



# TIP TEKNO'17

TIP TEKNOLOJİLERİ KONGRESİ

12-14 Ekim 2017 / TRABZON

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Prof.Dr. Osman Turan Kongre Merkezi



Biyomedikal ve Klinik  
Mühendisliği Derneği



Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü  
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Biyomedikal Optik

13 Ekim 2017 - 11.00-12.30 - Salon A

## Klorin e6 ile birlikte Uygulanan Antibakteriyel Fotodinamik Terapi Uygulamasının *Staphylococcus aureus* Üzerindeki Etkisi

### The Effect of Antibacterial Photodynamic Therapy with Chlorin e6 on Multidrug-Resistant strain of *Staphylococcus aureus*

Emel Bakay<sup>1</sup>, Aziz Kolkıran<sup>2</sup>, Nermin Topaloğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
{emel.bakay, nermin.topaloglu}@ikc.edu.tr

<sup>2</sup>Mühendislik Bilimleri Bölümü, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
{aziz.kolkiran}@ikc.edu.tr

**Özetçe**—Çoklu ilaç direnci geliştirmiş *Staphylococcus aureus* suşları (*S. aureus*) özellikle deri ve vücudun bir çok kısmında enfeksiyona sebep olabilen gram pozitif bir bakteri türüdür. Gün geçtikçe *S. aureus* suşları var olan antibiyotik çeşitlerine dirençli hale gelmiştir. Bu durum çoklu ilaç direnci geliştirmiş bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavi edilebilmesi için farklı tedavi yollarının araştırılıp geliştirilmesine sebep olmuştur. Fotodinamik Terapi (FDT) bu amaçla araştırılan alternatif bir tedavi tekniğidir. FDT tanım olarak enfeksiyonlu bölgeye uygulanan ışığa duyarlı maddenin belirli bir dalgaboyundaki ışık kaynağıyla uyarılmasıyla toksik etki oluşturmaktadır. Bu sayede dirençli bakterilerin ölümü sağlanmaktadır. Bu çalışmada maksimum 2 Watt gücünde çalışan diyot pompalı 655 nm lazer ışık kaynağı ile ışığa duyarlı madde olarak farklı dozlarda Klorin e6 (Ce6) kullanılmıştır. Ce6 ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi uygulaması sonucunda çoklu ilaç direnci geliştirmiş *S. aureus* bakterisi üzerinde etkili ölüm oranları elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler** — gram pozitif; çoklu ilaç direnci; klorin e6; 655 nm; fotodinamik terapi.

**Abstract**—Multi drug resistant strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which is a type of gram-positive bacteria that can cause infection, especially in the skin and many parts of the body. Over the years, strains of *S. aureus* have

become resistant to existing antibiotics. This has led to the research and development of different treatment modalities to treat infections caused by multi drug resistant bacteria. Photodynamic Therapy (PDT) is an alternative treatment technique investigated for this purpose. PDT is, by definition, a method that produce toxic compounds to the infected region by stimulating the light-sensitive substance with a light source at a certain wavelength. In this respect, the death of resistant bacteria is ensured. In this study, chlorin e6 (Ce6) was used at different concentrations as a light sensitive substance with 655 nm laser light source with diode pump working at maximum 2 Watt power. Effective photodynamic therapy with Ce6 resulted in effective mortality rates on Multi drug resistant *S. aureus* strain.

**Keywords** — gram positive; multi drug resistance; chlorin e6; 655 nm; photodynamic therapy.

#### I. GİRİŞ

Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler gün geçtikçe antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirmekle birlikte tedavi sürecinde yara iyileşmesini de olumsuz yönde etkileyerek geciktirmektedir (1). Bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmaları üzerine araştırmacılar daha farklı tedavi yöntemleri aramaya ihtiyaç duymuştur. Fotodinamik Terapi (FDT) bu amaçla araştırılan ve kullanılan önemli bir tedavi tekniğidir (2, 3).

FDT, bakteri hücresine uygulanan ışığa duyarlı maddenin ışıkla uyarılması sonucunda uygulandığı bölgede yarattığı toksik etkiyle zararlı hücrelerin yok

## Biyomedikal Optik

13 Ekim 2017 - 11.00-12.30 - Salon A

edilmesidir. Işığa duyarlı madde görünür ışık ya da kızılötesi spektrumdaki belirli bir dalgaboyunu soğurabilme özelliğine sahiptir (4). Uygulandığı yerde uygun dalga boyundaki ışığa maruz bırakıldığında reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlayarak zararlı hücreler üzerinde istenilen öldürücü etkiyi gerçekleştirir (5-10). Bakterilerde FDT hücre içi çeşitli organelleri ve biyomolekülleri fotohasar yoluyla etkileyerek çalışır. Oluşan sitotoksik etki ışığa duyarlı maddenin uygun dalga boyunda ışık varlığında oksijen radikallerinin oluşmasıyla açıklanır (11).

