



Antibakteriyel Fotodinamik Terapinin Gram Negatif Bakteriler Üzerindeki Yetersiz Etkisinin Potasyum İyodür ile İyileştirilmesi

Improvement of Inadequate Effect of Antibacterial Photodynamic Therapy on Gram Negative Bacteria with Potassium Iodide

Melike Çağan_1, Emel Bakay_2
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
melikecagan37@gmail.com_1,
emelbakay@hotmail.com_2

Aziz Kolkıran_3, Nermin Topaloglu_4
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
aziz.kolkiran@ikc.edu.tr_3,
nermin.topaloglu@ikc.edu.tr_4

Özetçe— *Pseudomonas aeruginosa* suşları enfeksiyona sebep olabilen gram negatif bir bakteri türüdür. Bu suşlar antibiyotiklerin yanlış kullanılmasından dolayı zamanla antibiyotik direnci kazanmışlardır. Antibiyotik direnci tedaviyi zorlaştırmıştır. Bu durum yeni tedavi yöntemleri araştırılmasına neden olmuştur. Bu yeni yöntemlerden birisi de Fotodinamik Terapi (FDT)'dir. FDT ışığa duyarlı ve belirli bir dalgalıyuna sahip ışıkla aktive olan bir madde tarafından üretilen reaktif oksijen türleri aracılığı ile mikroorganizmaların fotoinaktivasyonudur. Bu yöntem ile dirençli bakterilerin ölümü sağlanabilmektedir. Bu çalışmada maksimum 2 Watt gücünde çalışan diyot pompalı 655 nm lazer ışık kaynağı ve ışığa duyarlı madde olarak farklı dozlarda Klorin e6 (Ce6) kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı Potasyum İyodür (KI) tuzu kullanılarak antibakteriyel fotodinamik terapinin etkisini arttırmaktır. Potasyum İyodürün sinerjistik etkisi sayesinde Ce6 ile gerçekleştirilen fotodinamik terapi uygulaması sonucunda antibiyotik direnci geliştirmiş *P. aeruginosa* üzerinde oldukça etkili ölüm oranları elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler — *Pseudomonas aeruginosa*; çoklu ilaç direnci; klorin e6; 655 nm; potasyum iyodür; antibakteriyel fotodinamik terapi.

Abstract— *Pseudomonas aeruginosa* strains are gram-negative bacteria that can cause serious chronic infections. These strains have gained antibiotic resistance over time due to misuse of antibiotics. Since bactericide resistance to antibiotics makes treatment difficult, this has led to the research for new treatment methods. One of these new methods is Photodynamic Therapy (PDT). PDT is photoinactivation of microorganisms by reactive oxygen species that are produced by a light-activated and light-sensitive substance with a light source at certain wavelength. In this study, 655 nm laser light source with diode pump working at maximum 2 Watt power and chlorine e6 (Ce6) at different doses were used as light sensitive substance. The aim of this study was

to increase the effect of antibacterial photodynamic therapy on resistant gram-negative bacteria by using Potassium Iodide (KI) salt synergistically. This application resulted in quite effective mortality rates on antibiotic resistant *P. aeruginosa* strain.

Keywords — *Pseudomonas aeruginosa*; multi drug resistance; chlorin e6; 655 nm; potassium iodide; antibacterial photodynamic therapy.

I. GİRİŞ

Antibiyotiklerin yanlış kullanılması sonucu bazı bakteriler mutasyon geçirerek antibiyotik direnci geliştirmişlerdir. Bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar antibiyotikle tedavi edilemez olmuştur (1). Bu durum Fotodinamik Terapi (FDT) gibi yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına neden olmuştur (2, 3).

FDT, ışıkla aktifleşen ve ışığı emen fotosensitizan tarafından üretilen reaktif oksijen türleri ile mikroorganizmaların fotoinaktivasyonudur. Antibiyotiğe duyarlı ve dirençli bakterilerin fotoinaktivasyonu antibakteriyel FDT ile sağlanır. Fotosensitizanın konsantrasyonu ve spektrumu ışığın dozu ve dalgalıyuna uyumlu olursa tedavi edici etki elde edilebilir. Hedef hücrenin nekrozu bileşenlerinin reaktif oksijen türleri tarafından oksitlenmesiyle sağlanır (4,5).

FDT kanser, çeşitli hastalıklar ve bakteriler üzerinde oluşturduğu toksik etkiyle sorunların tedavisinde kullanılabilen bir yöntemdir (6-10).

