

P. Aeruginosa Bakterisinin Vitamin B Kompleksi ve Kırmızı Lazer Kullanılarak İnaktive Edilmesi

Inactivation Of P. Aeruginosa Bacteria Using Vitamin B Complex and Red Laser

Asiye GÖK YURTTAŞ^{1,2*} , Kamil ÇINAR³ 

¹ İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Fakültesi, Biyosensör ve Biyorobotik Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

³ Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Katıhal Fiziği Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye



ÖZET

Son yıllarda anti-bakteriyel direnç olgusu, bakterilerin neden olduğu hastalıklarla mücadelede daha fazla sorun haline gelmiştir. Biz bu çalışmayla, açık yara ve yanıkların fırsatçı patojeni olan Pseudomonas aeruginosayı daha etkili bir yöntemle inaktive etmeyi ve fotodinamik inaktivasyon(PDI) gelişimine katkıda bulunmayı hedefledik. Pseudomonas aeruginosa bakterisini, vitamin B kompleksi ve lazer ile inaktive olduğunu spektrofotometrik ölçümler ve antimikrobiyal madde etkinliği analiz yöntemleriyle gösterdik. Ayrıca PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisi hem kalitatif hem de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa suşları karşılaştırılarak ölüm oranları belirlendi. Koloni oluşturma birimi oranlarında Escherichia coli bakteri suşlarının karanlık ve ışık deneyinde vitamin B kompleksinin 0,25 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında % 20'lik bir ölüm oranı görülmüştür. Pseudomonas aeruginosa bakteri suşlarının karanlık deneyinde vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında çok az bir ölüm oranı görülürken lazer maruziyet sonrası ölüm oranları sırasıyla % 60 ve % 50 çıktığı görülmüştür. Bu ölüm oranlarını doğrulama amaçlı akış sitometresi canlılık deneyleri yapılmış ve çıkan sonuçlar birbiriyle paralellik göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında; kırmızı lazer diyotun, vitamin B kompleksi ile birlikte Pseudomonas aeruginosa bakterisinin inaktivasyonu için uygun bir aday olduğunu öngörmekteyiz. Yaptığımız bu çalışma, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için hastane, tıp ve mikrobiyoloji alanlarında yapılacak alternatif tedavi yöntemlerine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik inaktivasyon, antibiyotik direnç, hastane enfeksiyonları, yara patojen bakterileri, lazer

Alınış / Received: 29.06.2022 Kabul / Accepted: 07.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

In recent years, the phenomenon of anti-bacterial resistance has become more of a problem in combating diseases caused by bacteria. With this study, we aimed to inactivate *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen of open wounds and burns, with a more effective method and to contribute to the development of photodynamic inactivation (PDI). We have shown that *Pseudomonas aeruginosa* bacteria are inactivated by vitamin B complex and laser with verifications of both spectrophotometric measurements and antimicrobial agent activity analysis. Moreover, the effect of PDI on bacterial growth was evaluated both qualitatively and quantitatively. Mortality rates were determined by comparing *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. In the dark and light experiment of *Escherichia coli* bacterial strains at colony forming unit rates, a mortality rate of 20% was observed at 0.25 mg/mL and 0.125 mg/mL concentrations of vitamin B complex. In the dark experiment of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains, a very low mortality rate was observed at 0.5 mg/mL and 0.125 mg/mL concentrations of vitamin B complex, while mortality rates after laser exposure were 60% and 50%, respectively. Flow cytometer viability experiments were performed to confirm these mortality rates and the results exhibited consistency with each other. In the light of this study; We predict that the red laser diode, together with the vitamin B complex, is a suitable candidate for the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. This study will shed light on alternative treatment methods for the treatment of bacterial infections in the fields of hospital, medicine, and microbiology.

Keywords: Photodynamic inactivation, antibiotic resistance, nosocomial infections, wound pathogenic bacteria, laser



1. Giriş

Mikroorganizmaların fotodinamik inaktivasyon (PDI) kavramı 19. Yüzyılın başlarında denemeler sonucu ortaya çıkmış ve güçlü bir şekilde temeli atılmıştır. Fotodinamik inaktivasyon (PDI); *Paramecium spp.* ışığa duyarlı eksojen boyalar (akridin) varlığında ışıkla inaktivasyonunun keşfinden sonra asıl kesin tanımı oluşmuştur [1]. Çoğu mikroorganizma güneş ışınlarına (UVR) karşı duyarlıdır, buna virüsler, algler ve mantarlar da dâhildir [2]. *Saprofit Mycoplasma* türü bakterilerin yapısal zincirleri, görünür ışık, toluidin boyası ve singlet oksijen üçlüsü ile hızlı bir yıkıma uğradığı bildirilmiştir [3]. Koliform bakterileri metilen mavisi ve rose bengal varlığında 1 saat güneş ışığının etkisiyle su ve atık sularda tamamen inaktive olmaktadır, sonrasında eklenen bir boya olan bentonitin absorplamasıyla ortamdan alınır [4]. Teknik eksojenik fotosensitizer boyalar, havadaki oksijen ve güneş ışığı kullanımına dayanır ve bu sayede mısır sulama suyunun, işlenmiş atık suların vb. tekrar kullanılması gibi avantajlara sahiptir [5, 6].

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonu kontrol etmek, tedavi etmek veya önlemek için kullanılır, ancak son yıllarda anti-bakteriyel direnç olgusu, bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklarla mücadelede daha fazla sorun haline gelmektedir [7]. Ortaya çıkan bu halk sağlığı sorununu sınırlamak için, mevcut antibiyotik tedavisinden daha etkili olan toksik olmayan bir tedavi geliştirmek önemlidir [8, 9]. Bu etkili yöntemlerden biri, bakteriyel inaktivasyon için Fotodinamik Terapi (PDT) veya yaygın olarak kullanılan terim Fotodinamik İnaktivasyon (PDI)'dir [10,11]. Ek olarak, PDI'nin çoklu dirençli bakterileri etkisiz hale getirmek için hızlı ve etkili bir yaklaşım sergilediği bildirilmiştir. In vitro çalışmalar, inkübasyon ve ışınlama sırasında saniyeler içinde $6 - \log_{10}^6$ CFU'ya kadar bakteriyel azalma olasılığını göstermiştir [12]. PDI ile bakteri inaktivasyonu, ışığa duyarlı materyali fotosensitizer (PS) ve görünür ultraviyole ışığın yanı sıra singlet oksijen (1O_2) ile ışınlama sırasında bakteri hücresinde fototoksik hasara sebebiyet vererek kullanan bir tedavidir [13, 14]. Singlet oksijen, PS temel durumunun uyarılmasına

yol açan belirli bir dalga boyuna (görünür veya UV ışığı) sahip uygun ışıkla ışınlandığında üretilebilir [15].