Fotodinamik Terapinin kanser gibi çeşitli hastalıklar üzerinde tedavi çalışmaları bulunmaktadır. Fakat ışığa duyarlı maddelerin çeşitliliği, ışığa duyarlılık skalasının geniş olması ve bakteri suşlarının üzerinde oluşturduğu toksik etki daha belirgin olmasından dolayı FDT'nin dirençli bakterilerin sebep olduğu yaraların iyileşmesinde kullanımı oldukça yaygındır (12). FDT mekanizmasının bakteri üzerinde değişik yollarla etki ettiği bilinmektedir. Bu etkiyi DNA hasarı ve sitoplazmik membran etkisi olarak sınıflandırabiliriz. Uygulanan ışığa duyarlı madde ve uygulama zamanına göre oluşan etki farklılık gösterir. FDT, DNA hasarında nükleik asitlerde fotohasar oluşturur. Hücre membranında ise hücre zarı enzimlerinin inaktivasyonu sağlanır ve lipid membrana etki eder. Hücre zarının zarar görmesiyle hücre içeriği sızıntısı ya da zar nakil sistemlerinin geri dönülmez yıkımı oluşur. Ayrıca hücre zarı enzimlerinin inaktivasyonu hücrede sentez olayının bozulması ve bölünen hücrelerin septumu şeklinde sonuçlar doğurur. Bu yollarla bakteri hücrelerinin ölümü gerçekleşir (11).

Çeşitli çalışmalarda porfirin ve türevleri, ftalosiyanın, rose bengal ve indosiyanın yeşili gibi çeşitli ışığa duyarlı maddeler kullanılmıştır (12). Klorin e6 (Ce6) diğerlerinin yanında gösterdiği hızlı etki ve bakteri membranına verdiği yüksek zarardan ötürü avantaj sağlamaktadır (2, 3). Işığa duyarlı bir maddenin etkinliği yalnızca alınan miktara bağlı değil, ısınma zamanında maddenin bakteri hücresi içerisinde bulunduğu konuma da bağlıdır (11). Ce6, bakteri hücresinde lipid membran çevresinde toplanır. Az miktarda ve uygun dalgaboyunda ışıkla birlikte diğerlerine göre belirgin etki gösterdiği için daha avantajlı olduğu düşünülmektedir (2, 3). Bu çalışmada ise gram pozitif çoklu ilaç direnci geliştirmiş *Staphylococcus aureus* suşu üzerinde klorin e6 (Ce6) ile Fotodinamik Terapi (PDT) yönteminin etkisi araştırılmıştır.

## II. YÖNTEM

### A. Bakteri Suşu

Bu çalışmada gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus*'un çoklu antibiyotik direnci geliştirmiş suşu kullanılmıştır. Stoktan tek bir koloniden hazırlanan bakteri solüsyonu 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında santrifüjlenerek elde edilen

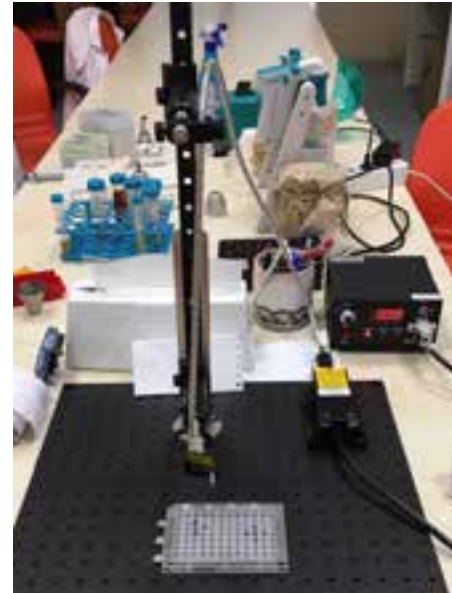
bakteriler fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisinde (PBS) çözülerek uygulamalara hazır hale getirilmişlerdir. 96 kuyucuklu plakadaki her bir kuyucuğa  $10^8$  CFU/mL PBS çözeltisindeki bakteri solüsyonu eklenmiştir.

