

Radyonüklid İşaretlenmiş Antibiyotiklerin Biyofilim Üreten Mikroorganizma Üzerine Etkinlikleri



Serhan Sakarya¹, Hasan Demiroğlu², Uğur
Avcıbaşı², Perihan Ünak³

1-Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Enf. Hst A.D. Aydın,

2 -Celal Bayar Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya bölümü Muradiye, Manisa

3 -Ege Üniversitesi, Nükleer bilimler Enstitüsü Bornova, İzmir

Giriş



- Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve bakterinin cansız veya canlı yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarid tabiatında “glikokaliks” olarak da adlandırılan polimerik matriks.
- Biyofilim aracılığıyla mikroorganizmalar biryandan yapısal birliktelik oluştururken diğer yandan immün sistemden kaçma ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirirler.
- Özellikle kronik yaralar ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlarda önemli rol oynarlar.
- Linezolid (LNZ) ve Moxofloxacin (MFX) Gram (+) pozitif bakterilere farklı mekanizmalarla etki etmelerine karşın, biyofilm oluşturmuş bakterilere duyarlı olsalar bile sınırlı etkinlik göstermektedir.
 - Bu sınırlı etki, biyofilimin oluşturduğu bariyer fonksiyonu
 - Biyofilm altındaki dormant mikroorganizmanın metabolik aktivitesi ile kuvvet ilişkilidir.
- Günümüzde biyofilim eradikasyonu üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına karşın halen yeterli etkinlik sağlayabilecek bir strateji tanımlanamamıştır.

Amacı



- I^{131} (β -emisyon) ve I^{127} (inaktif) işaretli LNZ ve MFX in;
 - Bakteri üzerine,
 - Oluşmuş biyofilim üzerine,
 - Biyofilim altındaki mikroorganizmaya etkinliğinin araştırılması.
 - Biyofilm oluşturmuş kronik enfeksiyonların görüntülenebilmesi

Metodlar



Bakteri



- *Staphylococcus aureus* (ATCC 35556)

Radyoışaretleme



- LNZ ve MFX;
 - İodojen metodu kullanılarak ^{131}I (β ışıma)
 - soğuk işaretleme yöntemi kullanılarak ^{127}I (inaktif) işaretlelenmiştir.
- İşaretleme sonrası TLC ve HPLC ile bağlanma kalitesi test edildi.

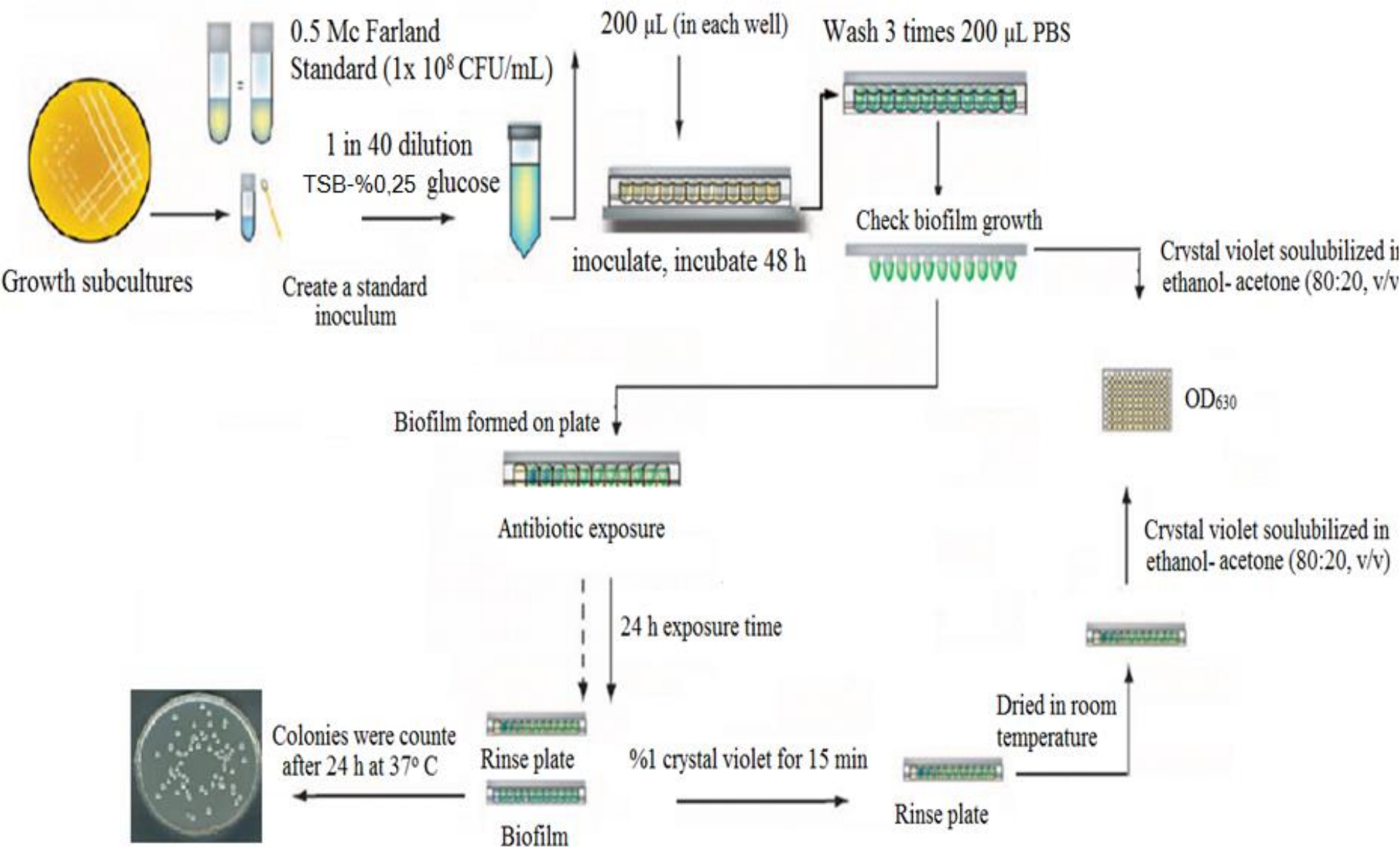
Minimum İnhibitör konsantrasyon (MIC) & Time Kill