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), kültürlerinde vitamin B kompleksi ve 660 nm dalgaboyunda kırmızı lazer ile PDI'nin etkinliğinin araştırılması yapılmıştır. *P.aeruginosa* hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olan ve hastane kaynaklı enfeksiyonların ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir [16]. *P. aeruginosa* özellikle, idrar yolları, solunum, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojenidir. Ayrıca *P. aeruginosa* su kalitesinin kötü olduğu kirli küvet ve jakuziler kullanıldığında dermatite sebep olabilmektedir [17, 18].

Bu makalenin amacı, biyolojik deneylerde alternatif ışık kaynaklarından biri olan 660 nm dalgaboyunda lazer ışığı kullanılarak ve bunun vitamin B kompleksi'nin fotodinamik inaktivasyonunu üzerindeki etkisini araştırarak PDI gelişimine katkıda bulunmaktır. Ayrıca toksik olmayan ve kolay ulaşılabilir bir fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi seçilmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların ana sebeplerinden olan *P. aeruginosa* bakterisinin daha etkin bir yöntemle inaktive edilmesi hedeflenmektedir.

2. Materyal ve Metot

Fotosensitizer ve Işık Kaynağı

Fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi (B1:B6:B12), (Cas no:Sigma V2876 68-19-9), ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 660 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup yaklaşık Gaussian hüzmeye profilindedir. Lazerin ışın profili Gaussian ışın profilinin kuyrukları, numuneler üzerindeki maruz kalma acıcılığına ihmal edilebilir katkı nedeniyle hesaplamamızda hariç tutulmuştur ve lazer çıkışı uygulama alanına 5 mW'lık ışık gücü aktarmaktadır. Dozlama süresi olan 30 dakikada 45 J/cm² miktarında ışık enerjisi ilgili örnek yüzeyine aktarılmaktadır.

Bakteriyel Suşlar ve Kültür Koşulları

Deneylerde *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) bakterileri kullanıldı. Bakteriler Luria-Bertani (LB) agarda, stok kültür plakalarında -4°C'de buzdolabında saklandı. Deneylerden önce mikroorganizmalar, 37°C'de 15 saat boyunca LB sıvı besiyerinde üretildi, daha sonra santrifüjleme ile toplandı ve 1x10⁸ CFU/mL stok konsantrasyonunda % 0,85 salin içinde süspanse edildi.

Spektrofotometrik % T Ölçümleri

Tüm deneyler iki grup halinde gerçekleştirilmiştir: bir grup ışığa maruz bırakılmış ve diğeri karanlıkta tutulmuştur [19]. Biri 400 µl inokulum ve 100 µl steril salin (pozitif kontrol) karıştırılarak, diğeri farklı konsantrasyonlarda 100 µl vitamin B kompleks ve steril 400 µl LB besiyeri (negatif kontrol) karıştırılarak iki farklı kontrol grubu hazırlanmıştır. Test grupları, 0,125 ila 1 mg/mL arasında değişen son konsantrasyonlar vererek, 24-kuyulu (2 cm çapında) steril polistiren plakalarda kalibre edilmiş 400 µL inokulaya farklı konsantrasyonlarda 100 µL vitamin B kompleks solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. Işık kaynakları numuneleri içeren kuyucukların üzerine dikey olarak yerleştirildi ve plakalar aydınlatılmıştır (her kuyu diyot lazer ışık ile muamele edildi), 25°C'de 30 dakika çalkalanmıştır. Aydınlatmadan sonra tüm numuneler tüplere aktarılmıştır, LB besiyeri ile 2 ml'lik son hacime seyreltildi ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Büyüme oranı bir spektrofotometre ile nicelendirilmiştir ve 0., 2. ve 4. saatte 400 nm-1000 nm dalgaboyu aralığında geçirgenlik yüzdeleri (% T) ölçülmüştür [19]. *E. coli* ve *P. aeruginosa* örneklerinin 400 nm-1000 nm arası ışık tayfı geçirgenlik değerlerindeki değişimlerin yüzdesel farkı olan geçirgenlik değişimleri (δ %) hesaplanmıştır. Geçirgenlik değişim (δ %) grafikleri örneklerdeki ışık tayfındaki geçirgenliğin dalgaboyuna bağlı olarak nasıl değiştiğini nicel olarak göstermektedir.

PDI'nin Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi

PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisini belirlemek için belirli konsantrasyonlarda vitamin B kompleksi ve 30 dakika diyot lazere maruz bırakılarak yapılmıştır. Işığa maruz bırakıldıktan hemen sonra hücreler toplandı ve santrifüjleme yoluyla salinle yıkandı ve salinle 10, 100, 1000 ve 10000 kez

seyreltildi ve her seyreltmeden 100 ul alınarak daha sonra LB agar içine yayma plak yöntemi ile kaplandı, 16-22 saat 37°C'de inkübe edildi ve tek koloniler sayılarak CFU'lar hesaplandı [7]. Tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

Antimikrobiyal Madde Etkinliğinin Test Edilmesi (Agar Disk Difüzyon Yöntemi)

Test mikroorganizmalarından *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşları daha önceden hazırlanan taze sıvı kültürü (18-24 saatlik) yayma plak yöntemiyle yapıldı. 5-10 dk beklendikten sonra diskler yerleştirildi. 1-1,5 cm çapındaki kağıt diskler (filtre kağıtlarından hazırlanmış) kapalı kapta otoklavda sterilize edildi. Steril kağıt disklerden bir tanesi ise steril suya daldırıldı ve kontrol olarak agarlı besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Bir tanesi de antibakteriyel bir ilaç kullanılarak pozitif kontrol olarak yerleştirildi. Diğer disklere de vitamin B kompleksinin 0,125 mg/mL konsantrasyonu emdirilerek yerleştirildi. Petri kutusu düz şekilde inkübatöre yerleştirildi ve test mikroorganizmasına uygun koşullarda inkübasyonu (örneğin 37 °C'de 24 saat) sağlandı. Şekil 5 da yapılan deneyde inhibisyon zonları inkübasyonun 24-48. saatlerinde ayrı ayrı incelemeye alınarak değerlendirildi ve zon oluşup oluşmadığına bakıldı [20,21].

