



Farklı Konsantrasyonlardaki Mezoporlu Silika Nanoparçacıklarının Antibakteriyel Fotodinamik Terapiye Etkisi

The Effect of Different Concentrations of Mesoporous Silica Nanoparticles in Antibacterial Photodynamic Therapy

Emel BAKAY₁, Didem ŞEN KARAMAN₂
Biyomedikal Teknolojiler ABD₁, Biyomedikal
Mühendisliği Bölümü₂
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
{emel.bakay, [didem.sen.karaman](mailto:didem.sen.karaman@ikc.edu.tr)}@ikc.edu.tr₁,
2

Nermin TOPALOĞLU₃
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü₃
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
nermin.topaloglu@ikc.edu.tr₃

Özetçe—Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ciddi bir patojen olup çok sık rastlanan bir bakteri türüdür. Çeşitli antibiyotiklere hızla direnç kazanabildiği için sebep olduğu enfeksiyonları tedavi edebilmek amacıyla farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Fotodinamik terapi (FDT) ışık ve ışığa duyarlı ajanlar yardımıyla kalıcı biçimde antimikrobiyal etki gösterebilen bir tedavi çeşididir. Işık uygulaması sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla bakteri hücrelerine kalıcı hasarlar vererek yok edilmesini sağlar. Bu çalışmada nanoparçacıklardan yararlanılarak MRSA üzerinde FDT uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Pozitif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıkları FDT uygulamalarına katılarak bakteri suşları üzerindeki etkisi incelenmiştir ve farklı konsantrasyonlarda uygulanan nanoparçacıkların FDT üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda nanoparçacık kullanımının FDT uygulamalarında sağkalım oranlarını azalttığı ve kullanılan FDT parametrelerinin minimum seviyelere çekilmesinde yardımcı olabileceği görülmüştür. Ayrıca 25-200 mg/ml aralığında kullanılan artan nanoparçacık konsantrasyonlarının FDT uygulamasında farklı etkilere sebep olmadığı anlaşılmıştır. Böylece FDT'nin antibakteriyel etkinliği bu nanoparçacıklar yardımıyla daha da artırılarak *in vivo* ve klinik uygulamalarda umut vaat ettiği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler — MRSA; antimikrobiyal fotodinamik terapi; nanoparçacık

Abstract— Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a common bacterial species in the human body. Because of the rapid development of the resistance mechanism to various antibiotics, different treatment methods are needed. Photodynamic therapy (PDT) is a kind of treatment that can

exhibit a permanent antimicrobial effect with the help of light and light sensitive agents. As a result of light application, reactive oxygen species are formed and used to destroy bacteria cells by giving permanent damage. In this study, PDT applications were performed on MRSA by using mesoporous silica nanoparticles. The effect of positively charged mesoporous silica nanoparticles on bacterial strains was assessed simultaneously with PDT applications. According to the results, it has been seen that the use of nanoparticles reduces the survival rates in PDT applications and help to reduce the PDT parameters to minimum levels. In addition, increasing nanoparticle concentration in the range of 25-200 mg/ml did not change the survival rates after PDT applications. Thus, the antibacterial efficacy of PDT was further enhanced by these nanoparticles and showed promise for *in vivo* and clinical applications.

Keywords —MRSA; antimicrobial photodynamic therapy; nanoparticle

I. GİRİŞ

Staphylococcus aureus (MRSA) özellikle hastane ortamında ve çevresinde sistemik enfeksiyonlar yaratabilen bir patojen türüdür [1]. Sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde diğer bir çok enfeksiyon tedavisinde olduğu gibi geleneksel antibiyotikler kullanılmaktadır. Fakat antibiyotiklerin bu şekilde yaygın olarak kullanılması bakterilerin direnç kazanmasına sebep olmaktadır. Bakteri hücresi çeşitli mutasyonlar geçirerek yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin hücre içerisine alınma yollarında farklılıklar yaratır. Böylece antibiyotiğin hücre içine alınması ve dolayısıyla enfeksiyon tedavisi engellenmektedir [2].