MIC mikrobrot h dilüsyon yöntemiyle Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirtilen şekilde yapıldı.

Time kill, MIC değeri ve MIC değerinin üst ve altındaki 2 konsantrasyon kullanılarak 0, 30, 60, 120, 240, 720 ve 1440 dk. larda canlı bakteri sayımı yapılarak belirlendi.

Biofilm formation workflow



^{131}I işaretli antibiyotik ve ^{131}I in biyofilme akümülayonu



- 96 kuyucuklu plaklarda oluşmuş biyofilm üzerine ^{131}I ile işaretlenmiş farklı dozlarda antibiyotik ve sadece ^{131}I eklenerek 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 3 kez yıkanarak tek-kanallı Cd(Te) detektörlü RAD 501 gama sayıcıda sayımları alındı.
- Biofilim içine akümüle olan radyoaktivite CPS (Count Per Second) değeri olarak belirlendi.

İstatistiksel yöntem



- Tüm çalışmalarda denekve kontrol grubu 3 er adet kullanıldı ve her bir deney 3 kez tekrarlandı.
- İstatistik analiz için GraphPad 5.0 Prism programı kullanıldı.
- Deney ve kontrol grupları Analysis of variance (ANOVA) kullanılarak karşılaştırıldı,
- P-değeri <0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar



Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC)

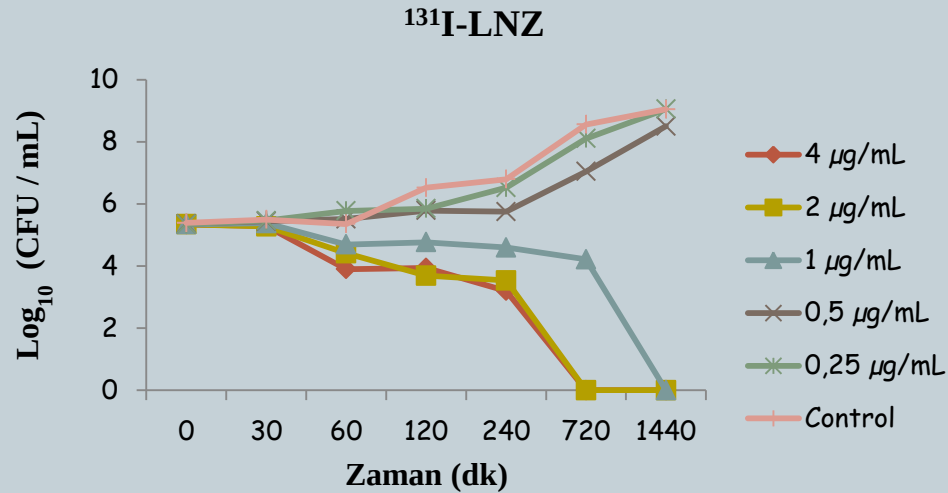
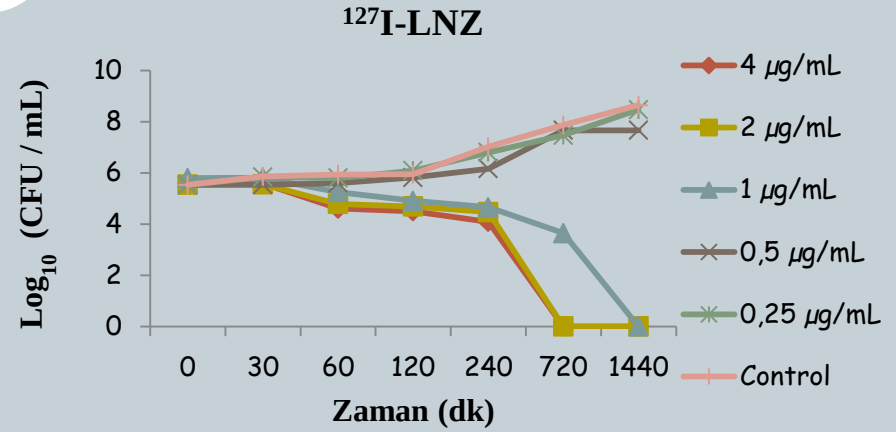
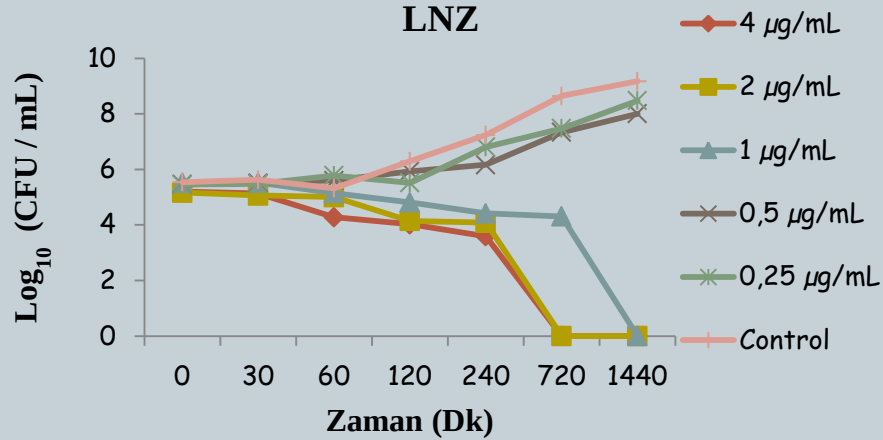