Akış Sitometrisinde Canlılık Tayini

Vitamin B kompleksinin+lazer ışığının, *E. coli* ve *P. Aeruginosa* mikroorganizmalarının canlılığına etkileri Propidium iyodür (PI) ile boyanmaları ile belirlendi [22-24]. Mikroorganizmalar 1 mL (besiyeri+Pbs 1x) hacimlerinde 24 kuyucuklu plaklara ilave edildi. Ve vitamin B kompleksi belli derişimlerde ilave edilerek 15 dakika 37°C'de inkübe edildi sonrasında her bir kuyu 30 dk diyot lazere maruz bırakıldı. Belirlenen miktarlarda fotosensitizer (Vitamin B komplek) uygulanmasından ve ışık ile muamele edildikten sonra akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Hücreler ependorflara toplandıktan sonra, iki kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra 5 dakika 1500 rpm (2 819 xg) de santrifüj edilip supernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelletin konsantrasyonu 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlandı, içerisinde 100 µL (10⁵ hücre) alınıp üzerine 5µL PI eklendi, tüpler 15 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 300 µL Pbs 1x eklenen tüpler akış sitometrisinde analizi gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin karşılaştırılması, Graphpad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. GraphPad Software yazılımı ile bir ANOVA tek yönlü testi CFU sayısı kullanılarak bir Tukey testi yapıldı. Öldürme eğrilerinin eğimleri, regresyon analizi ile ölçülmüş ve öldürme eğrisi çizgisinin eğiminden D değerleri elde edilmiştir.

Tüm değerler tanımlayıcı istatistiklerde ortalama ± SD olarak rapor edildi. T testi, verilerin Gauss dağılımlarını takip eden popülasyonlardan örneklediğini varsayar. Bu varsayım, Kolmogorov ve Smirnov yöntemi kullanılarak test edilir. Eşleştirilmemiş iki değişkenin karşılaştırması, Welch düzeltmesi ile eşleştirilmemiş t testi ile yapıldı. İkidenden fazla parametrik olmayan değişkenin karşılaştırması Friedman Testi (Nonparametric Repeated Measures ANOVA) ile yapıldı ve bir post hoc testi için Dunn'in Çoklu Karşılaştırma Testi kullanıldı.

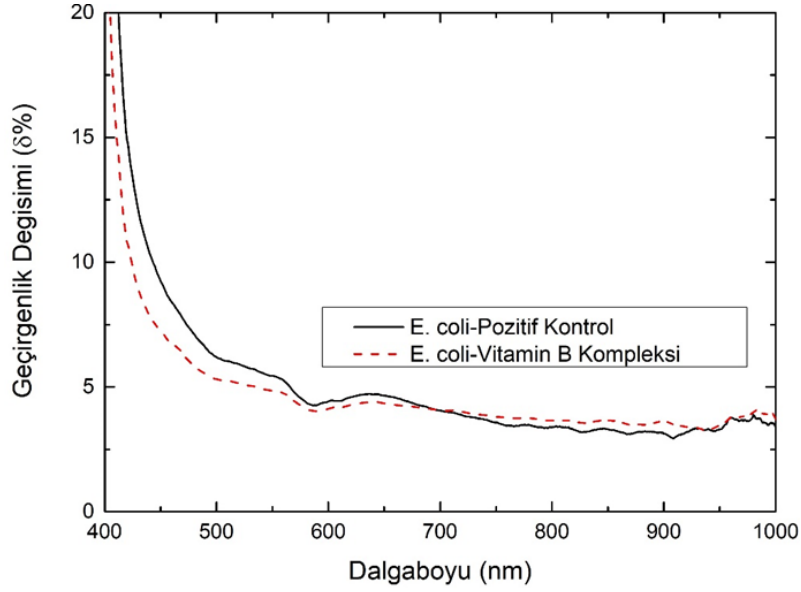
3. Bulgular

Spektrofotometrik % T Ölçümleri

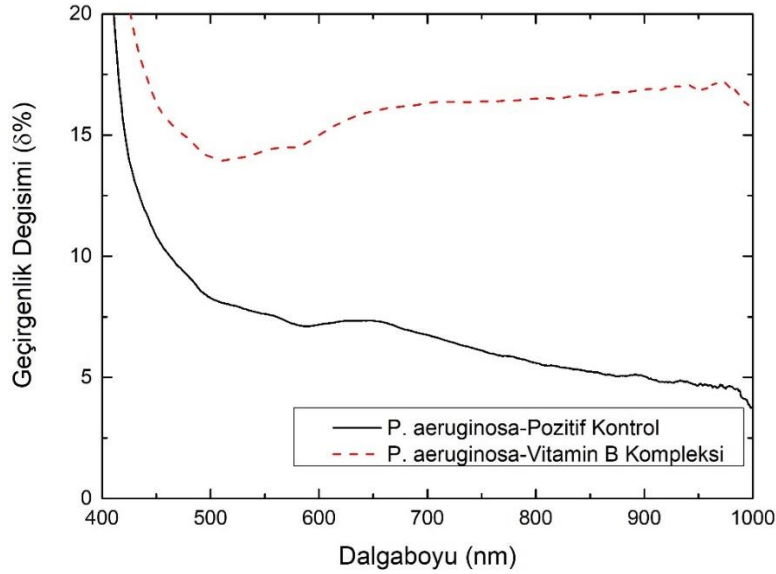
Büyüme oranı bir spektrofotometre ile nicelendirildi. 400 nm-1000 nm arasındaki dalgaboylarına tekabül eden ışık tayfı için geçirgenlik yüzdesi (% T) ölçüldü. Sonuçlar, mikrobiyal hücre büyümesinden kaynaklanan bulanıklığın bir fonksiyonu olarak % T olarak ifade edildi. Başlangıçta, tüm test tüpleri % 100 T idi ve bu nedenle artan bulanıklık % T ile ters orantılıydı. % 100 T'nin % 0 hücre büyümesini (bulanıklık yok) gösterdiğini ve % 20 T'nin % 100 hücre büyümesini (bulanıklık var) gösterdiğini veya hiç inhibisyon olmadığını göz önünde bulundurarak analizler yapıldı.

