



HepG2 Karaciğer Hücre Hattı Üzerinde Bakterilerle Oluşturulan İnfeksiyon Modelinde Nanopartikül Çinko + Çinko Borat Bileşiklerinin Sinerjik Etkisinin Belirlenmesi

Determination of the Synergistic Effect of Nanoparticle Zinc + Zinc Borate Compounds in a Bacterial Infection Model on HepG2 Liver Cell Line

Demet ÇELEBİ^{1,2}([iD](#)), Özgür ÇELEBİ³([iD](#)), Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGHİ⁴([iD](#)),
SümeYYe BAŞER³([iD](#)), Emine PARLAK⁵([iD](#))

¹ Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Aşı ve Uygulama Merkezi, Erzurum, Türkiye

³ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁴ Şeyh Edebalı Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

⁵ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Makale atfı: Çelebi D, Çelebi Ö, Taghizadehghalehjouhi A, Başer S, Parlak E. HepG2 karaciğer hücre hattı üzerinde bakterilerle oluşturulan infeksiyon modelinde nanopartikül çinko + çinko borat bileşiklerinin sinerjistik etkisinin belirlenmesi. FLORA 2024;29(1):52-61.

ÖZ

Giriş: Sağlık hizmeti ilişkili infeksiyonlar, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hastane infeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmalarda görülen antibiyotik direnci alternatif antimikrobiyal arayışlara yönelmeye neden olmuştur. Biz de bu amaçla hastane kaynaklı infeksiyonlara sebep olan dirençli mikroorganizmalara karşı çinko nanopartikül ve çinko borat bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemeyi amaçladık.

Materyal ve Metod: Çinko nanopartikül ve çinko borat bileşiklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenerek fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) değerleri kombinasyon çalışması ile değerlendirildi. HepG2-bakteri infeksiyon modeli oluşturulduktan sonra çinko nanopartikül ve çinko borat bileşenlerinin oluşturdukları etkileri sitotoksik ve antioksidan aktivite bakımından inceleme yapıldı.

Bulgular: Çinko nanopartikül + çinko borat 31.25 µg/mL + 62.5 µg/mL fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonunda en güçlü sinerjik etki *Klebsiella pneumoniae* üzerinde tespit edildi. Aditif etki ise en güçlü olarak çinko NP 500 µg/mL + çinko borat 500 µg/mL konsantrasyonunda *Escherichia coli* üzerinde görülmüştür. Çinko boratın *Klebsiella pneumoniae* suşuna diğer bakterilere göre daha düşük dozlarda etkili olduğu tespit edildi. Hücre hattı canlılık oranı bakteri infeksiyon modelinde düşükten yükseğe sıralandığında *Klebsiella*, *MRKNS*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *MRSA*, *E. coli* olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar çinko nanopartikül ve çinko borat bileşiklerinin antimikrobiyal etkinlik bakımından umut verici olduğunu göstermektedir. Bu iki bileşen, oluşturdukları sinerji ile beraber özellikle *MRSA* ve *Klebsiella* bakterileri üzerinde etkili olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çinko borat; Çinko nanopartikül; HepG2 hücresi; Minimum inhibisyon konsantrasyon; Sinerjik etki

Geliş Tarihi/Received: 09/01/2023 - Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 19/07/2023

©Telif Hakkı 2024 Flora. Makale metnine www.floradergisi.org web adresinden ulaşılabilir.

Creative Commons Atıf-GayriTicari-AynıLisanslaPaylaş 4.0 Uluslararası Lisansı altında lisanslanmıştır.