Antibiyotik konsantrasyonu ($\mu\text{gr/ml}$)

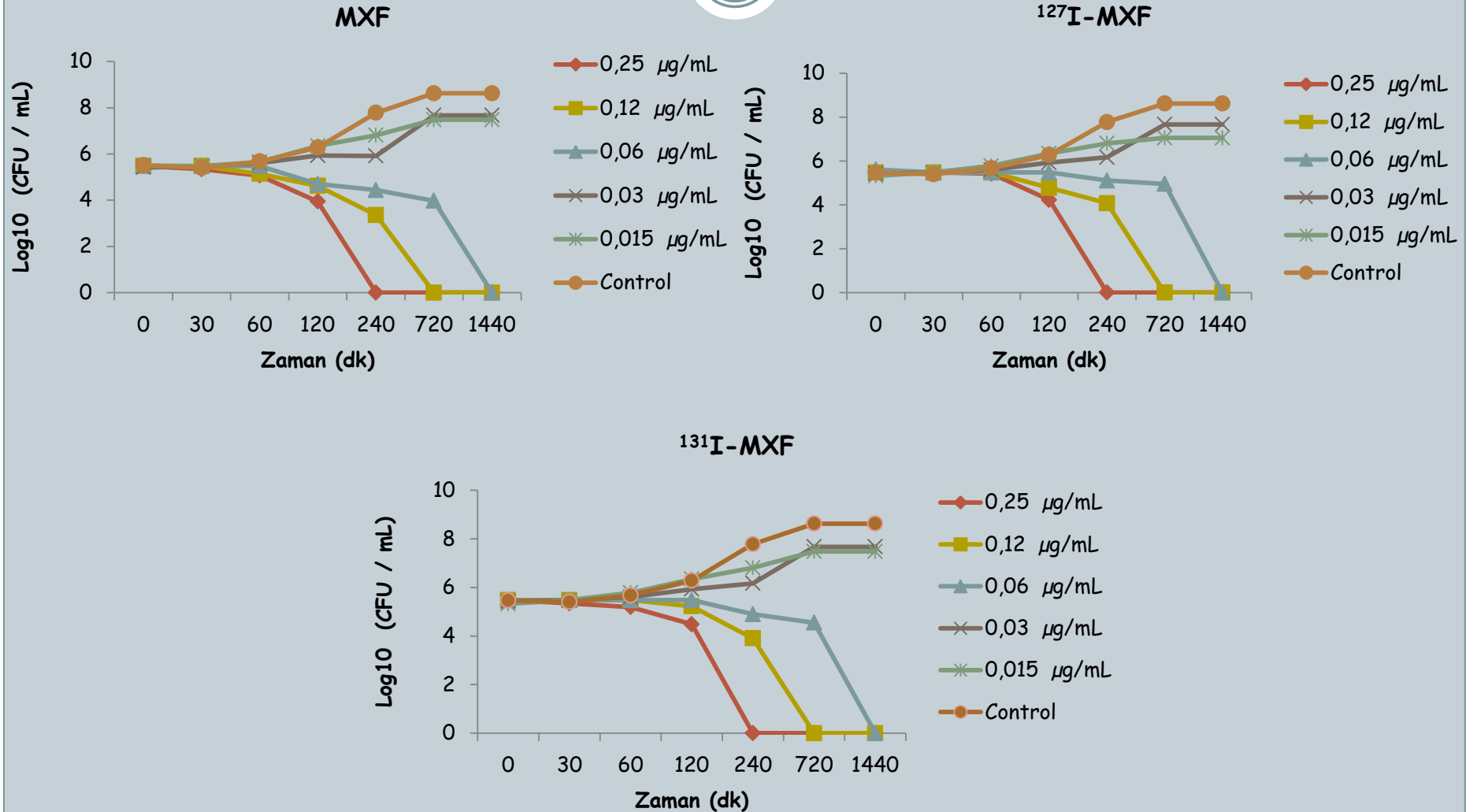
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0	$^{131}\text{I}^+$	$^{131}\text{I}^-$	$^{127}\text{I}^-$
LNZ	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
^{131}I -LNZ	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
^{127}I -LNZ	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			+

