



Adjuvan Terapinin Antibakteriyel Fotodinamik Terapi Uygulamasında Lazer Enerji Dozu Ve Fotosensitizan Konsantrasyonuna Olumlu Yönde Etkisi

The Positive Effect Of Adjuvant Therapy On Laser Energy Dose And Photosensitizer Concentration Of Antibacterial Photodynamic Therapy

Emel Bakay_1, Melike Çağan_2
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
emelbakay@hotmail.com
melikecagan37@gmail.com

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

Özetçe— Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) antibiyotiklerin yıllardır rastgele ve yaygın kullanılmasından ötürü çeşitli mutasyonlar geçirerek antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir. Bir çok antibiyotiğe kolayca dirençli hale geldiği için MRSA enfeksiyonlarına karşı çeşitli tedavi mekanizmaları geliştirilmeye başlanmıştır. Çeşitli dezenfektanlar, deterjanlar, organik çözücüler ve kimyasallar gerek tek başına gerekse yenilikçi metotlarla kombine edilerek sinerjistik etki yaratılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada MRSA suşları üzerinde fotodinamik terapi ile etanolün adjuvan etkisi incelenmiştir. Fotodinamik terapi uygulamalarında 655-nm lazer ışığı ve etanol içinde çözünmüş klorin e6 fotosensitizanı kullanılmıştır. Klorin e6 fotosensitizanın etanol kullanılarak etkinliği artırılmıştır. Etanolün kullanımı daha düşük dozda lazer ışığı ve daha düşük konsantrasyonda fotosensitizanın yeterli antibakteriyel etkiyi göstermesini sağlamıştır. *In vivo* ya da klinik çalışmalar açısından sağlıklı hücrelerin zarar görmemesi için ışık ve fotosensitizan oranı önemli derece minimum seviyelere çekilmiştir.

Anahtar Kelimeler — *Staphylococcus aureus*; 655-nm lazer ışığı; klorin e6; etanol; antibakteriyel fotodinamik terapi

Abstract— Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have become antibiotic resistant by several mutations due to the random and widespread use of antibiotics for years. Since many strains can easily become resistant to many antibiotics, various treatment mechanisms against MRSA infections have begun to be developed. Various disinfectants, detergents, organic solvents and chemicals have been tried to create synergistic effects either by themselves or by combining them with innovative methods. In this study, photodynamic therapy on MRSA strains and adjuvant effect of ethanol were assessed. In photodynamic therapy

applications, 655-nm laser light and chlorine e6 dissolved in ethanol were used. Using ethanol as an adjuvant therapy increased activity of Chlorine e6 with quite low dose of light energy and photosensitizer concentration resulting in sufficient antibacterial effect. The energy dose of light and the concentration of the photosensitizer were reduced substantially so that healthy cells would not be damaged in *in vivo* or clinical studies.

Keywords — *Staphylococcus aureus*; 655-nm laser light; chlorin e6; ethanol; antibacterial photodynamic therapy

I. GİRİŞ

Çoğunlukla ciltte ve mukozal membranda *Staphylococci*, diğer bakteri türleri ile karşılaştırıldığında fazla sayıda bulunan bakteri sınıfından biridir (1). Bu nedenle, cerrahi operasyon sonrası gibi bağışıklık sisteminin zayıfladığı zamanlarda hızlı bir şekilde patojenik etki gösterebilir. Vücudun çevre ile temas kurduğu noktalarda ve yüzeysel bölgelerde iyileşmeyen kronik yaralar, sivilceler ya da çibanlara sebep olabilir (2,3).

Oluşan bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin zamanla sık kullanımı ve *S. aureus*'un bunun sonucunda geçirdiği hızlı mutasyonlardan sebebiyle çeşitli antibiyotikler işe yaramaz hale gelmiş, bakteri direnç kazanmıştır (4). Konakçı hücrenin biyolojik ve kimyasal yapısını değiştirerek, antibiyotiğin bağlanmasını engeller ya da antibiyotiği bağlandığı kısımda inaktive eder (5). Bu şekilde antibiyotik bakteri hücresinde ve konakçı hücrede beklenen etkiyi göstermez. *S.aureus* bakterisi de zamanla bu mekanizmaları geçirerek metisilin ve penisilin başta olmak üzere bir çok antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir. Çalışmada



kullanılan Methisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), staphylococci bakteri sınıfının çoklu antibiyotik direnci kazanmış bir türüdür. MRSA, bu sınıfa dahil olan bir çok bakteri gibi enfekte olup patojen haline geldiğinde ölümcül sonuçlar doğurabilir. Bakterinin direnç geliştiremeyeceği ve böylece tedavinin uzun süre kalıcılığını koruyacağı yeni yollar aranmaya başlanmıştır. Plazma, alkol, fotodinamik terapi (FDT), çeşitli deterjan ve antiseptikler özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde araştırmacılar tarafından gerek tek başına gerekse birbirleri ile kombine edilerek bakteri suşlarına zarar vermek ya da onları tamamen yok etmek amacıyla kullanılmışlardır (6).