Klorin e6 (Ce6) 2. jenerasyon bir fotosensitizandır. Düşük toksisitesi, kolay sentezlenmesi, hedef hücrede hızlı dağılması, derinlere nüfuz edebilmesi ve antibakteriyel FDT'de hızlı bir etkiye sebep olduğu için gram negatif bakterilerin yok edilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir (11-13). Ayrıca fotosensitizanın etkisini arttırmak için potasyum iyodür

(KI) tuzunun kullanımı da avantaj sağlayabilir. Önceki çalışmalar, potasyum iyodür gibi inorganik tuzlarla antibakteriyel fotodinamik terapinin etkinliğinin artırılabilceğini göstermiştir (14). Potasyum iyodürün etki mekanizması incelendiğinde elektron transferiyle moleküler iyodür ve reaktif iyodür türlerinin oluştuğu ve bu reaktif iyodür türlerinin ekstra ölüme sebep olduğu görülmüştür (15,16). Bu bilgiler doğrultusunda fotosensitizanın etkisini arttırmak için potasyum iyodür tuzu (KI) kullanımının avantaj sağlayacağı düşünülerek bu çalışmada gram negatif, çoklu ilaç direnci geliştirmiş *Pseudomonas aeruginosa* suşu üzerinde klorin e6 (Ce6) ile FDT yönteminin etkisi, potasyum iyodür ile birlikte araştırılmıştır.

II. YÖNTEM

A. Bakteri Suşu

Bu çalışmada gram negatif bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın 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) çözümlenerek uygulamalara hazır hale getirilmiştir. 96 kuyucuklu plakadaki her bir kuyucuğa 10^8 CFU/mL PBS çözeltisindeki bakteri solüsyonu eklenmiştir.

B. Işığa Duyarlı İlaç

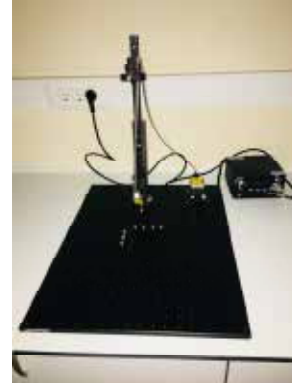
Ce6 molekül formülü $C_{34}H_{36}N_4O_6$ ve moleküler ağırlığı 596,684 g/mol olan FDT'de kullanılan 2. jenerasyon bir ilaçtır. Işık etkisiyle bozulmasını engellemek için ilaç hazırlığı ve bütün diğer uygulamalar karanlıkta yapılmıştır. 1, 2.5, 100 ve 500 μ M Ce6 konsantrasyonları bakteri üzerinde lazerli ve lazersiz ortamda incelenmiştir.

C. Potasyum İyodürün Etkisi

Bu çalışmada potasyum iyodür klorin e6'nın etkisini arttırmak için kullanılmıştır. Klorin e6 ile inkübe edilen hücrelerin üzerine lazer uygulamasından hemen önce potasyum iyodür eklenmiştir. Tek başına potasyum iyodürün, lazer uygulaması olmadan klorin e6 ve potasyum iyodürün ve lazer uygulaması yapılarak klorin e6 ve potasyum iyodürün bakteriler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deneylerde 100 μ M konsantrasyonunda potasyum iyodür kullanılmıştır.

D. Optik Düzenek

Bu çalışmada diyot pompalı lazer cihazı kullanılarak 655 nm dalgaboyunda ışın yapılmıştır. Ce6 maddesini aktif hale getirmek için görünür spektrumdaki kırmızı lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazer ve FDT gruplarında 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 J/cm² enerjide yedi farklı ışık dozu uygulanmıştır. Lazer grubunda bakterileri yok etmeyen ama FDT grubunda ilaç ve tuz ile birlikte etkili ölüm oranlarına sebep olan enerji yoğunluğu araştırılmıştır.



Şekil 1. a. 655-nm Lazer Cihazı ve Optik Tabla Üzerindeki Optik Düzenek. b. 655-nm Lazer Cihazı ile 96 kuyucuklu plaka üzerindeki Işık Uygulanması.