	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0	$^{131}\text{I}^+$	$^{131}\text{I}^-$	$^{127}\text{I}^-$
MXF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+			
^{131}I -MXF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
^{127}I -MXF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+			+

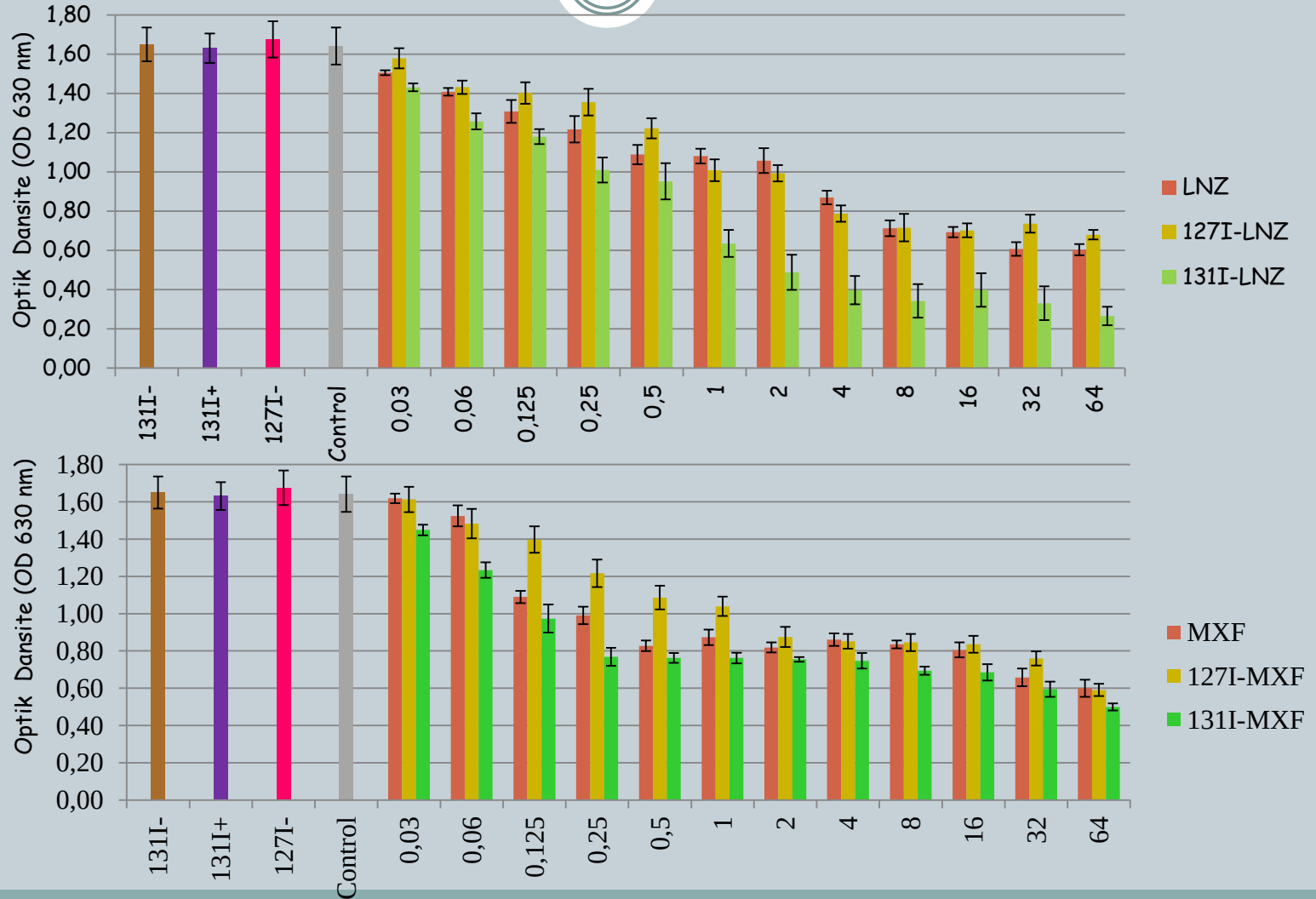
LNZ, ^{127}I -LNZ ve ^{131}I -LNZ ile Time Kill sonuçları