MRSA'nın sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde ise yaygın olarak kullanılan metisilin antibiyotığı, bakteri hücrelerinin direnç kazanmasıyla işe yaramaz hale gelmiştir [3]. Bu sebeple antibiyotiklerin yanı sıra alternatif olabilecek ve direnç geliştirilemeyecek tedavi metotlarına olan ilgi artmaktadır. Fotodinamik terapi (FDT) bu amaçla kullanılabilir, hali hazırda klinikte bir çok farklı işlemde kullanılan alternatif bir yöntemdir.

FDT, fotosensitizan olarak adlandırılan ışığa duyarlı ajanların soğurduğu belirli dalgaboyuna sahip ışık uygulaması sonucunda oksijen atomları üzerinden yürüten doğal bir etki mekanizmasına sahiptir. Işıktan gelen enerji fotosensitizanlar tarafından soğurduktan sonra canlı mikroçevresinde yaygın olarak bulunan oksijen atomlarına aktarılır. Burada iki farklı tepkime türü ile hücrede ölüm gözlenir [4]. Tip 1 mekanizmasında fotosensitizan ve farklı substratlar arasında elektron değişimi ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu tetiklenir. Tip 2 mekanizmasında ise yüksek enerjili fotosensitizanın direkt olarak moleküler oksijenle tepkimeye girmesiyle reaktif singlet oksijen türlerinin oluşması görülür. Bu iki tepkime türü sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri bakteri hücrelerinin yapı taşlarında hasarlara sebep olur. Oksijen bağımlı bu hasarlar hücrede kendiliğinden gerçekleştiği için hiç bir direnç geliştirilemeyecek şekilde hücre ölümü gerçekleşir. Bakteri hücrelerinin apoptozu ya da nekrozu gibi farklı ölüm mekanizmalarıyla patojenlerin, dolayısıyla enfeksiyonun ortadan kaldırılması sağlanır [5].

Son zamanlarda antimikrobiyal amaçlı FDT çalışmalarında, fotosensitizanın bakteri hücrelerine penetrasyonunu, seçiciliğini ve etkinliğini arttırmak için nanoteknoloji alanından yararlanılmaktadır. Çeşitli nanoparçacıklara farklı fotosensitizan yüklenmesi ya da bağlanması şeklinde fotosensitizanın istenilen bölgede etki gösterme ve FDT mekanizmasının daha etkin olma olasılığı arttırılmaktadır. Fotosensitizanların negatif özellikleri nanoparçacık kullanımı ile bastırılarak avantaj yaratılmaktadır. Mezoporlu silika nanoparçacıkları bu anlamda mükemmel biyoyoumluluğu, yüzey/hacim oranının yüksek olması ve herhangi bir elementle kolaylıkla etkileştirilebildiği için FDT çalışmalarında oldukça yaygın kullanılmaya başlanmıştır [6].

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki pozitif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıklarının antibakteriyel FDT uygulaması üzerindeki etkinliği metisilin dirençli *MRSA* suşları kullanılarak araştırılmıştır. Fotosensitizan olarak klorin e6 kullanılmış olup pozitif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıkları ile uygun sinerjik bir etki yaratıp yaratmayacağı araştırılmıştır. Bunun için farklı konsantrasyonlarda pozitif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıklarının (MSN-PEI) etkisi, antibakteriyel FDT etkinliği önceki çalışmalarda belirlenen parametrelerle birlikte araştırılmıştır. Sonuçlar ışığında görülen antimikrobiyel FDT etkisi arttırılarak kullanılan ışık ve fotosensitizan konsantrasyonları minimum seviyelere çekilebilmiştir. Ayrıca 25-200 mg/ml konsantrasyon aralığında uygulanan

nanoparçacığın değişen konsantrasyonlarda FDT uygulaması üzerinde hücre sağsaklımı açısından kayda değer bir etkiye sebep olmadığı anlaşılmıştır.

