 mM Tris ve 10 mg elastin kongo kırmızısı; pH: 7.2) içeren tüplere eklendi ve 37°C'de 6 saat inkübe edildi. Takiben tüpler 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve her bir izolat için ikişer kuyucuğa 200 µl süpernatant koyularak absorbans değerleri 490 nm'de ELİSA plak okuyucu (ELx800,

BioTek Ins) ile ölçüldü. Her izolat için 2 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha yinelenildi. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla Karatuna ve ark.⁽¹⁸⁾ yöntemiyle elastaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değeri 0.145 olarak belirlendi, 490 nm'de absorbans değeri >0.145 saptanan kökenler elastaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda elastaz üretimine etkisinin araştırılması:

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda elastaz üretimine etkisinin araştırılması amacıyla elastaz üretimi pozitif bulunan 21 izolat 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlar aynı zamanda kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcılı etüvde 24 saat inkübe edildi. Enkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örnekler aynı anda yukarıda anlatıldığı gibi elastaz üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Alkali proteaz üretiminin saptanması:

İzolatların alkali proteaz üretimi Howe ve Iglewski'nin⁽²⁰⁾ yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Klinik *P. aeruginosa* izolatları (n=65) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1:100 oranında sulandırmaları yapıldı ve bu sulandırmalardan 0.5 ml alınarak yine beş ml LB besiyerine ekildi ve çalkalayıcılı etüvde 30°C'de 24 saat inkübe edildi. 3000 g'de 20 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 500 µl, 1.5 ml deney karışımı [20 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ tampon çözeltisinden (pH=8) 1.5 ml ve 50 mg Hide Remazol Brilliant Blue] içeren tüplere eklenip 35°C'de bir saat çalkalayıcılı etüvde inkübe edildi. Bu işlem son-

rası tüpler 4000 g'de beş dakika santrifüj edildi ve her bir izolat için ikişer kuyucuğa 200 µl süpernatant koyularak absorbans değerleri 630 nm'de ELISA plak okuyucu (ELx800, BioTek Ins) ile ölçüldü. Her izolat için iki kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu işlem iki ayrı çalışmada daha yinelenildi. Eşik değer (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla, Karatuna ve ark.⁽¹⁸⁾ tarif ettiği gibi alkali proteaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0.104 olarak belirlendi, 630 nm'de absorbans değeri >0.104 saptanan kökenler alkali proteaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda alkali proteaz üretimine etkisinin araştırılması: Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonda alkali proteaz üretimine etkisinin araştırılması amacıyla alkali proteaz üretimi pozitif bulunan 16 izolat aynı zamanda hem sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak hem de kurkumine maruz bırakılmadan alkali proteaz üretimi ölçülerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. 5000 µg/ml'lik kurkumin stok solüsyonundan 0.5 ml alınıp iki ml LB sıvı besiyeri ile karıştırılarak 2.5 ml 1000 µg kurkumin solüsyonu elde edildi. Sıvı besiyeri içerisinde 10⁶ KOB/ml bakteri solüsyonundan 2.5 ml alınıp, kurkumin MİK'i 1500 µg/ml'nin üstünde bulunan izolatlar için 2.5 ml 1000 µg/ml kurkumin içeren solüsyonla karıştırıldı. Böylece izolatlar 500 µg/ml kurkumine maruz bırakıldı. Bu izolatlar aynı zamanda kurkumine maruz bırakılmadan da hazırlanarak 35°C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat inkübe edildi. Enkübasyon sonrası sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan ve kurkuminsiz örneklerle aynı anda elastaz üretimi çalışılarak absorbans değerleri ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 18.0 ile iki yönlü olarak %95 güven aralığında yapıldı. Tanımlayıcı istatistiklere ek olarak (ortalama, standart sapma, yüzdelik değer vb.), karşılaştırmalı analizlerde bağımlı gruplarda non parametrik bir test olan Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. İzolatlar kurkumin MİK değerlerine göre dört gruba ayrıldı. Her gruba ait biyofilm absorbans değerleri Kruskal-Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldı. Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

BULGULAR

Kistik fibrozlu hastalardan elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının (n=65) agar dilüsyon yöntemiyle belirlenen kurkumin MİK değerlerinin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İzolatların kurkumin MİK aralığına göre dağılımı.