Geçirgenlik yüzdesindeki dalgaboyuna bağlı niceliksel değişimlerin hesaplanabilmesi için örnekler pozitif kontrol (PK) – yani vitamin B kompleksi verilmemiş- grup ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlu vitamin B kompleksi uygulanmış olarak iki farklı grubun lazer ışını maruziyeti öncesi alınan geçirgenlik oranlarının lazer sonrası maruz bırakılan örneklerin geçirgenlik oranlarından çıkarılarak dalgaboyuna

bağlı olarak ışık geçirgenlik yüzdesi (% T)'deki değişimlerin niceliksel farkı olarak bulundu. Şekil 1 ve Şekil 2'de *E. coli* ve *P. aeruginosa* örneklerinin 400 nm - 1000 nm arası ışık tayfı geçirgenlik değerlerindeki değişimlerin yüzdesel farkı olan geçirgenlik değişimleri (δ %) gösterilmektedir. Alınan ışık geçirgenlik verileri 400 nm ila 1000 nm dalgaboyu ışık tayfı arasında hem pozitif kontrol (PK) hem de vitamin B kompleksi verildikten sonra olan % T verilerinin alınması ile elde edildi.



Şekil 1: *E.coli* bakterisi için pozitif kontrol grubu ve Vitamin B kompleksi için lazer uygulama sonrası ve öncesi arası geçirgenlik değişimleri (δ %) – dalgaboyu (nm) analizi

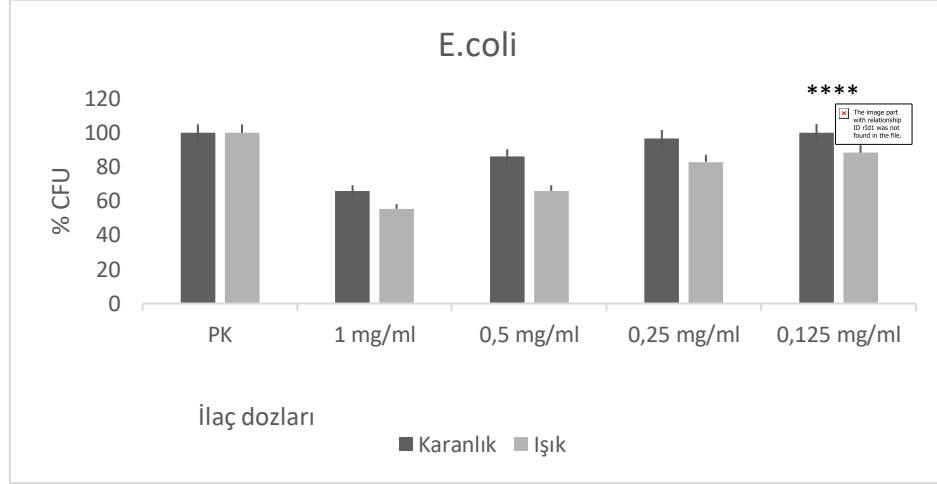


Şekil 2: *P.aeruginosa* patojeni için pozitif kontrol grubu ve Vitamin B kompleksi için lazer uygulama sonrası ve öncesi arası geçirgenlik değişimleri (δ %) – dalgaboyu (nm) analizi

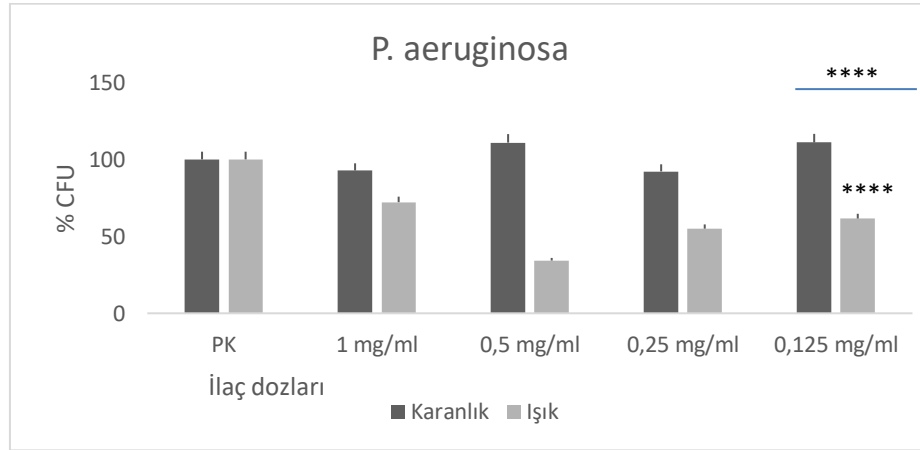
PDI'nin Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi

E. coli ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına uygulanan PDI'dan sonra petride oluşan koloniler (tekli koloniler) sayılarak % CFU yüzdeleri hesaplanmıştır (7). *E. coli* bakteri suşunda karanlıkta 1mg/mL konsantrasyonunda kullanılan vitamin B kompleksinde % 35 lik bir ölüm görülmektedir. Üstüne lazer etkisiyle bu etki % 40 lara çıkmaktadır. Vitamin B kompleksinin diğer konsantrasyonlarında karanlık ve ışık deneylerinde anlamlı değerler görülmektedir (****p <0,001 vs Işık PK; ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL) (Şekil 3). *P. aeruginosa* bakteri suşlarının karanlık deneyinde ise anlamlı değerler

vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu konsantrasyonların üstüne ışık (lazer) ile maruziyet sonrası ölüm oranları % 60 ve % 50 çıktığı görülmektedir (****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0.125 mg/mL) (Şekil 4).