FDT bu konuda çalışılan yenilikçi ve umut verici bir yaklaşım olarak görülmüştür. FDT, fotosensitizan olarak bilinen ışığa duyarlı ajanların uygun dalga boyunda ışık varlığında bulunduğu konumda oluşturduğu etkiye dayanan tedavi edici bir metottur (7). Oksijen varlığında ışık kaynağından gelen enerji fotosensitizan aracılığıyla oksijen atomlarına aktarılması sonucu reaktif oksijen türleri oluşur. (8,9,10). Oluşan bu ürünler hücre içinde biyolojik ve kimyasal tepkimelere katılarak bu tepkime basamaklarında farklı ve hücre için toksik etki yaratacak ürünlerin açığa çıkmasına vesile olurlar. Böylece bakteri hücresinde apoptoz veya nekroz sonucu ölüm gerçekleşir. Ayrıca oksijen bakteri hücresinin metabolizmasında kendiliğinden bulunduğu için buna bağlı bir direnç mekanizması geçirmesi olası görülmemektedir. Etanolün tek başına dezenfektan etkisi ve fotosensitizan üzerindeki etkisi birleşerek FDT uygulamalarına katkı sağlamıştır. Etanolün, bakteri hücre duvarının geçirgenliğini artırıp fotosensitizan moleküllerinin hücre içine sızmasını sağladığı, devamında hücre içinde çözünbilme yeteneğini arttırdığı varsayılmıştır. Toplamda etanolün hücre içerisindeki fotosensitizanın çözünürlüğünü ve dolayısıyla reaktif ürün oluşturma kapasitesini arttırdığı düşünülmüştür. Bu sebeple bu çalışmada gram pozitif MRSA suşlarını yok etmek için FDT'deki fotosensitizan madde ile etanol arasında sinerjistik etki yaratılarak fotosensitizanın etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

II. YÖNTEM

A. Bakteri Suşu

Bu çalışmada gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus*'un çoklu antibiyotik direnci geliştirmiş klinik izolatları 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 10⁸ CFU/mL PBS çözeltisindeki bakteri solüsyonu eklenmiştir.

B. Işığa Duyarlı İlaç

Ce6 molekül formülü C34H36N4O6 ve moleküler ağırlığı 596,684 g/mol olan FDT'de kullanılan 2. jenerasyon klorin sınıfından bir ilaçtır. Işık etkisiyle bozulmasını engellemek için ilaç hazırlığı ve bütün diğer uygulamalar karanlıkta yapılmıştır. 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µM Ce6 konsantrasyonları bakteri üzerinde lazerli ve lazersiz ortamda incelenmiştir.

C. Optik Düzenek

Bu çalışmada ışık kaynağı olarak 655 nm dalgaboyunda görünür bölgede kırmızı ışımaya yapan diyot pompalı lazer cihazı kullanılmıştır. FDT uygulamalarında 25 J/cm² enerjide sabit tutulan ışık dozu uygulanmıştır ve bu ışık dozunun ilaç ve etanol ile birlikte bakteri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

D. Etanolün Adjuvan Etkisi

Gram pozitif bakterilerde etanol düşük konsantrasyonlarda kullanılan organik bir antiseptiktir. Genellikle tek başına kullanıldığında hücre membranındaki lipid tabakayı bozup hücre içeriğinin dışarıya sızması şeklinde sonuçlar doğurduğu düşünülür. Bu çalışmada ise 99,6% saf etanolden saf su ile seyreltilmiş 20% etanol içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Ce6 ile birlikte kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonların lazer uygulamaları ile birlikte bakteriler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