### B. Işığa Duyarlı İlaç

Ce6 molekül formülü  $C_{34}H_{36}N_4O_6$  ve moleküler ağırlığı 596,684 g/mol olan FDT'de kullanılan 2. jenerasyon bir ilaçtır. İlaç solüsyonu, ilacın yapısı ışıklı ortamda bozulacağından ötürü karanlık ortamda ve her deney tekrarında istenilen konsantrasyonlarda taze olarak hazırlanmıştır. 0,5 µg/mL ve 250 µg/mL Ce6 konsantrasyonları arasında lazerli ve lazersiz olarak uygulamalar yapılmıştır.

### C. Optik Düzenek

Bu çalışmada diyot pompalı lazer cihazı kullanılarak 655 nm dalgaboyunda ışınım yapılmıştır. Ce6 görünür spektrumda kırmızı ışıkla maksimum etkinlik gösterdiği için bu dalga boyu kullanılmıştır. Lazer ve FDT gruplarında 25-50 J/cm<sup>2</sup> enerjide iki farklı ışık dozu uygulanmıştır. Bakteri solüsyonu 3 adet örnek içermek üzere 96'lık plakalara ekilip lazere maruz bırakılmıştır. FDT uygulamalarında %99 ve üzeri ölüm oranı görülen Ce6 konsantrasyonları ve lazer dozları araştırılmıştır.



Şekil 1. 655-nm Lazer Cihazı ve Optik Tabla Üzerindeki Optik Düzenek

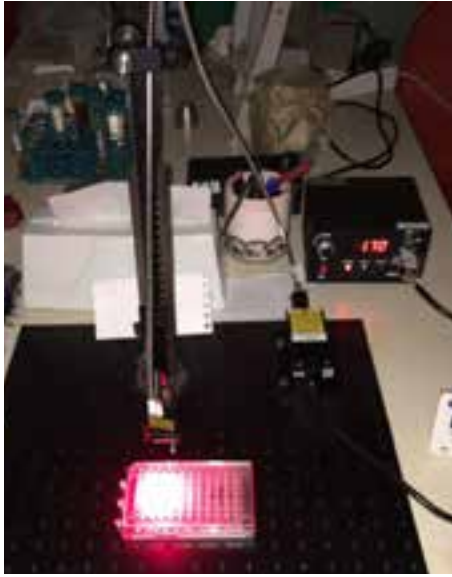
### D. Deneysel Prosedür

Deneyde her grup 96'lık plakalara 3'er örnek şeklinde çalışılmıştır. FDT, sadece Ce6, sadece lazer ve kontrol şeklinde 4 grup oluşturulmuştur. Her grupta 96 kuyucuklu plaka üzerinde lazer ışığının düştüğü belirli yerlere PBS ile seyreltilmiş 50 µL bakteri ekilmiştir. Kuyucuklarda kontrol ve sadece lazer gruplarında 50 µL PBS ile 50 µL bakteri, FDT ve sadece Ce6 grubunda ise 50 µL Ce6 ve 50 µL bakteri olmak üzere toplam 100 µL solüsyon örnekleri

## Biyomedikal Optik

13 Ekim 2017 - 11.00-12.30 - Salon A

hazırlanmıştır. Kontrol ve lazer grubunda PBS ile, FDT ve Ce6 grubunda ise Ce6 ile 15 dakika inkübasyon süresi uygulanmıştır. FDT ve lazer gruplarında solüsyon içeren her bir kuyucuğa lazer uygulaması yapılmıştır. Bütün uygulamalar sonucunda bütün gruplarda seri dilüsyon yöntemiyle yaşayan bakteri sayısı saptanmıştır.



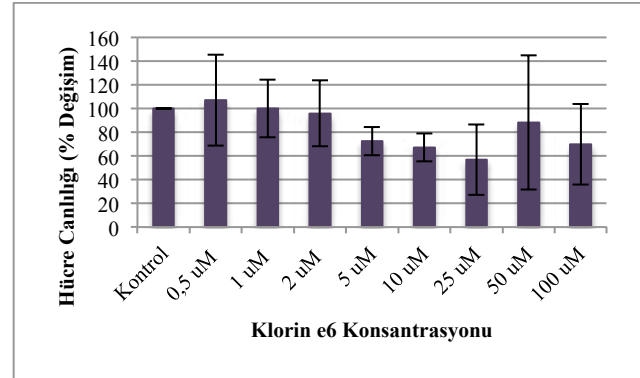
Şekil 2. 655-nm Lazer Cihazı ile 96 kuyucuklu plaka üzerindeki ışık uygulaması