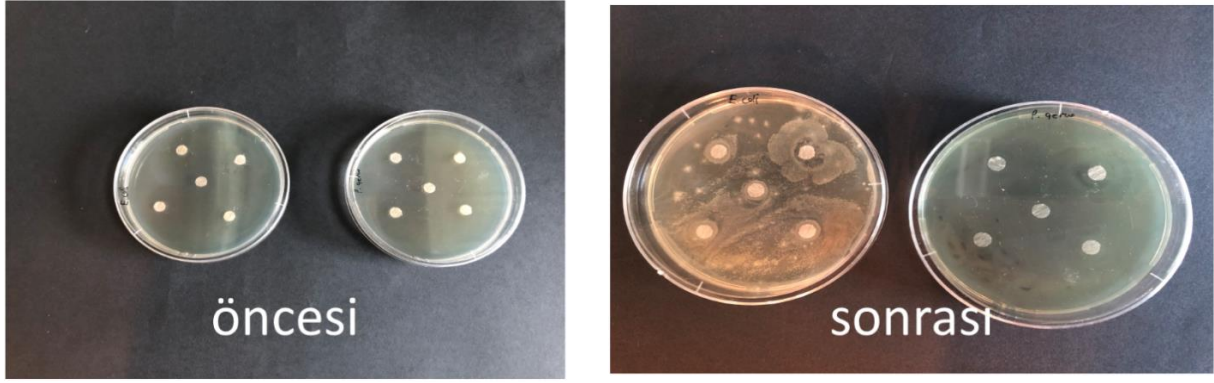
Şekil 3. Vitamin B kompleksinin *E.coli* suşu üzerindeki % CFU ****p <0,001 vs Işık PK; ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL



Şekil 4. Vitamin B kompleksinin *P. aeruginosa* suşu üzerindeki % CFU ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/ml

Antimikrobiyal Madde Etkinliğinin Test Edilmesi (Agar Disk Difüzyon Yöntemi)

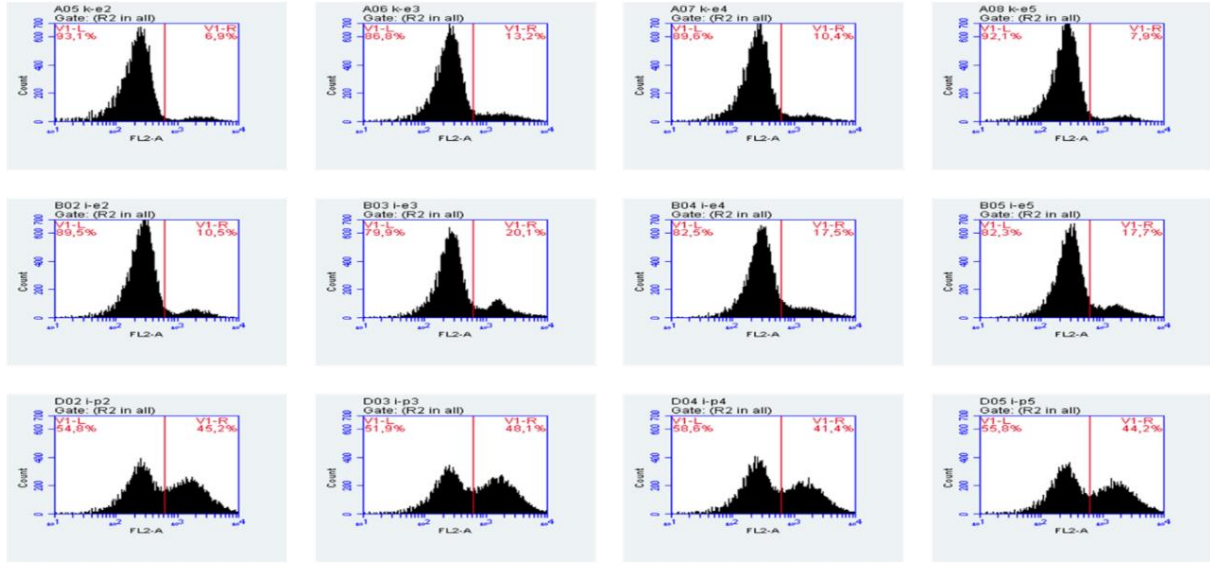
Antimikrobiyal madde etkinliğinin (AMM)'nin (özellikle antibiyotik vs.) etkinliği bu yöntemle kısa sürede ortaya konulabilmektedir. Yöntem; *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşları ile inoküle edilmiş petri kutusundaki besiyerine eklenen AMM'nin (vitamin B kompleksi), besiyerinde difüze olduğu alanda *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarının gelişimini engelleyip engellemediğinin belirlenmesine dayanmaktadır. Vitamin B kompleksi mikroorganizmalar üzerinde etkiliyse; vitamin B kompleksinin'in eklendiği yerin çevresinde, inkübasyon sonrasında mikroorganizma gelişiminin gözlenmediği bir "inhibisyon zonu" oluşur. Etkili değilse inhibisyon zonu oluşmaz ve AMM etkinliğinin olmadığına karar verilir. Bu çalışmada "kağıt disk agar difüzyon" yöntemi uygulandı ve vitamin B kompleksi inhibisyon zonu oluşturmadı. Vitamin B kompleksinin (0,125 mg/mL) konsantrasyonda lazersiz antibakteriyel aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5: Vitamin B kompleksinin *E.coli* ve *P. Aeruginosa* suşu üzerindeki antimikrobiyal madde etkinliği testi