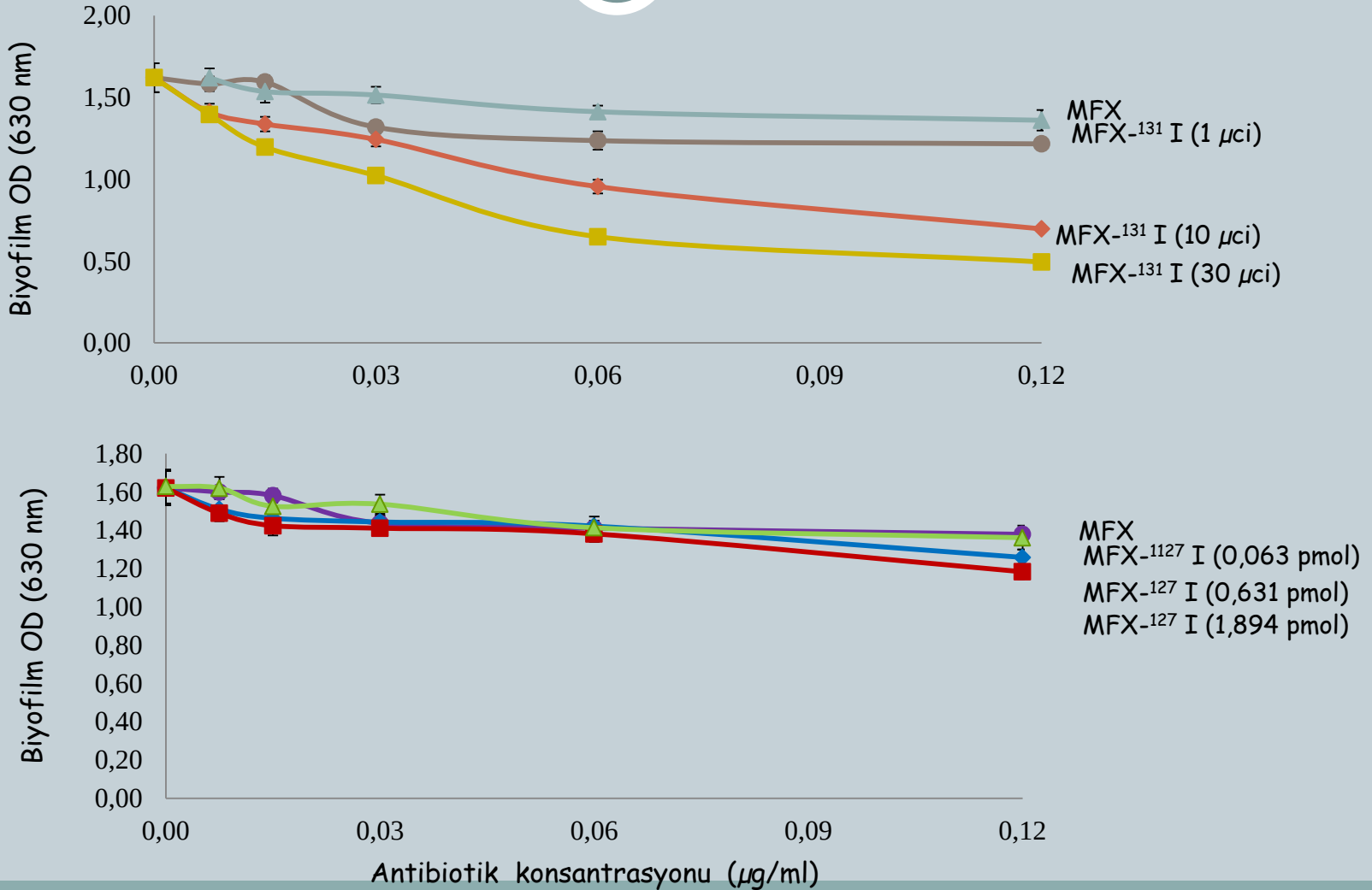
MFX, ^{127}I -MFX and ^{131}I -MFX Time Kill sonuçları