E. Deneysel Prosedür

Bu çalışmada Klorin e6 ve etanol ile FDT'nin etkisi çoklu antibiyotik direncine sahip MRSA üzerinde araştırılmıştır. Araştırmada 5 grup oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu: Klorin e6, etanol ve lazerin uygulanmadığı grup
2. Lazer grubu: Sadece lazer uygulaması yapılan grup
3. Klorin e6 grubu: Sadece Klorin e6 uygulanan grup
4. EtOH grubu: Sadece %20 etanol uygulanan grup
5. FDT+EtOH grubu: Lazer ile birlikte Klorin e6 ve etanol uygulanan grup



Şekil 1. 655-nm Lazer Cihazı ile 96 kuyucuklu plaka üzerindeki ışık uygulaması



Şekil 2. Bakteri ekimi

Uygulamalarda her grup 96'lık plakalarda 3'er örnek şeklinde çalışılmıştır. Şekil 1'deki gibi her grup için 96 kuyucuklu plaka üzerinde lazer ışığının düştüğü önceden belirlenen kuyucuklara PBS ile seyreltilmiş, 50 µL bakteri ekilmiştir. Kuyucuklarda kontrol ve sadece lazer gruplarında 50 µL PBS ile 50 µL bakteri, sadece Ce6 grubunda ise 50 µL Ce6 ve 50 µL bakteri, FDT+EtOH grubunda ise 50 µL %20'lik etanol

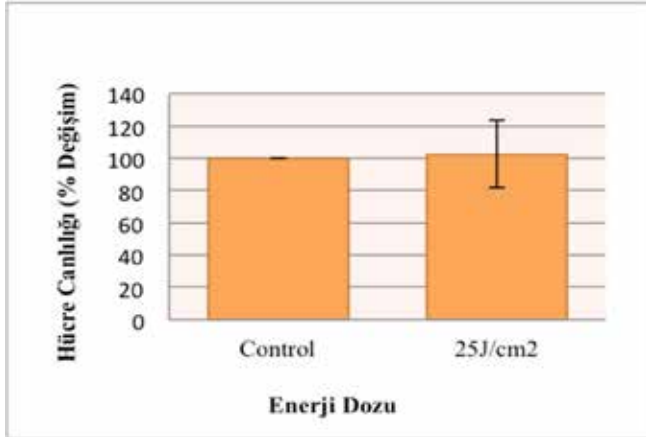
indeki Ce6 solüsyonu ve 50 µL bakteri olmak üzere toplam 100 µL solüsyon örnekleri hazırlanmıştır. Kontrol ve lazer grubunda PBS ile, FDT+EtOH ve Ce6 gruplarında ise Ce6 ile 15 dakika inkübe edilmiştir. FDT+EtOH, ve lazer gruplarında solüsyon içeren her bir kuyucuğa lazer uygulaması yapılmıştır. Uygulamalar sonucunda bütün gruplarda seri seyreltme yöntemiyle yasayan bakteri koloni sayısı saptanmıştır.

F. İstatistiksel Analiz

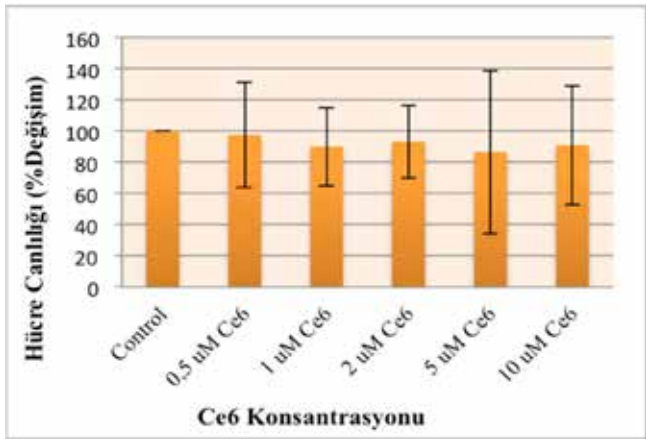
Deneyler sonucunda elde edilen veriler öncelikle tek yönlü ANOVA ile incelenmiştir. Veriler arasında farklılık olduğu görülünce her bir deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak t-test yöntemiyle incelemiştir. İstatistiksel farklılık $p \leq 0,05$ olarak belirlenmiştir.

III. SONUÇLAR

Deney gruplarından elde edilen sonuçlara bakıldığında hiçbir uygulama almayan kontrol grubu ile lazer ve ilaç grubunda yaşayan bakteri koloni sayısı benzerlik göstermiştir (Şekil 3 ve 4). Bu sonuç kontrol, lazer ve ilaç gruplarının MRSA üzerinde istatistiksel olarak anlamlı diyebileceğimiz etkisi olmadığını göstermiştir.