Akış Sitometrisinde Canlılık Tayini

Propidium iyodür (PI), genellikle canlı hücrelerden dışlanan bir membran geçirimsiz boyadır. Hücre çekirdeğini boyayan PI, apoptozun geç evresindeki ve nekrotik hücreleri boyayarak FL2 panelinde görüntülenir. Sonuç olarak boyanmayan hücreler canlı PI ile boyanan hücreler ise ölü olarak değerlendirilir. Şekil 6 da görüldüğü gibi *E. coli* bakterisi suşunda çok fazla fotodinamik intaktivasyon etkinliği görülmemektedir. Zaten bu çalışmada arzu edilen patojen bakteri olan *P. aeruginosa* suşunun inaktive edilmesidir. *P. aeruginosa* suşunun ışık deneyine bakacak olursak *E. coli* bakterisi suşuna karşın yüksek oranda ölüm oranları görülmektedir. Vitamin B kompleksinin 0,125 mg/ml konsantrasyonunu değerlendirecek olursak *E. coli* karanlık deneyinde % 7,9 ölüm görülürken aynı bakteri suşunda ışık deneyinde % 17,7 ölüm görülmüştür. *P. aeruginosa* bakterisi suşunun ışık deneyinde % 44,2 oranlarında ölüm görülmüştür (Şekil 6).



Şekil 6: *E.coli* ve *P. aeruginosa* akış sitometrisindeki canlılık testi karşılaştırması

Birinci sıradaki grafikler *E.coli* karanlık deney sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)
İkinci sıradaki grafikler *E.coli* ışık deneyi sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)
Üçüncü sıradaki grafik *P. Aeruginosa* ışık deneyi sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)

İstatistiksel analiz

İkiden fazla parametrik değişkenin karşılaştırılması Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile, Tukey-Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi ise post hoc testi ile yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler % 5 anlamlılık düzeyinde yapıldı ve P <0,05, P <0,01 ve P <0,001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analiz, Graphpad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. E-coli

suşunda ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL; *P. aeruginosa* bakteri suşunda ****p <0,001 vs. Işık PK, ****P<0,001vsKaranlık0,125mg/mL

4. Tartışma ve Sonuç

Lazer maruziyetinde *E. coli* ve *P. aeruginosa* geçirgenlik az miktarda da olsa numunelerin ışık geçirgenlik spektrumunda (tayfında) artış göstermektedir. Bu ışık geçirgenliğindeki artış lazer ışığının her iki mikroorganizma üzerinde negatif etki oluşturmasının sonucu olduğu unutulmamalıdır. Fakat vitamin B kompleksi uygulaması artı lazer uygulaması sonrası *E. coli* geçirgenlik değerleride değişimde (δ %) çok fazla bir etki gözlenmezken (bkz. Şekil 1); *P. aeruginosa* patojeni üzerindeki geçirgenlik değişimlerinde dikkate değer geçirgenlik oranları pozitif kontrole göre artmaktadır (bkz. Şekil 2). Bu da dolaylı olarak *P. aeruginosa* patojenlerinin lazer maruziyetinden, *E. coli*'ye göre daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Bunun sonucunda *E. coli* ve *P. aeruginosa* patojen karma ortamında seçici olarak patojenlerin terminasyonu vitamin B kompleksi ve lazer ışını uygulaması ile kontrollü sağlanabilir. PK ile 0,125 mg/mL Vitamin B kompleksi uygulama sonrası *E. coli* bakterisi, PK grubundan çok ayırt edilebilir bir δ % göstermemekle birlikte 400 nm ila 1000 nm dalgaboyları aralığında hemen hemen aynı δ % düzeylerine sahiptir. Oysaki *P. aeruginosa* patojeni üzerindeki vitamin B kompleksi uygulaması δ % farkedilebilir bir değişim göstermekte ve özellikle kızılötesi dalgaboyu aralığında δ % değerleri artış göstermektedir. δ % değerlerindeki artış vitamin B kompleksi uygulama sonrası *P. aeruginosa* için % 15 değerini geçmektedir. Bu sonuçlar ışığında *E. coli* ve *P. aeruginosa* iki popülasyonun bulunduğu bir ortamda vitamin B kompleksi uygulaması sonrası yapılacak bir PDI süreci 660 nm lazer uygulamalar ile seçici terminasyon ve ayırıştırma süreçlerinde kullanılabileceğini öngörmekteyiz.

Klinik uygulamada PDI'nin yüksek maliyeti sadece ekipmanın fiyatından değil, aynı zamanda PDI için kullanılan ilaçların yüksek maliyetinden de kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, özellikleri yüksek etkinlik, düşük yan etkiler ve düşük maliyet içermesi gereken yeni ilaçların geliştirilmesi arzu edilmektedir. Bu gereklilikleri takiben, halihazırda varolan bazı organik kimyasallar PDI adayları olarak önerilmiştir. Bunlardan biri de 660 nm'de yüksek ışık absorpsiyonuna sahip iyi bilinen bir boya olan metilen mavisi (MB), PDI'de etkilidir ve çeşitli hastalıklara karşı klinik uygulamalar için 1O_2 ve fotodinamik aktivite üretme kabiliyeti göstermektedir [19]. PDI' de MB fotosensitizer olarak kullanılmıştır, bakteri hücre duvarlarını geçmekte zorluk çekmez. Katyonik yükü nedeniyle, Gram negatif bakterilerin lipopolisakaritlerinin negatif yüküne kolayca bağlanır [25, 26]. Gram pozitif bakteriler sitoplazmik membranın dışında sadece kapsüler materyale ve peptidoglikana sahiptir, bu da metilen mavisinin membranı kolayca geçmesini sağlar [27]. Bizim bu çalışmada kullandığımız bakteriler *E. coli* ve *P. Aeruginosa* gram negatiftir, fotosensitizer olarak kullandığımız vitamin B kompleksi katyonik etki ile her iki bakteri membranından kolayca geçmesini sağlayacaktır. Antibiyotik direnç, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır [28]. *P. aeruginosa* bakterilerin % 77'si çoklu dirençli (≥ 3 grup antibiyotiğe dirençli) olup, çalışılan antibiyotikler içinde en düşük duyarlılığı tobramisine (% 35), en yüksek duyarlılığı ise piperasilin+tazobaktama (% 55) karşı gösterdiği izlenmiştir [29]. Hastane enfeksiyonu etkeni Gram negatif bakteriler içinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) üreten *E. coli* ve *P. aeruginosa*, birçok antimikrobiyal ajana karşı artmakta olan direnç ile önem taşımakta ve enfeksiyonların tedavi ve kontrolünde problemler yaşanmaktadır [30]. Bu çalışma, antibiyotiklere karşı direnç geliştiren *P. aeruginosa* bakterisini daha etkili ve ucuz bir yöntemle inaktive ederek yeni alternatif tedavilere imkân sağlayacaktır.