II. YÖNTEM

A. Bakteri Suşu

Bu çalışmada gram pozitif bakteri olan *S. aureus*'un metisilin dirençli 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 getirilmiştir. 96 kuyucuklu plakadaki belirli kuyucuklara bakteri solüsyonu ekilmiştir.

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 klorin sınıfından bir ilaçtır. Işık etkisiyle bozulmasını engellemek için ilaç hazırlığı ve diğer uygulamalar karanlıkta yapılmıştır. Bu çalışmada 0,5 μM Ce6 konsantrasyonunun FDT uygulaması içinde farklı konsantrasyonlardaki mezoporlu silika nanoparçacıkları ile birlikte sinerjistik etkisi incelenmiştir.

C. Pozitif Yüklü Mezoporlu Silika Nanoparçacığı

Yüzeyi pozitif yüklenmiş mezoporlu silika nanoparçacıkları (MSN-PEI) 25, 50, 100, 200 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında hazırlanıp FDT uygulamalarında bakteri solüsyonu ile 4 saate inkübe edilmiştir. Lazer ve fotosensitizan uygulaması bu 4 saat inkübasyondan sonra gerçekleştirilmiştir.

D. Optik Düzenek

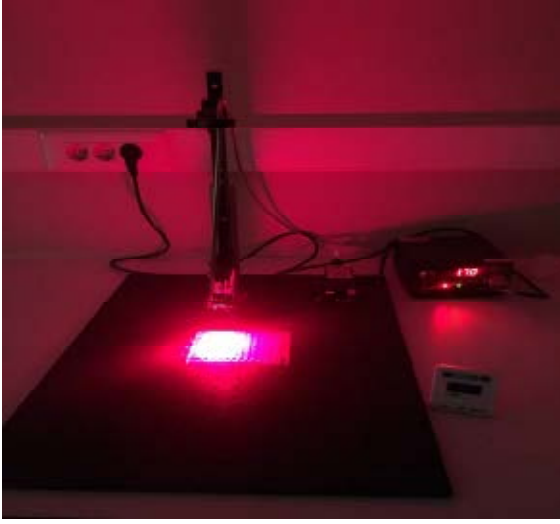
Bu çalışmada ışık kaynağı olarak 655 nm dalgaboyunda görünür bölgede kırmızı ışığa yapan diyot pompalı lazer cihazı (PS4 III.LED; Changchen New Industries Optoelectronics Tech. Ltd.) kullanılmıştır. FDT uygulamalarında 50 J/cm² ışık dozu uygulanmıştır ve bu ışık dozunun ilaç ve nanoparçacık ile birlikte bakteri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

E. Deneysel Prosedür

Bu çalışmada Klorin e6 ve farklı konsantrasyonlardaki pozitif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıklarının antibakteriyel FDT etkisi *MRSA* üzerinde araştırılmıştır. Araştırmada 5 grup oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu: Klorin e6, nanoparçacık ve ışık uygulanmayan grup
2. MSN-PEI grubu: Sadece nanoparçacık uygulanan grup
3. Klorin e6+MSN-PEI grubu: Nanoparçacık ve klorin e6 uygulanan grup

4. FDT Grubu grubu: Klorin e6 ve ışığın birlikte uygulandığı grup
5. FDT+MSN-PEI grubu: Lazer ile birlikte Klorin e6 ve nanoparçacık uygulanan grup