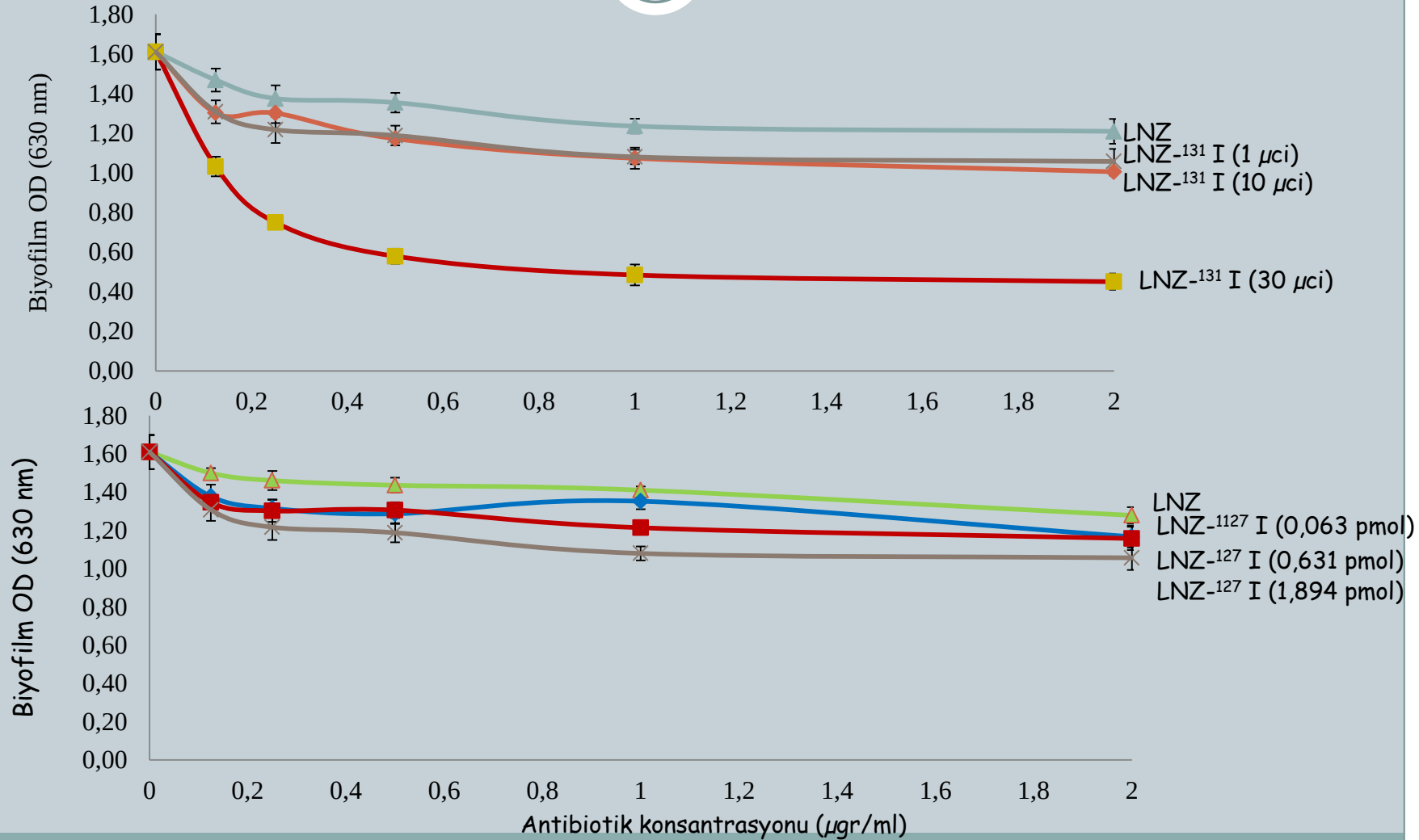
Biyofilim üzerine etkinlik



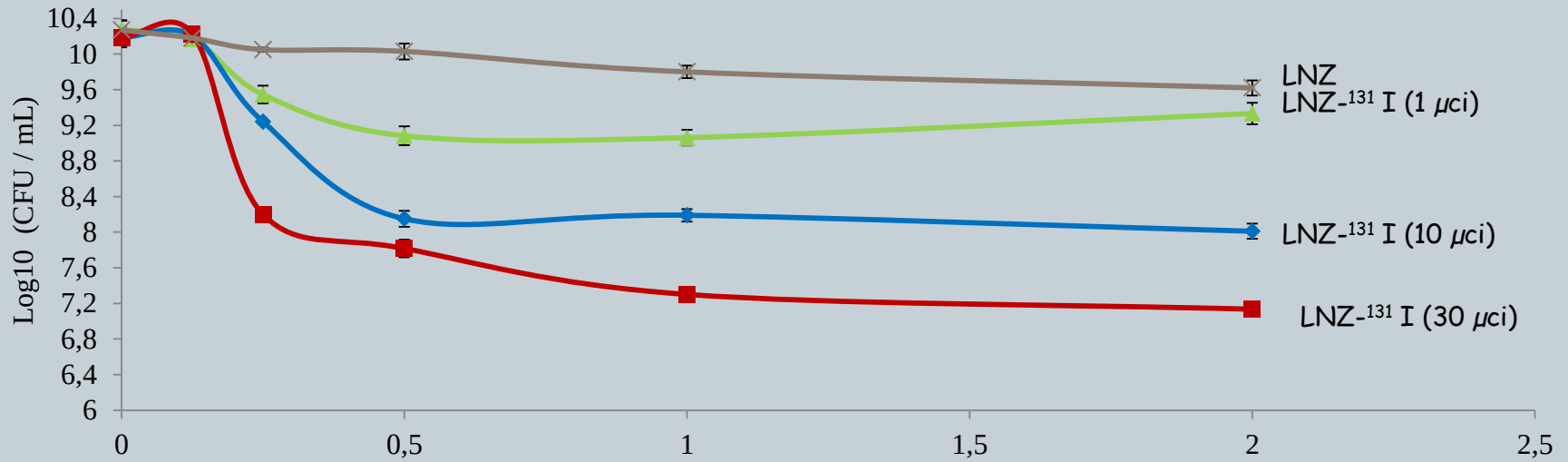