Bu çalışmada ışık deneylerinde sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazeri diğer ışık kaynaklarıyla karşılaştırdığımızda birden fazla avantajı barındırmaktadır. Lazer ışınması, dar dalgaboyu band aralığında kontrollü ışınma miktarlarını ayarlayabilmesi sayesinde hedeflenen organizmalara eşyönlü ışınım kabiliyeti ve hedef odaklı çalışması nedeniyle PDI uygulamaları için çok iyi bir seçenektir. Bu makalede, lazer ışığının eş zamanlı olarak vitamin B kompleksinin mikroorganizmalara PDI etkisine bakılmıştır. PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisi; *E. coli* 1 mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu kullanan numuneler için, karanlık ve ışık ölüm oranları % 40 olarak görülmüştür. Bu sonuç, tek başına vitamin B kompleksi'nin yüksek dozlarda zaten yüksek bir ölüm yüzdesini indüklediği gerçeğiyle açıklanabilir. Bir başka olası açıklama, daha yüksek konsantrasyonlarda fotosensitizerleri'nin su ortamında kendi kendine agregre olabileceği ve böylece singlet oksijen verimini azaltabileceğidir [31]. *P. aeruginosa* 1mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu kullanan numuneler için, karanlık ve ışık ölüm oranları % 20 olarak görülmüştür. 0,5 mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu *E. coli*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark görülmezken *P. aeruginosa*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark (% 60 lık ölüm) görülmüştür. 0,125

mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu *E. coli*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark görülmezken *P. aeruginosa*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark (%40 lık ölüm) görülmüştür. *E. coli* suşunda ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL; *P. aeruginosa* bakteri suşunda ****p <0,001 vs. Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL (Şekil 3-4). Vitamin B kompleksinin yüksek konsantrasyonlarda *E. coli* için biraz toksik olduğu, patojen mikroorganizma (*P. aeruginosa*) artan toksisitenin yalnızca lazer tarafından ışınlandığında meydana geldiğini, dolayısıyla bu terapi esas olarak lokal ve topikal uygulamalar için kullanılacaktır. İntravenöz yoldan kullanım için, ilacın vücutta birikeceği yeri tam olarak bilmek ve ardından o bölgeyi lazer ışımaya maruz bırakmak önemlidir. Işığa maruz kalma süresi, vitamin B kompleksi konsantrasyonu ve lazer ışık dozu arasındaki dengenin araştırılması PDI verimliliğinin kontrol edebileceğini göstermektedir. Vitamin B kompleks birikiminin zayıf olduğu perfüze olmayan dokular için, benzer bir terapötik etkiye izin vermek için ışınlama süresi uzatılmalıdır. Maruz kalma süresi, farklı maruz kalma uzunluklarında hücre ölüm hızı üzerindeki etkilerle gözlemlenebileceği gibi, PDI aktivitesi için esastır.

Antimikrobiyal madde etkinliğini karşılaştıracak olursak kağıt disk difüzyon yöntemiyle vitamin B kompleksinin 0,125 mg/mL konsantrasyonunda lazere maruz bırakılmamış hali ile antibakteriyel aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.

Akış sitometrisinde canlılık testinde *E. coli* bakteri suşunda çok fazla fotodinamik inaktivasyon etkinliği görülmemektedir. Başka bir çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak *E. coli* bakteri suşunda fotosensitizer kullanılarak yapılan karanlık deneyi ile ışık deneyini arasında fotodinamik etkinlik olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir [19]. Zaten bu çalışmada arzu edilen patojen bakteri olan *P. aeruginosa* suşunun inaktive edilmesidir. *P. aeruginosa* suşunun ışık deneyine bakacak olursak *E. coli* bakteri suşuna karşı yüksek oranda ölüm oranları görülmektedir. Vitamin B kompleksi *E. coli* bakteri suşunda ışıkta minimum toksik etki gösterirken *P. aeruginosa* suşunda % 45'lik oranda ölüm gözlenmiştir. Burada belirtmekte fayda var: Vitamin B kompleksinin uygulanan konsantrasyonu için lazerin 660 nm dalgaboyunu çok az bir miktarda absorblamaktadır. Aksine vitamin B kompleksi bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda 660 nm dalgaboyu için yüksek geçirgenliğe sahip olmasına rağmen üzerinde durulan ışık etkileşimi özellikle, patojen mikroorganizma (*P. aeruginosa*) bünyesinde vitamin B kompleksinin 660 nm ışınımına direkt tepki verdiğini ve PDI etkileşiminin patojenin terminasyonu ile sonuçlandığını akış sitometrisi de doğrulamaktadır. Burada Tip I PDT'den daha az etkili olan Tip II PDT yoluyla fotodinamik aktivite gösterebilir [32-34]. Ancak ilgili patojen içinde Vitamin B kompleksi+lazer ışığı, ne gibi bir mekanizma ile bu terminasyon sürecini tetiklediği ileriki çalışmalarımızın konusunu oluşturmaktadır.