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

Uygulamalarda her grup için 96 kuyucuklu 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 grubunda 50 µL PBS ile 50 µL bakteri, MSN-PEI grubunda 50 µL bakteri, 25 µL nanoparçacık ve 25 µL PBS, Ce6+MSN-PEI grubunda 50 µL bakteri, 25 µL klorin e6 ve 25 µL nanoparçacık, FDT grubunda, 50 µL bakteri, 25 µL klorin e6 ve 25 µL PBS, FDT+MSN-PEI grubunda ise 50 µL bakteri, 25 µL klorin e6 ve 25 µL nanoparçacık olmak üzere toplamda 100 µL solüsyon örnekleri hazırlanmıştır. Bütün gruplar 4 saat inkübe edildikten sonra klorin e6 içeren gruplar ilaç ile birlikte 15 dakika daha inkübe edilip ışık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar sonucunda bütün gruplarda seri seyreltme yöntemiyle yaşayan bakteri koloni sayısı saptanmıştır.

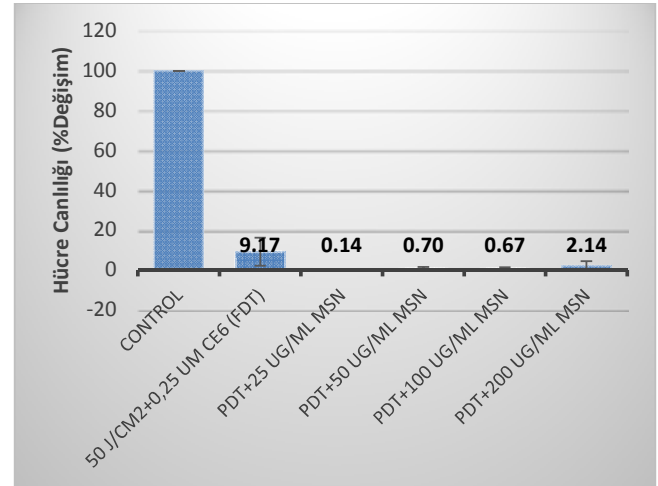
F. İstatiksel Analiz

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

III. SONUÇLAR

Bu çalışmada 25, 50, 100 ve 200 mg/ml konsantrasyonlarındaki pozitif yüklü mezoporlu silika

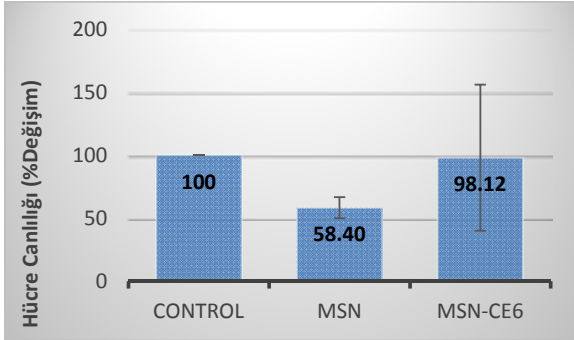
nanoparçacıklarının klorin e6 ve kırmızı ışığın birlikte kullanıldığı antibakteriyel FDT uygulaması üzerindeki etkinliği metisilin dirençli MRSA suşları kullanılarak araştırılmıştır. Bakay ve ekibi önceki çalışmalarında aynı fotosensitizan ve ışık kaynağı ile gerçekleştirdiği FDT uygulamasında 50 J/cm² enerji dozu ve 5 µM Ce6 konsantrasyonu kullanarak MRSA suşlarını %99,99'lari aşacak oranda yok edebilmiştir. Tek başına 50 J/cm² lazer enerji dozunun bakterilere bir zarar vermediği gösterilmiştir. Bu enerji dozuyla birlikte 0,25 µM Ce6 kullanıldığında %90 hücre ölümü gerçekleşmekte, fakat bu oran enfeksiyon tedavisinde bakteri ölümü açısından düşünüldüğünde yetersiz olduğu bilinmektedir [7]. Bir miktar ölüme sebep olup yine de yetersiz kalan bu parametreler kullanılarak mezoporlu silika nanoparçacıkların FDT'nin etkinliğini arttırmada bir etkisinin olup olmadığı, nanoparçacık konsantrasyonu değıştikçe nasıl bir etkiye sebep olduğu araştırılmıştır. Şekil 2'de görüldüğü üzere 50 J/cm² enerji dozu ile 0,25 µM Ce6 kullanılan FDT uygulamasına 25, 50, 100 ve 200 mg/ml mezoporlu silika nanoparçacığı eklendiğinde sırasıyla %99,86, %99,30, %99,33, %97,86 oranlarında bakteri ölümü gözlemlenmiştir. Gruplar arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte nanoparçacık uygulanmayan FDT grubu ile karşılaştırıldığında en az %7, en çok %9 oranında hücre sağkalımında azalma elde edilmiştir. Genel olarak nanoparçacık konsantrasyonu arttırıldıkça FDT içindeki etkisinde çok az da olsa hücre ölümü açısından etkisinde azalma görülmüştür. En yüksek hücre ölümü uygulanan en düşük konsantrasyon olan 25 mg/ml ile elde edilmiştir.