MİK (µg/ml)	250-500	501-1000	1001-1500	1500 üzeri
İzolat sayısı [n, (%)]	11 (16)	7 (11)	5 (8)	42 (65)

Virülans faktörleri için negatif kontrol kökenleri (*P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3) ile gerçekleştirilen testler sonucunda eşik değerler (cut-off) saptandı ve bu değerler kullanılarak klinik *P. aeruginosa* izolatlarının (n=65) virülans faktör üretimleri belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. İzolatların virülans faktörü üretiminin değerlendirilmesi.

Virülans Faktörü	Eşik değerler	Negatif izolat sayısı n, %	Pozitif izolat sayısı n, %
Biyofilm	0.173	30 (46)	35 (54)
Elastaz	0.145	17 (26)	48 (74)
Alkali Proteaz	0.104	21 (32)	44 (68)

İzolatların %54'ünde biyofilm üretimi, %74'ünde elastaz üretimi ve %68'inde alkali proteaz üretimi

pozitif bulundu. Kurkuminin sub-MİK konsantrasyonlarda virülans faktörü üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla virülans faktörü üretimi pozitif olan izolatlar arasından seçilen izolatlara aynı anda kurkuminli ve kurkuminsiz olarak virülans faktörü üretimi çalışıldı. Ölçülen absorbans değerlerinin ortalamaları ve p değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kurkuminsiz (kurkumin negatif) ve sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak (kurkumin pozitif) virülans faktörü üretimi çalışılan izolatların ortalama absorbans değerleri ve p değerleri.

Virülans Faktörü	Kurkumin (-) ortalama	Kurkumin (+) ortalama	p değeri
Biyofilm	0.250	0.279	0.363
Elastaz	0.201	0.303	0.131
Alkali Proteaz	0.302	0.368	0.552

Biyofilm üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.363$).

Elastaz üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.131$).

Alkali proteaz üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.552$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada KF'li hastaların solunum yollarından elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının kurkumin MİK'leri, çeşitli virülans faktörleri (biyofilm, elastaz, alkali proteaz) ve kurkuminin sub-MİK konsantrasyonlarda virülans faktörlerine etkisi araştırıldı.

Çalışmamızda, agar dilüsyon yöntemiyle 65 *P. aeruginosa* izolatının kurkumin MİK değerleri araştırıldı. İzolatların 11'inin (%16) MİK değeri 250-500 µg/ml arasında, yedisinin (%11) MİK değeri 501-1000 µg/ml arasında, beşinin (%8) MİK değeri 1001-1500 µg/ml arasında ve 42'sinin (%65) MİK değeri 1500 µg/ml üzerinde saptandı. Güneş ve ark.⁽²³⁾ yaptığı çalışmada, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun kurkumin MİK değeri 175 µg/ml olarak bulunmuştur. Negi ve ark.⁽²⁴⁾ 30 çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatının kurkumin MİK değerlerinin 50 µg/ml üzerinde olduğunu saptamışlardır. Literatürde, klinik *P. aeruginosa* izolatlarında kurkuminin MİK değerlerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu iki çalışmada çalışmamıza göre daha düşük MİK değerlerinin saptanmış olmasının yöntem farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, virülans faktörleri üretimi açısından sub-MİK konsantrasyonlarda kurkumine maruz bırakılarak ölçülen absorbans değerleri ile kurkuminsiz olarak ölçülen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Rudrappa ve Bais⁽²⁵⁾ tarafından yapılan bir çalışmada bitki ve hayvan patojenite modelleriyle kurkuminin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun virülans faktörlerine etkisi araştırılmış ve kurkuminin biyofilm oluşumu, elastaz/proteaz aktivitesi, piyosiyenin sentezi ve AHL üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Packiavathy ve ark.⁽²⁶⁾ *P. aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* suşlarında kurkuminin biyofilm oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir. 100 µg/ml konsantrasyonda kurkumine maruz bırakılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm kütlesinin %89 azaldığı ve aynı konsantrasyonda kurkuminin etkisi ile EPS üretiminin %97 düştüğünü göstermişlerdir. Ancak aynı çalışmada kurkumin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun olgun biyofilmine karşı etkili bulunmamıştır. Sethupathy ve ark.⁽²⁷⁾ yaptığı çalışmada ise,

sürekli kurkumin maruziyetinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde 20 pasaj boyunca güçlü bir proteaz, elastaz, piyosiyanın ve biyofilm inhibi-törü olduğu gösterilmiştir.