E. Deneysel Prosedür

Bu çalışmada Klorin e6 ve KI ile FDT'nin etkisi çoklu antibiyotik direncine sahip *P. aeruginosa* üzerinde araştırılmıştır. Araştırmada 7 grup oluşturulmuştur:

- 1.Kontrol grubu: Klorin e6, KI ve lazerin uygulanmadığı grup
- 2.Klorin e6 grubu: Sadece Klorin e6 uygulanan grup
- 3.Lazer grubu: Sadece lazer uygulaması yapılan grup
- 4.FDT grubu: Lazer ile birlikte Klorin e6 uygulanan grup
- 5.KI grubu: Sadece KI uygulaması yapılan grup
- 6.Klorin e6+KI grubu: Klorin e6 ile birlikte KI uygulanan grup
- 7.FDT+KI grubu: Lazer ile birlikte Klorin e6 ve KI uygulanan grup

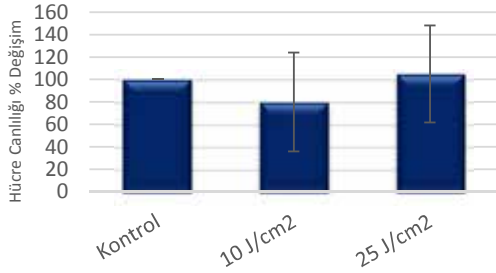
Deneyde her grup 96'lık plakalara 3'er örnek şeklinde çalışılmıştır. Şekil 1'deki gibi her grupta 96 kuyucuklu plaka üzerinde lazer ışığının düştüğü belirli yerlere PBS ile seyreltilmiş 50 μ L bakteri ekilmiştir. Kuyucuklarda kontrol ve sadece lazer gruplarında 100 μ L PBS ile 50 μ L bakteri, FDT ve sadece Ce6 grubunda ise 50 μ L Ce6 ile 50 μ L bakteri, FDT+KI grubunda ise 50 μ L Ce6 solüsyonu, 50 μ L KI ve 50 μ L bakteri olmak üzere toplam 150 μ L solüsyon örnekleri hazırlanmıştır. Kontrol ve lazer grubunda PBS ile FDT, FDT+KI ve Ce6 gruplarında ise Ce6 ile 15 dakika inkübe edilmiştir. FDT+KI, FDT ve lazer gruplarında solüsyon içeren her bir kuyucuğa lazer uygulaması yapılmıştır. Bütün uygulamalar sonucunda bütün gruplarda seri seyreltme yöntemiyle yaşayan bakteri sayısı saptanmıştır. Seyreltme 1:10 oranında yapılmıştır. Mevcut çözeltilerden 1 birim hacim alınarak toplam hacim olan 10 birime tamamlanmıştır. Gerekli miktarda tekrarlanarak uygulama tamamlanmıştır. Seyreltme sonrası bakteri solüsyonu yayılan plakalar gece boyunca bekletilmiş ve ertesi gün koloni sayımı yapılmıştır.

F. İstatistiksel Analiz

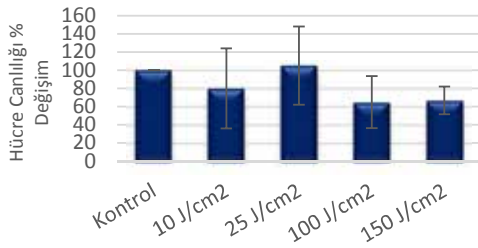
Deneyler sonucunda elde edilen veriler öncelikle tek yönlü ANOVA ile incelenmiştir. Veriler arasında farklılık olduğu görülünce her bir deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak t-test yöntemiyle incelenmiştir. İstatistiksel farklılık $p \leq 0,05$ olarak belirlenmiştir.

III. SONUÇLAR

Yapılan uygulamalar sonucunda kontrol grubunun sonuçları ile yalnızca Ce6 kullanılan grubun sonuçları Şekil 2'de görüldüğü üzere benzerlik göstermektedir. 500 μM gibi ilacın çok yüksek kullanıldığı uygulamada dahi tek başına hücrelerde maksimum yaklaşık %49'luk bir azalmaya sebep olduğu görülmektedir ve istatistiksel olarak anlamlı değildir. 100 μM ilacın etkisi çok daha az olmuştur. Bu sebeple 1 ve 2,5 μM fotosensitizan kullanımında hücreler üzerinde etki beklenmemektedir. Sadece lazer uygulamasının yapıldığı gruplar da kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. 655-nm dalgaboyu belirtilen enerji dozlarında hücreler üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olmamış, bazı ışık dozu uygulamalarında kontrol grubuna göre artmaya sebep olarak proliferasyonu tetiklemiştir (Şekil 3). Bu uygulamalar sonucunda sadece ilaç ve lazerin öngörüldüğü üzere hücreler üzerinde tek başına öldürücü bir etkisi olmamıştır.