Çevrim içi Yayın Tarihi: 22.03.2024

ABSTRACT

Determination of the Synergistic Effect of Nanoparticle Zinc + Zinc Borate Compounds in a Bacterial Infection Model on HepG2 Liver Cell LineDemet ÇELEBİ^{1,2}, Özgür ÇELEBİ³, Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGHİ⁴, Sümeyye BAŞER³, Emine PARLAK⁵¹ Department of Microbiology, Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye² Center of Vaccination and Application, Atatürk University, Erzurum, Türkiye³ Department of Medical Microbiology, Atatürk University Faculty of Medicine, Erzurum, Türkiye⁴ Department of Medical Pharmacology, Şeyh Edebalı University Faculty of Medicine, Bilecik, Türkiye⁵ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Atatürk University Faculty of Medicine, Erzurum, Türkiye

Introduction: Health-care associated infections are a significant cause of mortality and morbidity globally, including in our country. Antibiotic resistance in microorganisms causing nosocomial infections has led to the search for alternative antimicrobials. For this purpose, we aimed to determine the antimicrobial activity of zinc nanoparticles and zinc borate components against resistant microorganisms causing hospital-acquired infections.

Materials and Methods: Minimal inhibitory concentrations (MIC) of zinc nanoparticles and zinc borate compounds were determined and fractional inhibitory concentration (FIC) values were evaluated in a combination study. After creating the HepG2-bacterial infection model, the effects of zinc nanoparticles and zinc borate components were examined in terms of cytotoxic and antioxidant activity.

Results: At a fractional inhibition concentration of 31.25 µg/mL for zinc nanoparticles and 62.5 µg/mL for zinc borate, the strongest synergistic effect was detected on *Klebsiella pneumoniae*. The additive effect was observed most strongly on *Escherichia coli* at a concentration of zinc NP 500 µg/mL + zinc borate 500 µg/mL. It was determined that zinc borate was effective against the *Klebsiella pneumoniae* strain at lower doses than other bacteria. When ranking cell line viability from low to high in the bacterial infection model, the order identified was *Klebsiella*, *MRCNS*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *MRSA*, *E. coli*.

Conclusion: The results obtained show that zinc nanoparticles and zinc borate compounds are promising in terms of antimicrobial activity. The synergy between these two components is particularly effective against *MRSA* and *Klebsiella* bacteria.

Key Words: Zinc borate; Zinc nanoparticle; HepG2 cell; Minimum inhibition concentration; Synergistic effect

GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae ve *Escherichia coli* sağlık hizmeti ilişkili infeksiyonlarda klinik önemi olan gram-negatif bakterilerdir^[1,2]. Hastane kaynaklı bakterilerin antibiyotik maddelerine karşı dirençli oldukları bilinmektedir. Direnç mekanizmaları farklı bakterilerde değişkenlik gösterse de genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi ile gelişen direnç, enterik gram-negatif bakterilerde önemli direnç mekanizmasıdır. Bu enzim en sık *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'de bulunur. Bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde karbapenemler ilk seçilen ajanlardır^[3]. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) dünya genelinde hastane kaynaklı infeksiyonlarda önde gelen etken olup toplum kökenli infeksiyonlarda da önemli bir yere sahiptir. Son zamanlarda MRSA en yaygın kullanıma sahip olan B-laktam sınıfı antibiyotiklere karşı doğal capraz direnç sergilemektedir.^[4] Metisiline dirençli koagülaz negatif staflokoklar (MRKNS), hastanelerde infeksiyonlar açısından

önemli patojenlerdir^[5]. Metisiline dirençli stafilkoklar β-laktamazlara da dirençlidir. Bu nedenle bu bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde glikopeptitlere alternatif uygulanabilecek diğer antibiyotiklerin kullanılması ihtiyacı ortaya çıkmaktadır^[5]. Antibiyotiklere dirençli etkenlerin neden olduğu bu infeksiyonlar hem morbidite ve mortaliteyi arttırmakta hem de hastanede yatış süresinde uzama ve ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir^[6,7]. Belirtilen bu nedenlerden dolayı yeni tedavilerin geliştirilmesi önemli olmaktadır. Günümüzde nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber farklı nanoparçacık ajanlar geliştirilmektedir.