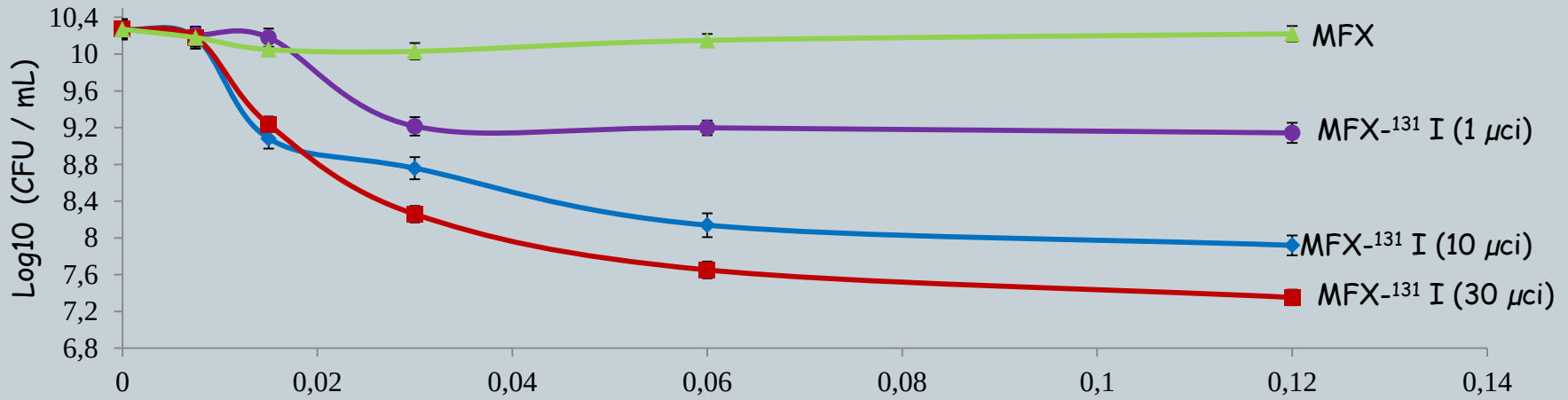
^{131}I ve ^{127}I işaretli MFX nin ışıma dozuna bağlı biyofilim eradikasyonu