### E. İstatistiksel Analiz

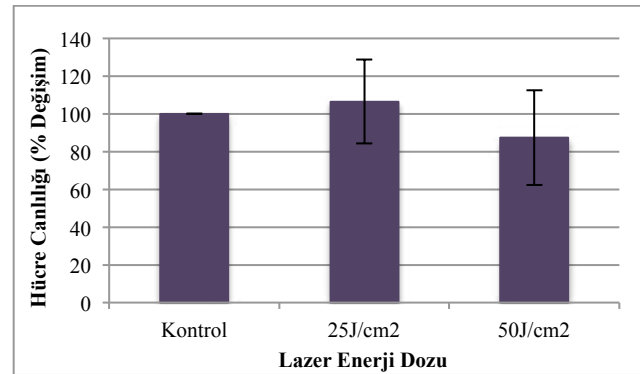
Deneyler sonucunda elde edilen veriler öncelikle tek yönlü ANOVA ile incelenmiştir. Veriler arasında farklılık olduğu görülünce her bir deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak t-test yöntemiyle incelemiştir. İstatistiksel farklılık  $p \leq 0,05$  olarak belirlenmiştir.

### III. SONUÇLAR

Yapılan bu uygulamalarda yalnızca Ce6 kullanılan grup ile kontrol grubunun sonuçları Şekil 3'te görüldüğü üzere benzerlik göstermiştir. İlaçın tek başına yaptığı maksimum öldürücü etki hücrelerde yaklaşık %40'lık bir azalmaya sebep olmuştur ve bu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Sadece lazer grubunda 25 ve 50 J/cm<sup>2</sup>'lik enerji dozu uygulamaları çok daha etkisiz olmuştur. Şekil 4'te görüldüğü üzere kontrol grubuna göre %15'lik bir azalmaya sebep olmuştur ve bu fark da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu uygulamalar sonucunda sadece ilaç ve lazer uygulamasının beklenildiği üzere hücreler üzerinde tek başına öldürücü bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 3. 0,5-100 µM konsantrasyon aralığında uygulanan Klorin e6'nın bakteri üzerindeki etkisi.



Şekil 4. 25 ve 50 J/cm<sup>2</sup> 655-nm lazer ışık dozunun bakteriler üzerindeki etkisi.

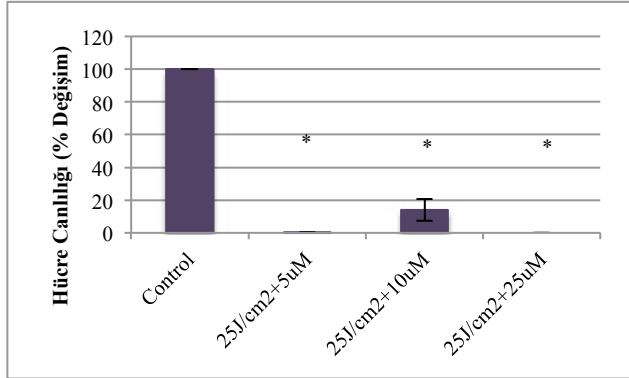
Şekil 5 ve 6'da görüldüğü üzere 25 J/cm<sup>2</sup> lazer uygulamasında 3 farklı Ce6 dozu (5-10-25 µM) kullanılmıştır. 50 J/cm<sup>2</sup> lazer uygulamasında ise 5 farklı Ce6 dozu (0,5-1-2-5-10 µM) kullanılmıştır. İki grupta da maksimum dozlarda canlılık gözlenmeyecek sonuçlar elde edilmiştir. %99'un üzerinde hücre ölümüne sebep olan en avantajlı minimum ışık ve ilaç dozu 50 J/cm<sup>2</sup> lazer ve 2 µM Ce6'dır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Fotodinamik Terapi uygulamaları sonucunda dozlara bağlı olarak elde edilen hücre ölümü

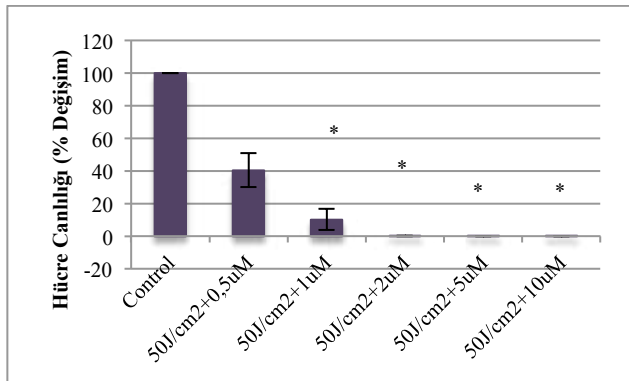
| Yüzde Değişim             |       |                            |         |
|---------------------------|-------|----------------------------|---------|
| 25J/cm <sup>2</sup> +5uM  | 99,87 | 50J/cm <sup>2</sup> +0,5uM | 59,6    |
| 25J/cm <sup>2</sup> +10uM | 85,9  | 50J/cm <sup>2</sup> +1uM   | 89,8    |
| 25J/cm <sup>2</sup> +25uM | 100   | 50J/cm <sup>2</sup> +2uM   | 99,88   |
|                           |       | 50J/cm <sup>2</sup> +5uM   | 99,9936 |
|                           |       | 50J/cm <sup>2</sup> +10uM  | 99,9918 |