Nanopartiküller (NP'ler) 100 nm'den küçük, biyosidal, mikrobiyal membranlar ile yakın etkileşim halinde ve yüksek yüzey-hacim oranına sahip partiküllerdir^[8,9]. Metal ve metal oksitler gibi inorganik antibakteriyel ajanlar, stabiliteyi nedeniyle organik bileşiğe kıyasla avantajlıdır^[10]. Bu metal oksitler arasında çinko oksit (ZnO), antibakteriyel ajan olarak özel bir ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalarda ZnO enterotoksijenik

Escherichia coli (ETEC)'nin enterositlere yapışmasını engellediği tespit edilmiştir^[11]. Ayrıca ZnO nanopartikülleri (ZnO-NP'ler) antibakteriyel aktivite sergiler ve mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını engeller^[12]. ZnO ayrıca bakteri hücrelerine nano ölçekte nüfuz eder^[13].

Bor bileşikleri antiseptik olarak başta kullanılsa da sonrasında paraziter infeksiyonlarda kullanılmaktadır^[14,15]. Bor molekülü antimikrobiyal etkinliği olan hidrofobik bir elementtir^[16]. Yüzde üçlük borik asitlerin derin yaralara uygulanmasının yoğun bakım ünitelerinde iyileşme ve hastanede kalış süresinin azalmasına katkı sağladığı bildirilmiştir^[16-19]. Yapılan çalışmalarda, bor bileşiklerinin tek başına ve kombine olarak antibakteriyel etkinliği ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olup daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır^[11,18-21,25,32-34].

Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* 700603 SHV18, *Escherichia coli* 25922, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* (MRSA) 33591, MRKNS, *S. saprophyticus* KUEN 712 ve *Streptococcus mitis* 12261 bakterilerine karşı çinko nanopartikül ve çinko borat moleküllerinin etkilerini araştırdık. Elde edilen MİK verileri doğrultusunda fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri belirlendi. FİK verileri ile HepG2 karaciğer hücre hattında kombinasyonun sitotoksik aktiviteleri belirlenerek antioksidan ve immünofloresan parametreleri incelendi.

MATERYAL ve METOD

Klebsiella pneumoniae 700603 SHV18, *Escherichia coli* 25922, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* (MRSA) 33591, MRKNS, *S. saprophyticus* KUEN 712 ve *Streptococcus mitis* 12261 bakteri suşları, çinko nanopartikül (SigmaAldrich, ABD) ve çinko borat (SigmaAldrich, ABD) kullanıldı.

Bileşik Kimyasal Özellikleri

Çinko nanopartikül; linear formül: Zn, molekül ağırlığı: 65.39, Cas numarası: 7440-66-6, form: nanopartikül toz, çözücü madde: Su, pH: 6.95^[19].

Çinko borat; linear formül: Zn₃BO₆, molekül ağırlığı: 313.754, Cas numarası: 10361-94-1, form: Toz, çözücü madde: Su, pH: 6.8-7.5^[20].

Mikrobiyolojik İncelemeler

Tüm bakteri stokları 0.5 mL Triptik Soy Broth (TSB) besiyerine eklenerek, 37°C'de 150 rpm'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda üretildi. Daha sonra üreme olan besiyerinden 0.5 mL alınarak taze TSB broth'a ekimi yapılarak stok besiyeri çalışma için hazır hale getirildi.

Çinko nanopartikül, çinko borat bileşiklerinin suşlara karşı MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi^[15,21]. Çinko nanopartikül ve çinko boratın seri dilüsyonları, 2 mg/mL (40 mM) ve 2 mg/mL (40 mM) arasında değişen konsantrasyonlarda mikrodilüsyonda hazırlandı. Doz aralıkları Yılmaz ve arkadaşları ile Çelebi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar referans alınarak düşük-uygun doz aralığı ve hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite göstermeyen 1024-0.97 µg/mL kadar seri dilüsyonlar hazırlandı ve minimal inhibisyon konsantrasyonları belirlendi^[15,21]. Çinko nanopartikül ve çinko borat bileşikleri 1:1 oranında çift distile su içerisinde çözdürüldü.