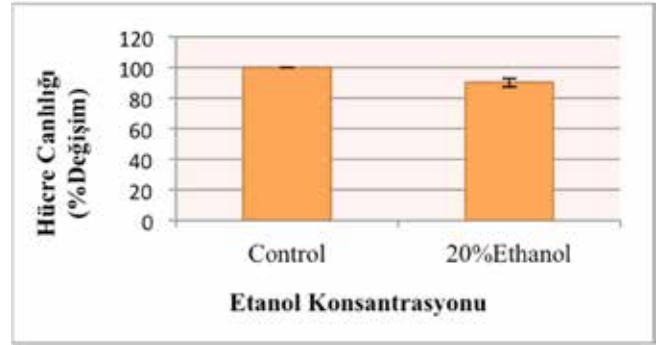


Şekil 3. 25 J/cm² 655-nm lazer ışık dozunun MRSA üzerindeki etkisi.



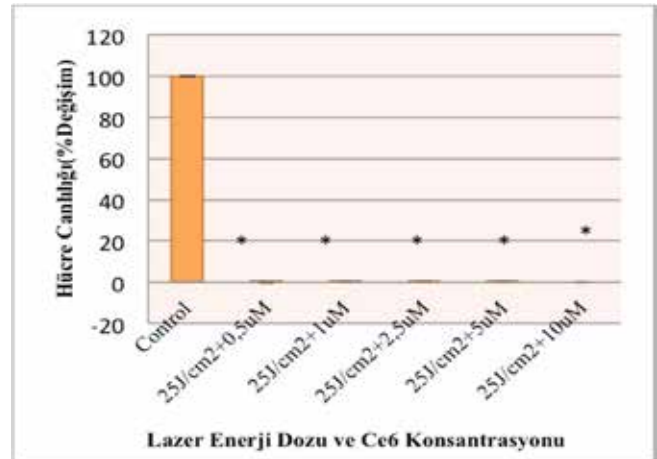
Şekil 4. Klorin e6 fotosensitizanının tek başına MRSA üzerindeki etkisi.

Alkolün tek başına antiseptik etkinliğini belirleyebilmek amacıyla sadece 20% etanol uygulanan EtOH grubunda ise, Şekilde 5'te görüldüğü gibi %10-15 oranında bakteri hücre canlılığında azalması saptanmıştır. Bu azalma da analiz metotlarıyla incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 5. 20% etanolün tek başına MRSA üzerindeki etkisi.

%20 etanolde çözdürülmüş Ce6 ile yapılan FDT uygulamalarına bakıldığında (Şekil 6) Ce6 konsantrasyonu minimum seviyeden itibaren maksimum seviyeye kadar hücre canlılığı azalma oranı bütün gruplarda %99 oranından fazla görülmüştür. Ce6 konsantrasyonu artırıldığında da yüzde hücre canlılığı azalma oranı istikrarını korumuş olup, 5 µM Ce6 konsantrasyonundan sonra %100 seviyelerine ulaşmıştır. Bu konsantrasyonlarda yaşayan canlı MRSA kolonisi görülmemiştir.



Şekil 6. %20'lik etanol içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki Ce6 solüsyonunun (0.5, 1, 2.5, 5, 10 µM) 25 J/cm² enerji dozundaki lazer ışığı ile birlikte MRSA üzerindeki etkisi. * Deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).

Bir önceki çalışmada yapılan etanolsüz FDT grupları ile etanol içeren FDT grupları karşılaştırıldığında (11), aynı



konsantrasyonlarda Ce6 seviyelerinde, etanol MRSA suşları üzerinde öldürücü etkinin artmasını sağlamıştır. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonlardaki Ce6 seviyelerinde etanol hücre canlılığı azalma miktarını arttırmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Etanol kullanılan ve etanol kullanılmayan FDT (11) gruplarında gözlenen hücre canlılığı yüzdesel azalmaları.