Her ne kadar kurkumine bir kez maruz bırakılan *P. aeruginosa* izolatlarının araştırdığımız virü-lans faktörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamış ($p>0.05$) olsa da, farmakodi-namik özellikleri, anti-inflamatuvar ve anti-bakteriyel etkileri gözönünde bulundurulduğun-da, KF'li hastalarda in-vivo çalışmalarla uzun süreli kurkumin kullanımının araştırılması uygun olacaktır.

TEŞEKKÜR

Kistik fibrozlu hastaların solunum yolu örnek-le-rinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarını sağladığı için Prof. Dr. Burçin Şener'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. D'Agata E. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* Species. In: Bennett JE, Dolin R, Blasser JM (eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Edition, Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2015:2518-31.
2. Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA. *Pseudomonas* ve ilişkili bakteriler (çeviri: P. Çırağil). Başustaoglu AC (Editör). Tıbbi Mikrobiyoloji. Ankara: Atlas Kitapçılık 2010:333-41.
3. Vahaboğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:2175-86.
4. Erdem B. *Pseudomonas*lar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (çeviri). Editör(ler) Mutlu G, Emir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Ankara: Güneş Kitapevi. 1999:733-8.
5. Kıpnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006; 36:78-91. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>
6. Lovewell RR, Patankar RY, Berwin B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306:L591-603. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00335.2013>
7. Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 2004; 279:30871-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400796200>
8. Kıpnis E, Guery BP, Tournoy A, et al. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* - induced acute lung injury. *Shock* 2004; 21:444-51. <https://doi.org/10.1097/00024382-200405000-00008>
9. Walker TS, Tomlin KL, Worthen GS, et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73:3693-701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>
10. Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2008; 39:82-8.
11. Langan KM, Kotsimbos T, Peleg AY. Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28:547-56. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000217>
12. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of kurkumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Alter Med Rev* 2009; 14:141-53.
13. Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Kurkumin derived from turmeric (*Curcuma longa*). In: Bagchi D, Preuss HG, Eds. *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Boca Raton: CRC Press; 2005:349-87.
14. Singh S. From exotic spice to modern drug? *Cell* 2007; 130:765-8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.024>
15. CLSI. Clinical Laboratory Standarts Institute. Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri. Onaylanmış Standart M07-A8, Sekizinci Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2009.
16. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One* 2015; 10:e0121313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121313>
17. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R. Genetic approaches to study biofilms. *Methods Enzymol* 1999; 310:91-109. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10008-9)
18. Karatuna Ö. Solunum sistemi enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi. [Tıpta Uzmanlık Tezi] İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008.
19. Rust L, Messing CR, Iglewski BH. Elastase assays. *Methods Enzymol* 1994; 235:554-62. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35170-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35170-8)
20. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* (1985) 1993; 75:1661-9.
21. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMSS). Bakteri Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri Standart Uygulama Prosedürleri (SUP). Revizyon No.1, Ocak 2014. Mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/uamss/adit-sup.html?download=444:adt-sup. Erişim tarihi: Aralık 2016.
22. CLSI. Clinical Laboratory Standarts Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24, Clinical Laboratory Standarts Institute, 2014.
23. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of kurkumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health* 2016; 32:246-50. <https://doi.org/10.1177/0748233713498458>
24. Negi N, Prakash P, Gupta ML, Mohapatra TM. Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:DC04-7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8329.4965>
25. 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; 56:1955-62. <https://doi.org/10.1021/jf072591j>
26. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.002>
27. Sethupathy S, Prasath KG, Ananthi S, Mahalingam S, Balan SY, Pandian SK. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. *J Proteomics* 2016; 145:112-26. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.019>