Minimum inhibisyon konsantrasyon tayini yönteminde Eozin Metilen Blue ve kanlı agardan alınan mikroorganizmalar çalışmaya alınıp 24 saatlik taze kültür yapılmıştır. Üreyen koloniler, 0.5 Mc Farland (5 x 10⁵ CFU/mL) bulanıklığında hazırlandı. Daha sonra steril 96 oyuklu mikropakanın 1 ile 12 arasındaki tüm oyuklarına 0.5 mL Tryptic Soy Broth ortamı eklendi. İlk olarak birinci kuyuya ilgili bor bileşiğinden (1024-0.97 µg/mL) 0.5 mL ilave edildi ve 10. kuyuya 1:1 oranında 0.5 mL dilüsyon yapıldı. Daha sonra 10. kuyucuğa 0.5 mL bakteri süspansiyonu eklendi. Kuyuya bakteri kontrolü sadece bakteri süspansiyonu ve 12. kuyuya kimyasal bileşik eklendi. Daha sonra mikropaka parafilm ile kaplandı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Büyümenin olmadığı son kuyu, MİK değeri olarak belirlendi^[15,21].

Elde edilen MİK verilerine bağlı olarak en etkili FİK sonuçları tespit edildi.^[21]

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) ve European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST) standartlarının esas alındığı antibiyotik kombinasyonlarının in-vitro etkinlik belirleme prensibi ile uygulanmaktadır. Bu esas itibari ile ilaçların tek başına kullanıldığında elde edilen etki ilaçların toplamından daha yüksek

ise sinerjistik etkileşim, toplamına eşit ise aditif etkileşim, tek ilaç ile elde edilen sonuca eşit ise etkisiz durum (indifference), her iki ilacın etkisinden daha düşük ise antagonistik etkileşim (antagonizma) olarak tanımlanmaktadır^[22]. Sakuolas ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alınarak kombinasyonların etkinliği aşağıda yazılan formüle göre belirlenmiştir^[21,22].

A: Kombinasyonda kullanılan Antimikrobiyal 1

B: Kombinasyonda kullanılan Antimikrobiyal 2

FİK indeksinin hesaplanması:

$$FİK A = \frac{B'nin\ varlığında\ A'nın\ MİK\ sayısal\ değeri}{Tek\ başına\ A'nın\ MİK\ sayısal\ değeri}$$

$$FİK B = \frac{A'nın\ varlığında\ B'nin\ MİK\ sayısal\ değeri}{Tek\ başına\ B'nin\ MİK\ sayısal\ değeri}$$

Σ FİK indeksi = FİK A + FİK B

Σ FİK indeksi ≤ 0.5 : sinerji

Σ FİK indeksi > 0.5 ve < 1 : aditif

Σ FİK indeksi ≥ 1 ve ≤ 4 : etkisiz

Σ FİK indeksi > 4 : antagonizma

Mikrodilüsyon panelleri için hazırlanan paneller çinko borat ve nanopartikül çinko bileşiklerinin son konsantrasyonları hesaplanarak solüsyonlar hazırlandı. Kuyucukta bulunması istenen son konsantrasyonun dört katı yoğunlukta olan ara sulandırma hazırlandı. 100 μ L MHB buyyon besiyeri tüm kuyucuklara dağıtıldı. İlk olarak çinko borat 100 μ L yarı yarıya dilüe edilerek dağıtıldı, sonra çinko nanopartikül 1024 μ g \cdot mL⁻¹ dilüe edilen kuyucuklara 100 μ L eklendi. Negatif kontrol olarak besiyeri ve pozitif kontrol olarak bakteri kuyucukları hazırlandı. Negatif kontrol kuyucuğu hariç, antimikrobik ajanlar 5 μ L olacak şekilde plaklara dağıtıldı. Bu işlem diğer çinko borat ve çinko nanopartikül için tekrar edilerek üç tekrar şeklinde uygulandı^[21].