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlardaki mezoporlu silika nanoparçacığının antibakteriyel FDT mekanizmasına etkisi. Enerji dozu: 50 J/cm², Ce6 konsantrasyonu: 0,25 µM, Nanoparçacık konsantrasyonları: 25, 50, 100 ve 200 mg/ml.

Kullanılan nanoparçacığının FDT mekanizmasından bağımsız olarak herhangi bir toksisitesinin olup olmadığı araştırma içinde kullanılan en yüksek doz olan 200 mg/ml'nin Ce6 bulunan ve bulunmayan ortamda MRSA üzerindeki araştırılmıştır. Şekil 3'te görüldüğü üzere nanoparçacık tek

başına yaklaşık %60'lık bir ölüme sebep olmuştur. Ce6 bulunan ortamda ise sebep olduğu ölüm oranı yaklaşık %2 olmuştur ve ışık olmayan ortamda bu iki molekülün herhangi bir ölüme sebep olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 3. Mezoporlu silika nanoparçacığının Ce6 bulunan ve bulunmayan ortamda MRSA üzerindeki toksisitesi. Nanoparçacık konsantrasyonu: 200 mg/ml, Ce6 konsantrasyonu: 0,25 µM.

IV. TARTIŞMA

Antibakteriyel FDT uygulamalarında genel amaç minimum seviyede ışık dozu ve fotosensitizan konsantrasyonu kullanarak patojenler üzerinde maksimum ölüm oranını elde etmektir. Böylece uygulanan parametrelerin tek başına herhangi bir toksisitesi olmayacak ve komşu sağlıklı dokuda oluşturabileceği tahribat minimuma düşürülebilecektir. Bu sebeple yan etkileri minimuma düşürülebilmek ve patojenler üzerindeki etkiyi en yükseğe çıkarabilmek amacıyla FDT'yi destekleyecek yeni stratejiler araştırılmaktadır. Çeşitli nanoparçacıkların FDT mekanizmasına dahil edilmesi bu yeni stratejilerden biridir. Nanoparçacık kullanımı ile birlikte genel olarak amaç fotosensitizanın bakteri hücresine penetrasyonunu sağlamak, seçiciliğini ve etkinliğini arttırmaktır. Fotosensitizanların negatif özellikleri nanoparçacık kullanımı ile bastırılarak avantaj sağlanmaya çalışılmaktadır [6]. Bu çalışmada da benzer amaçlarla mezoporlu silika nanoparçacıkları kullanılmıştır. Klorin e6 ve 655-nm kırmızı ışık ile birlikte uygulanan antibakteriyel FDT uygulaması MRSA patojenlerini yok etmede etkin bir yöntem olduğu, 50 J/cm² enerji dozu ve 5 µM fotosensitizan konsantrasyonu ile birlikte başarılı olduğu önceki çalışmamızda gösterilmiştir [7]. Bu çalışmada mezoporlu nanoparçacık kullanımının amacı fotosensitizan konsantrasyonunu minimum seviyelere düşürüp, farklı nanoparçacık konsantrasyonunun mekanizmadaki etkisini göstermektir.