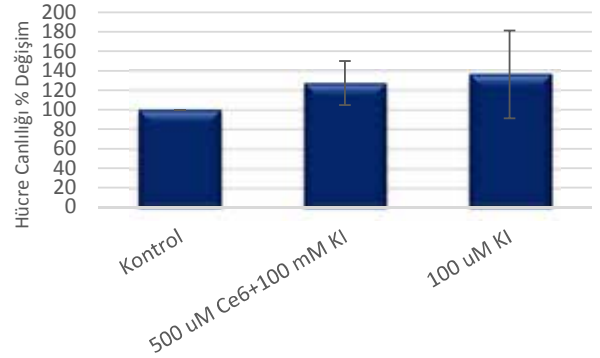


Şekil 2. 100 ve 500 μM konsantrasyonlarında uygulanan Klorin e6'nın *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi.



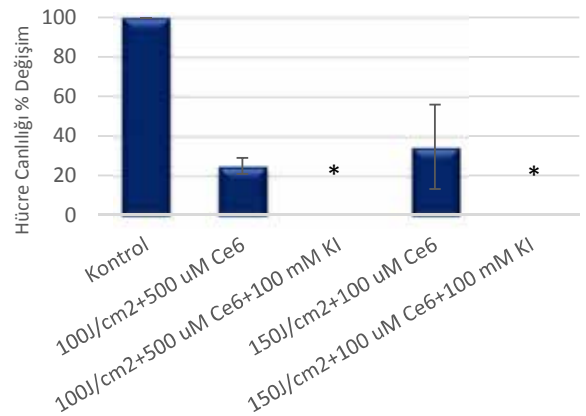
Şekil 3. 10, 25, 100 ve 150 J/cm^2 655-nm lazer ışık dozunun *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi.

Sadece 100 mM KI ve kullanılan maksimum ilaç konsantrasyonu olan 500 μM Ce6 ile 100 μM KI'nın bakteriler üzerindeki etkisi incelendiğinde hücrelerde azalma görülmemiş, bu uygulama hücrelerde bir miktar proliferasyona sebep olmuştur (Şekil 4). Bu sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, aralarında herhangi bir istatistiksel farklılığın olmadığı görülmüştür.

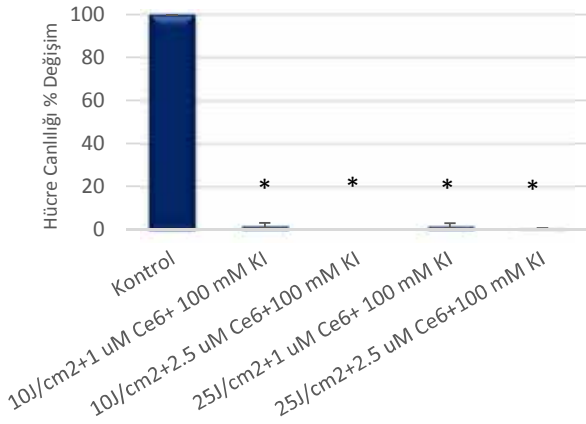


Şekil 4. 500 μM konsantrasyonundaki Klorin e6 ile 100 mM KI ve sadece 100 mM KI tuzunun *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi.

Şekil 5 ve Şekil 6'da görüldüğü üzere 10, 25, 100 ve 150 J/cm^2 ışık dozu ve 1, 2,5, 100 ve 500 μM Ce6 ile 100 mM KI eşliğinde lazer uygulamaları yapılmıştır. 100 ve 150 J/cm^2 ışık dozu, 500 μM Ce6 ve 100 mM KI kullanıldığında %100 ölüm oranı elde edilmiştir. %99.9'a yaklaşan ölüm oranlarının elde edilmesi için ilaç konsantrasyonu ve ışık dozu düşürülmüştür. İlaç konsantrasyonu ve ışık dozu epeyce düşürüldüğünde istenilen sonuçlara ulaşılmıştır. 25 J/cm^2 ışık dozu ile 2,5 μM Ce6 ve 100 mM KI kullanıldığında %99.8, aynı ışık dozuyla 1 μM Ce6 ve 100 mM KI kullanıldığında %98.4 ölüm oranı elde edilmiştir. 10 J/cm^2 ışık dozu ile 1 μM Ce6 ve 100 mM KI kullanıldığında ise %98.2, aynı ışık dozuyla 2,5 μM Ce6 kullanıldığında %100 ölüm elde edilmiştir. Bu sonuçlar kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir.



Şekil 5. 100 mM KI'nın farklı ışık dozu ve ilaç konsantrasyonları ile birlikte *P. aeruginosa* üzerindeki fotoinaktivasyon etkisi. * deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 6. 100 mM KI'nın farklı ışık dozu ve ilaç konsantrasyonları ile birlikte *P. aeruginosa* üzerindeki fotoinaktivasyon etkisi. * deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).