Hücre Canlılığı Azalması			
FDT Grubu		FDT+EtOH Grubu	
-	-	25J/cm ² +0,5 µM	%99,99
-	-	25J/cm ² +1 µM	%99,94
25J/cm ² +2,5µM	%99,88	25J/cm ² +2,5 µM	%99,96
25J/cm ² +5µM	%99,31	25J/cm ² +5 µM	%99,99
25J/cm ² +10µM	%90,60	25J/cm ² +10 µM	%100,00

IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada etanolün FDT üzerindeki adjuvan etkisi araştırılmıştır. Bir önceki çalışmamızda (11) yapılan aynı bakteri üzerindeki FDT uygulamasının sonuçlarına bakıldığında tek başına FDT'nin Ce6 ile birlikte MRSA üzerinde antibakteriyel olarak etkili bir yöntem olduğunu gözlemlemiştik. 25 J/cm²+2,5 µM Ce6 ve 50 J/cm²+2 µM Ce6 kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda maksimum antibakteriyel sonuçlara ulaştığımız (11). Fakat %99,99'lük ölümlerin daha düşük ışık dozu ve ilaç konsantrasyonlarıyla sağlanabilmesi için bu çalışmada etanolün antibakteriyel etkisini araştırdık.

Etanolün adjuvan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada Ce6 ve ışık seviyeleri daha düşük seviyelere çekilmiştir. Böylece FDT uygulaması sırasında ilaç konsantrasyonundan kaynaklı sağlıklı hücrelerin zarar görmeye çalışılmıştır.

Etanolün tek başına uygulandığı gruplardan elde edilen verilere bakıldığında ise etanolün tek başına gösterdiği antibakteriyel etki yeterli görülmemiştir. Bu sebepten ötürü etanol adjuvan etken olarak FDT'nin yanında kullanılmıştır. Ce6 fotosensitizanın etkinliğini artırıp, hücrede oluşan reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmalarını tetiklediği düşünülmektedir.

FDT+EtOH grubunda, ışık enerji seviyesi 25 J/cm² olarak sabit tutulmuş Ce6 konsantrasyonu 0.5 µM dan 10 µM Ce6 arasında değiştirilerek araştırılmıştır. Bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek 99,9% ve üzeri oranda hücre canlılık oranında azalma elde edilmiştir.

Özet olarak, etanolün adjuvan etkisi FDT'de ışık ve fotosensitizan seviyesini gözle görülür oranlarda düşürmüştür. Bu sonuç ileriye dönük *in vivo* ya da klinik çalışmalarda ışık

ve fotosensitizan seviyesini sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek şekilde düzenlenmesi açısından yararlı olacaktır.

BİLGİLENDİRME

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 Dr. Ayşe Akbıyık'a teşekkür ederiz.

V. KAYNAKÇA

- 1-Wenzel, R. P., and T. M. Perl. "The significance of nasal carriage of Staphylococcus aureus and the incidence of postoperative wound infection." *Journal of Hospital Infection* 31.1 (1995): 13-24.
- 2-Araújo, Thalita Santos Dantas, et al. "Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 21 (2018): 219-223.
- 3-Kucera, J., et al. "Multispecies biofilm in an artificial wound bed—a novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings." *Journal of microbiological methods* 103 (2014): 18-24.
- 4- Fu, Xiu-jun, Yong Fang, and Min Yao. "Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection." *BioMed research international* 2013 (2013).
- 5- Benveniste, R. A. O. U. L., and Julian Davies. "Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria." *Annual review of biochemistry* 42.1 (1973): 471-506.
- 6-Kantarcioglu, A. Serda, and Ayhan YÜCEL. "Çeşitli antiseptik ve dezenfektanların metisiline dirençli ve metisiline duyarlı *staphylococcus aureus* kokenlerine etkinliğinin araştırılması." *ANKEM Derg* 16.4 (2002): 434-440.
- 7- Mai, Bingjie, et al. "The antibacterial effect of sinoporphyrin sodium photodynamic therapy on Staphylococcus aureus planktonic and biofilm cultures." *Lasers in surgery and medicine* 48.4 (2016): 400-408.
- 8- Liu, Yao, et al. "Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections." *J Clin Transl Res* 1.3 (2015): 140-167.
- 9- Huang, Liyi, et al. "Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria." *Lasers in surgery and medicine* 44.6 (2012): 490-499.
- 10- van Golen, Rowan F., Thomas M. van Gulik, and Michal Heger. "Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury." *Free Radical Biology and Medicine* 52.8 (2012).
- 11- Bakay, Emel, Aziz Kolkiran, and Nermin Topaloğlu. "The effect of antibacterial photodynamic therapy with chlorin e6 on multidrug-resistant strain of Staphylococcus aureus." *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 2017. IEEE, 2017.*