Tek başına nanoparçacık uygulanan grupta mezoporlu silika nanoparçacığı MRSA üzerinde ciddi bir antimikrobiyel etki yaratmamıştır. Etkisi tek başına lazer ve fotosensitizanın yarattığı etkiden daha fazla olmuştur. Tek başına lazer ve fotosensitizan kontrol grubuyla benzer sonuçlar vermiş olmasına rağmen [7], uygulanan en yüksek konsantrasyondaki nanoparçacık yaklaşık %40'lık bir bakteri ölümüne sebep olmuştur. Bu durum mezoporlu silika nanoparçacığının da bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu, FDT mekanizması ile birleştirildiğinde sinerjistik bir etki yaratacağını

göstermektedir. Ayrıca 25-200 mg/ml konsantrasyon aralığında araştırılan mezoporlu silika nanoparçacıkları FDT mekanizmasında benzer etkiye sebep olmuştur. FDT'nin etkisini yaklaşık %10 kadar arttırmış olup gruplar içinde farklılık göstermemiştir. Beklenmeyen bir şekilde en düşük konsantrasyondaki nanoparçacık maksimum ölümü tetiklemiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi kullanılan en düşük doz olan 25 mg/mL nanoparçacık konsantrasyonundan itibaren ölüm oranları %99 seviyelerini geçmiştir. 25 mg/mL'nin kullanıldığı grupta beklenenin üzerinde ölüm oranı elde edilmiş olup, diğer konsantrasyonlar da benzer etkiye sebep olduğu için nanoparçacık konsantrasyonundan bağımsız olarak sadece kullanımının yeterli olacağı anlaşılmıştır.

Bu çalışmada nanoparçacığın sadece eş zamanlı olarak uygulamaya katılması, ilacın hiç bir şekilde nanoparçacığa yüklenmesi ya da bağlanmasına gerek duyulmadan etki edebilmesi büyük avantaj sağlamıştır. Çünkü bir çok çalışmada ilacı nanoparçacığa yükleme gibi işlemlerde nanoparçacık yapısının bozulması ya da ilacın erken salınımı gibi olumsuzluklarla karşılaşmaktadır.

Ayrıca ölüm oranlarının nanoparçacık kullanımıyla birlikte %99 seviyelerine çekilmesi antimikrobiyel olarak başarılı sayılabilecek sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. FDT çalışmalarında *in vivo* kısmına geçildiğinde dozların *in vitro*'da görüldüğünden çok daha fazla konsantrasyonlara çıkabildiği bilinmektedir. Ayrıca klinikte ilaç oranların minimum seviyelerde kullanılarak hasta güne ışığına maruz kaldığında görülen yan etkinin minimum seviyelere çekilmesi açısından önemlidir. Bu sebeplerden ötürü bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile MRSA ile yapılacak olan herhangi bir *in vivo* ya da klinik FDT-nanoparçacık uygulamasına ışık tutabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Saïd-Salim, Battolili, Barun Mathema, and Barry N. Kreiswirth. "Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging pathogen." *Infection Control & Hospital Epidemiology* 24.6, 451-455, 2003.
- [2] Fu, Xiu-jun, Yong Fang, and Min Yao. "Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection." *BioMed research international*, 2013.
- [3] Stapleton, Paul D., and Peter W. Taylor. "Methicillin resistance in Staphylococcus aureus: mechanisms and modulation." *Science progress* 85.1, 57-72, 2002.
- [4] Liu, Yao, et al. "Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections." *J Clin Transl Res* 1.3, 140-167, 2015.
- [5] 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, 490-499, 2012.
- [6] Lucky, Sasidharan Swarnalatha, Khee Chee Soo, and Yong Zhang. "Nanoparticles in photodynamic therapy." *Chemical reviews* 115.4, 1990-2042, 2015.
- [7] 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)*, IEEE, 2017.