Teşekkür

Bu araştırma için akış sitometrisinde canlılık belirleme sürecindeki değerli katkılarından dolayı Metin Çetin'e teşekkür ederiz.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Ohta, K.1900. Chemical studies of hematoporphyrin rabbits. Munch Med Wochenschr, 47, 5.
- [2] Kapuscinski, R. B., Mitchell, R. 1981. Solar radiation induces sublethal injury in Escherichia coli in seawater. Applied and Environmental Microbiology, 41(3):670-674
- [3] Cooney, J. J., Krinsky, N. I. 1972. Photodynamic killing of Acholeplasma laidlawii. Photochemistry and Photobiology, Dec;16(6):523-6.
- [4] Acher, A.J, Juven, B.J. 1977. Destruction of coliforms in water and sewage water by dye sensitized photooxidation. Applied and Environmental Microbiology, 33(5):1019-1022

- [5] Chidinma, C. 2016. Identifying misconnection hotspots using coliforms and biofilm communities. University of Hertfordshire Research Archive 2016.
- [6] Hamblin, A. M. R, Jori, G. 2011. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens Medical and Environmental Applications: Light Strikes Back Microorganisms in the New Millennium. *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1479–1479.
- [7] Oktavia, L, Mulyani, I, Suendo, V. 2021. Investigation of Chlorophyll-a Derived Compounds as Photosensitizer for Photodynamic Inactivation. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 16 (1), 161-169.
- [8] Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P., Oluwafemi, O. S. 2019. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.
- [9] Wise, R. The urgent need for new antibacterial agents. 2011. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1939–1940.
- [10] Liu, Y., Qin, R., Zaat, S. A. J., Breukink, E., Heger, M. 2015. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections, *JDR Clinical and Translational Research*, 1(3), 140 – 167.
- [11] Yurttas, G. A., Gökdoğan, K., Hekim, S. N. 2022. Liposomes Loaded with Activatable Disulfide Bridged Photosensitizer: Towards Targeted and Effective Photodynamic Therapy on Breast Cancer Cells. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, Volume 12, Issue 1, 304 -325
- [12] Tim, M. 2015. Biology Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 150, 2–10.
- [13] Maisch, T., Eichner, A., Späth, A., Gollmer, A., König, B., Regensburger, J., Bäuml, W. 2014. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives, *PLoS ONE*, 9(12), 1-8.
- [14] Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., Bahador, A. 2018. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy : an overview. *Laser therapy*, 27(4), 293–302,
- [15] Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z., Ehrenberg, B. 1992. Inactivation of Gram-Negative Bacteria By Photosensitized Porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*, 55(1), 89–96.
- [16] Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Karlowsky, J. A., Sahm, D. F., Wenzel, R.P. 2004. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3: 14.
- [17] Ahmed, F. Y., Aly, U. F., El-Baky, R. M. A., Waly, N. G. F. M. 2020. Comparative Study of Antibacterial Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Alone and in Combination with Antibiotics on MDR *Pseudomonas aeruginosa* Strains, *International Journal of Nanomedicine*, 15 3393 – 3404
- [18] Whooley, M. A., O'callaghan, J. A., Mcloughlin, A. C. 1983. Effect of Substrate on the Regulation of Exoprotease Production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Journal Of General Microbiology*, 129, 981-988.
- [19] Peloi, L. S., Soares, R. R. S., Biondo, C. E. G. , Souza, V. R., Hioka, N., Kimura, E. 2008. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue, *Journal of Biosciences*, 33(2), 231–237.
- [20] Lu, C. L., Liu, C. Y., Huang, Y. T., Liao, C. H., Teng, L. J., Turnidge, J. D., Hsueh, P. R. 2011. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomicin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9):4295-301.
- [21] Sana, F., Satti, L., Zaman, G., Ikram, A., Gardezi, A. H., Khadim, M. T. 2019. In Vitro Comparison of Disk Diffusion Method and Agar Dilution Method for Sensitivity of Polymyxin B against Multi Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 69(5), 998–1003.
- [22] Robertson, J., Swift, S., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F. 2019. Optimisation of the protocol for the liVE/DEAD@BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). doi:10.3389/fmicb.2019.00801

- [23] Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, Cilt: 06 Sayı: 2 Sayfa: 01-18.
- [24] Kanev, M. O., Muranlı, F. D. G.2022. Flow sitometri ve kullanım alanları. Sakarya University Journal of Science, 20(1):33-38. Accessed May 19.
- [25] Westfall, D. A., Krishnamoorthy, G., Wolloscheck, D., Sarkar, R., Zgurskaya, H. I., Rybenkov, V. V. 2017. Bifurcation kinetics of drug uptake by Gram-negative bacteria. PLoS ONE, 12(9), 1–18.
- [26] Önal, Ş, Seçkin, H. 2021. Identification and phylogenetic differences of newly isolated *Streptomyces* sp. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 8(3), 680–685.
- [27] Zeina, B., Greenman, J., Purcell, W. M., Das, B. 2001. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy, British Journal of Dermatology, 144 274–278
- [28] Mengelöglu, F. Z., Koçođlu, A. E., Çiçek, O. B., Özgümüő, C., Sandalli, E. E. 2021. Carriage of Class 1 and 2 Integrons in *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Clinical Specimens and a Novel Gene Cassette Array: *BlaOXA-11-CmlA7*." Mikrobiyoloji Bülteni, 48 (1): 48–58.
- [29] Zarakolu, P., Haşçelik, G., Ünal, S. 2006. Hastane enfeksiyonu etkeni gram negatif bakterilerin çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık durumu: hacettepe üniversitesi erişkin hastanesi mystic çalışması verisi (2000-2004). Mikrobiyoloji Bülteni, 40: 147-154
- [30] Gaynes, R., Edwards, J. R. 2005. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clinical Infectious Diseases, 41: 848-54.
- [31] Cossu, M., Ledda, L., Cossu, A. 2021. Emerging trends in the photodynamic inactivation (PDI) applied to the food decontamination. Food Research International (Ottawa, Ont.), 144, 110358.
- [32] Usacheva, M. N., Teichert, M. C., Biel, M. A. 2003. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 71 87–98
- [33] Kesici, D., Yıldırım, M. 2009. Fotodinamik Tedavi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 7(4)
- [34] Boran, R., Pamuk, A. M., Uğur, A.2018. In Vitro Evaluation Of The Effectiveness Of Different Bodipy Dyes As Photosensitizer In Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Treatment. Mugla Journal of Science and Technology. 4(2): 191-197.