^{131}I ve ^{127}I işaretli LNZ nin ışıma dozuna bağlı biyofilim eradikasyonu

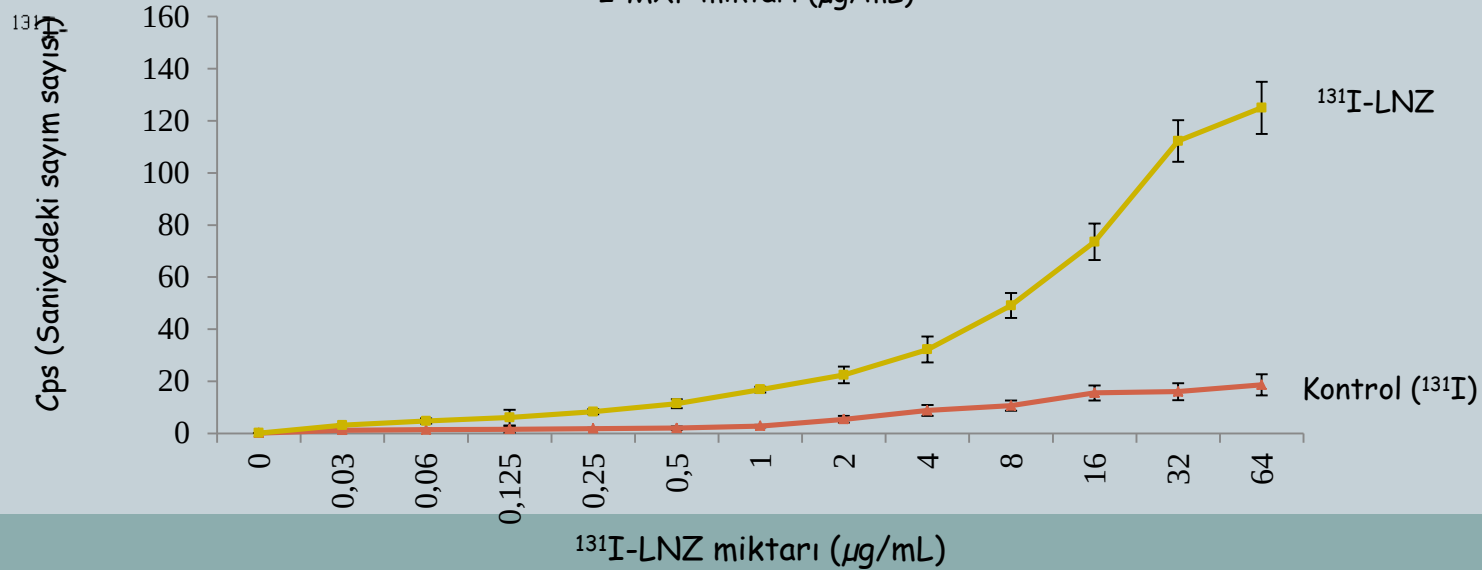
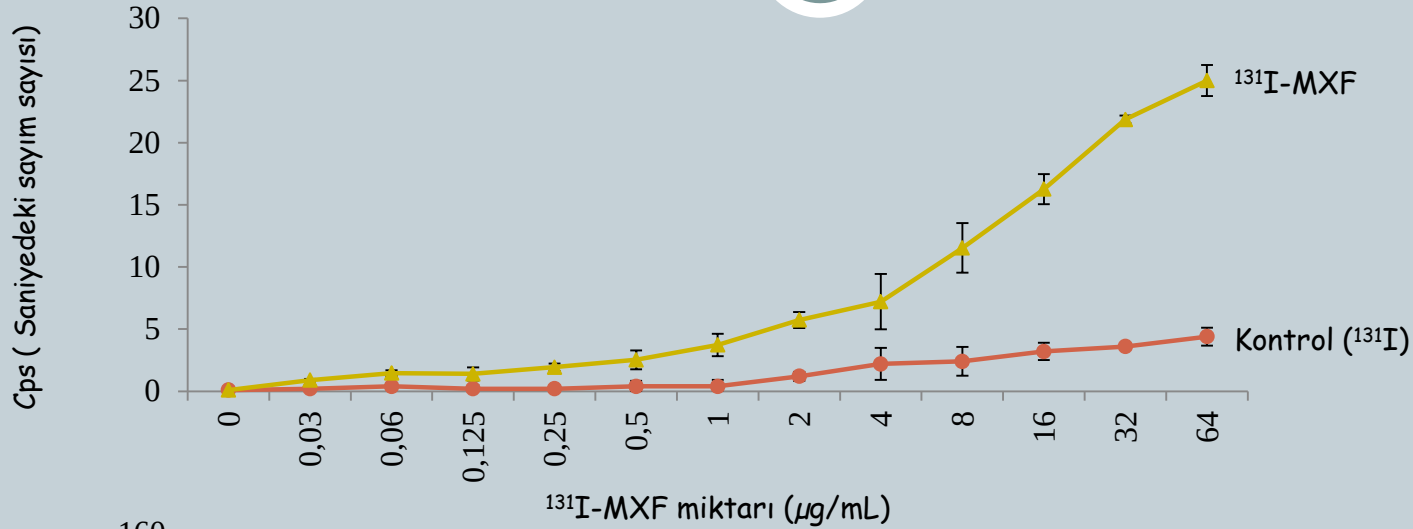


^{131}I ve ^{127}I işaretli MFX nin ışıma dozuna bağlı biyoflim altındaki mikroorganizma eradikasyonu



Antibiotik Konsantrasyonu ($\mu\text{gr/ml}$)

^{131}I ile işaretlenmiş antibiyotiğin biyofilim içine akümülayyonu



Tartışma



Eve götüreceğimiz



- β ışına tek başına;
 - Bakteri üzerine
 - Bakterinin oluşturduğu biyofilm üzerine etkinliği yoktur.
- Antibiyotik ile birlikte β ışına;
 - Antibiyotiğin direkt bakteri üzerine etkinliğinde bir etkisi yoktur
 - Biyofilm yapısını doza bağımlı olarak bozmaktadır. Tek başına etkinliği yokken antibiyotikle birlikte olması ancak biyofilm içine girdikten sonra etkin olabileceğini göstermektedir=Hedefe yönelik tedavi
 - Işıma sonucu oluşan biyofilm eradikasyonu biyofilimin bariyer fonksiyonunun ortadan kaldırmakta ve buna bağlı olarak biyofilm altındaki dormant bakterinin metabolik aktivitesini arttırarak antibiyotiğin etkinliğini arttırmaktadır.
 - Antibiyotik ile birlikte β ışına yapan ^{131}I in biyofilm içine akümülyasyonu, bu yöntemin aynı zamanda bir görüntüleme ajanı olarak tanıda kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Literatür eşliğinde tartışma



- Bu çalışma dünya literatürdeki ilk çalışmadır.
- Anti biyofilim stratejilerden en önemlisi olan Quorum sensing inhibitörlerinden tedavide kullanım açısından;
 - Oluşmuş biyofilim üzerine etkin olması
 - Zararlı dozun çok altında etkili olması
 - Biyofilim altındaki mikroorganizmanın eradikasyonunu sağlaması açısından üstündür.

A close-up photograph of a very fluffy orange kitten. The kitten is looking directly at the camera with large, light-colored eyes. Its front paws are raised towards its face, and its hind legs are also visible, raised in the air. The kitten's fur is thick and soft-looking. The background is a plain, light color.

Teşekkür ederim