## Biyomedikal Optik

13 Ekim 2017 - 11.00-12.30 - Salon A



Şekil 5. 25 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile birlikte 5, 10, 25 µM konsantrasyonundaki Klorin e6 uygulamasının bakteri üzerindeki fotoinaktivasyon etkisi. \* deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (p≤0,05).



Şekil 6. 50 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile birlikte 0,5, 1, 2, 5, 10 µM konsantrasyonundaki Klorin e6 uygulamasının bakteri üzerindeki fotoinaktivasyon etkisi. \* deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (p≤0,05).

## IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada FDT gruplarına uygulanan lazer ve Ce6 ilacı dozlarına bakıldığında 50 J/cm<sup>2</sup> lazerde Ce6 miktarı 1 µM'ı geçince ölüm oranı maksimum seviyeye gelip canlılık gözlenmemiştir. 25 J/cm<sup>2</sup> lazerde ise 5 µM Ce6'dan itibaren benzer etki elde edilmiştir. Her ne kadar 50 J/cm<sup>2</sup> daha yüksek bir enerji dozu olmasına rağmen etkisi 5M ilaç konsantrasyonundan daha azdır. Amaç minimum lazer ve Ce6 dozunda maksimum ölüm oranı sağlamak olduğu için ve özellikle ilacın tek başına öldürücü etkisinden kaçınmak için 50 J/cm<sup>2</sup> lazer ile 2 µM Ce6 FDT grubu bu çalışmada büyük fayda sağlamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda (411 J/cm<sup>2</sup> +25 µM ICG) çok yüksek dozlarda ışığa duyarlı madde ve lazer gücü (2, 3) kullanılması gerektiğine bakarak bu çalışmadaki uygulamalar sonucunda elde edilen veriler ışığında 655-nm lazer ışığı ve Klorin e6 fotoinaktivasyonunun ümit vaat eden ve daha avantajlı bir uygulama olduğu görülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ÖNP Proje No: 2015-ÖNP-MÜMF-0017) tarafından desteklenmiştir. Ayrıca bu çalışma sırasında verdiği desteklerden dolayı Fatma İbiş, Nur Çobanoğlu ve Melike Çağan'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKÇA

- [1] Dayan, G., Naglaa, M., Scully, I., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J., Anderson, A. (2016). Staphylococcus aureus: The current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. Expert Review of Vaccines, 14760584.2016.1179583.
- [2] Park, J.-H., Ahn, M.-Y., Kim, Y.-C., Kim, S.-A., Moon, Y.-H., Ahn, S.-G., & Yoon, J.-H. (2012). In vitro and in vivo antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6 against Staphylococcus aureus Xen29. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35(4), 509–514.
- [3] Park, J. H., Moon, Y. H., Bang, I. S., Kim, Y. C., Kim, S. A., Ahn, S. G., & Yoon, J. H. (2010). Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers in Medical Science*, 25(5), 705–710.
- [4] Nyokong, T., & Ahsen, V. (2012). Photosensitizers in medicine, environment, and security. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security* (Vol. 9789048138).
- [5] Embleton, M. L., Nair, S. P., Heywood, W., Menon, D. C., Cookson, B. D., & Wilson, M. (2005). Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3690–3696.
- [6] Calin, M. A., & Parasca, S. V. (2009). Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, 24(3), 453–460.
- [7] Jeon, Y. M., Lee, H. S., Jeong, D., Oh, H. K., Ra, K. H., & Lee, M. Y. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy using chlorin e6 with halogen light for acne bacteria-induced inflammation. *Life Sciences*, 124, 56–63.
- [8] Lambrechts, S. A. G., Demidova, T. N., Aalders, M. C. G., Hasan, T., & Hamblin, M. R. (2005). Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 4(7), 503–9.
- [9] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(1), 1–23.
- [10] Denis, T. G. St., & Hamblin, M. R. (2011). An Introduction to Photoantimicrobials: Photodynamic Therapy as a Novel Method of Microbial Pathogen Eradication. In *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 675–683.
- [11] Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*.
- [12] Topaloglu, N., Gulsoy, M., & Yuksel, S. (2013). Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-nm Diode Laser. *Photomedicine and Laser Surgery*, 31(4), 155–162.