IV. TARTIŞMA

Önceki çalışmalarımızda sadece FDT gruplarında Ce6 ilacının *P. aeruginosa* üzerinde etkisiz kaldığı görülmüştür (17). Işık dozu ve ilaç konsantrasyonunun artırılmasına rağmen %100'lere yaklaşan ölüm oranları elde edilememiştir. Maksimum %75'lik bir ölüm oranı elde edilmiştir (17). Bu sebeple fotosensitizanın etkisini arttırabilmek amacıyla adjuvan bir madde olarak etanol kullanılmıştır. Bu uygulamadaki amaç ışık dozunu ve ilaç konsantrasyonunu ciddi oranda düşürüp %99'u geçen ölüm oranını elde edebilmektir. Farklı ışık dozu ve ilaç konsantrasyonları ile beraber etanol kullanıldığında maksimum yaklaşık %93'lük bir ölüm oranı elde edilmiştir. Bu ölüm oranı 200 J/cm² ışık dozu ile %20 etanol içeren 250 µM Ce6 kullanılan FDT uygulamasında elde edilmiştir. Etanolün adjuvan madde olarak kullanımı Ce6 konsantrasyonunu yarı yarıya azaltmaya yararken ışık dozunda herhangi bir etkiye sebep olamamıştır (17). Bu çalışmada ise, FDT uygulamalarında kullanılan ışık dozu ve ilaç konsantrasyonlarını daha fazla düşürmek için ve dirençli *P. aeruginosa* suşunu başarılı bir şekilde yok etmek için potasyum iyodür tuzu (KI) kullanılmıştır. Tek başına tuzun ve tuzla beraber ilacın bakteriler üzerinde toksik etkisi olmamıştır. FDT uygulamalarında 100 mM KI kullanımı %100'lük ölüm elde edilmesini sağlamıştır. 10 J/cm² ışık dozu ile 2.5 µM Ce6 ve 100 mM KI kullanılan FDT uygulamalarında maksimum ölüm oranı elde edilmiştir. Potasyum iyodür kullanımı antibakteriyel fotodinamik terapi uygulamasında ışık dozu ve ilaç konsantrasyonunda büyük oranda azaltırken, direnç geliştirmiş gram negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın yok edilmesini başarı ile sağlamıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ÖNP Proje No: 2015-ÖNP-MÜMF-0017) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- [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] Lambrechts, S. A., Demidova, T. N., Aalders, M. C., Hasan, T., & Hamblin, M. R. (2005). Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(7), 503-509.
- [5] Kutlubay, Z., Pehlivan, Ö., & Engin, B. (2011). Fotodinamik tedavi. *Dermatoz*, 2(4), 391-404.
- [6] Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*
- [7] Maisch, T., Szeimies, R.-M., Jori, G., & Abels, C. (2004). Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3(10), 907–17.
- [8] Jori, G., & Roncucci, G. (2006). Photodynamic Therapy in Microbial Infections. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 15(3), 421–426.
- [9] Nowis, D., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbsiak, M., & Gołąb, J. (2005). The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*.
- [10] Carrera, E. T., Dias, H. B., Corbi, S. C. T., Marcantonio, R. A. C., Bernardi, A. C. A., Bagnato, V. S., ... Rastelli, A. N. S. (2016). The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Physics*, 26(12), 123001.
- [11] Kostenich GA, Zhuravkin IN, Zhavrid EA (1994) Experimental grounds for using chlorin e6 in the photodynamic therapy of malignant tumors. *J Photochem Photobiol B* 22:211–217
- [12] Ryu, A. R., Wang, Y. Y., & Lee, M. Y. (2014). Differential protein expression associated with photodynamic therapy using chlorin e6. *Molecular & Cellular Toxicology*, 10(4), 423-431.
- [13] Park, H., & Na, K. (2013). Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy. *Biomaterials*, 34(28), 6992-7000.
- [14] Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., & Hamblin, M. R. (2015). Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(9), 5203-5212.
- [15] Wen, X., Zhang, X., Szweczyk, G., El-Hussein, A., Huang, Y. Y., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2017). Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by rose bengal in in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(7), e00467-17.
- [16] Huang, L., Szweczyk, G., Sarna, T., & Hamblin, M. R. (2017). Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. *ACS infectious diseases*, 3(4), 320-328.
- [17] Çağan, M., Kolkiran, A., & Topaloğlu, N. (2017, October). The effect of ethanol on photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa* with chlorin e6 as an adjuvant therapy. In *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO)*, 2017 (pp. 1-4). IEEE.