HepG2 Hücre Hazırlama ve MTT analizi

HepG2 hücre (HB-8065, ATCC) kültürleri, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalından temin edildi. Kısaca, hücreler taze ortam (Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal siğir serumu (FBS) %10 ve antibiyotik %1 (penisilin, streptomisin ve amfoterisin B) (Millipore, SigmaAldrich, ABD) içinde süspansiyon edildi. Hücreler daha sonra 24 kuyucuklu plakalara (Corning, ABD) ekildi ve inkübatörde

(%5 CO₂; 37°C) tutuldu. Hücre plaklarındaki hücre oranı %85'e ulaştıktan sonra bakteri süspansiyonu hücre kültürüne ilave edildi. Otuz dakika inkübasyon sonrası, tedavi grupları eklenerek 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Deney süresi sonunda, her bir kuyucuğa 10 μ L MTT (5 mg/mL) solüsyonu (Millipore, SigmaAldrich, ABD) ilave edildi ve numuneler dört saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 μ L DMSO (SigmaAldrich, ABD) eklendi. Çözeltilerin optik yoğunluğu, bir Multiskan™GO mikropilaka spektrofotometresi kullanılarak 570 nm'de okundu^[21].

İmmüno Floresan İncelemeler

Hücre kültürü ekimi yapılan hücreler paraformaldehit solüsyonunda 30 dk tespit edildi. Ardından hücreler %3'lük H₂O₂'de 5 dk bekletildi. Phosphate buffer solüsyon (PBS) ile yıkanan hücrelere %0.1 Triton-X solüsyonu damlatılarak 15 dk bekletildi. İnkübasyon süresinin ardından hücrelere protein blok damlatıldı ve 5 dk karanlık ortamda bekletildi. Ardından oksidatif DNA hasarını göstermek amacıyla kullanılan primer antikor olan 8-OHdG antikorunu kullanıldı. Bu antikor (8-OHdG kat no= sc-66036, sulandırma oranı= 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edildi. Sekonder işaretleyici olarak immüno floresan sekonder antikor kullanılıp (FITC Cat no= ab6785, dilüent oranı= 1/500, UK) karanlık ortamda 45 dk bekletildi. Daha sonra kesitlere mounting medium'lu DAPI (Kat no= D1306, sulandırma oranı: 1/200, UK) damlatılıp 5 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra kesitler lamel ile kapatıldı. Boyanan kesitler floresans ataçmanlı mikroskopta incelendi (Zeiss Axio, Almanya)^[21].

Boyamalar sonucu elde edilen resimlerden pozitif boyanmaların yoğunluğunu belirlemek amacıyla; her resimden beş adet rastgele alan seçildi ve ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirmeleri yapıldı. Veriler, alan %'si için ortalama ve standart sapma (ortalama \pm SS) cinsinden istatistiksel olarak tanımlandı. Pozitiflik veren immüno reaktif hücreleri ve immüno pozitif boyanmış alanları sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak için One-Way ANOVA ve Tukey testleri yapıldı. Test sonucunda < 0.05 p değeri anlamlı olarak kabul edildi ve veriler ortalama \pm SS olarak sunuldu.

BULGULAR

Minimum İnhibitör Konsantrasyon

Çinko nanopartikülün (Zn NP) ve çinko borat (ZB) bileşenlerinin minimum inhibisyon konsantrasyon verileri Tablo 1'de sunulmaktadır. Çinko nanopartikülün (Zn NP) *Klebsiella pneumoniae*'ya 0.97 µg/mL, *Enterococcus faecalis*'e 1.95 µg/mL ve MRSA'ya karşı 3.90 µg/mL etki gösterirken *Escherichia coli*, Metisiline dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus mitis*'e karşı etki göstermediği görülmektedir. Çinko borat (ZB) molekülünün MİK'i incelendiğinde ise kullandığımız standart bakteri suşları üzerinde bir etkisi olmadığı belirlendi (Tablo 1).

Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi

Çinko nanopartikülün (Zn NP) ve çinko borat (ZB) bileşenlerinin FİK indeksi verileri Tablo 2'de sunulmuştur. Çinko NP + çinko boratın *Escherichia coli*'ye karşı aditif etki konsantrasyonları sırası ile; 500 µg/mL + 500 µg/mL (4.03), 250 µg/mL + 62.5 µg/mL (4.10), 125 µg/mL + 31.25 µg/mL (4.01), 250 µg/mL + 15.62 µg/mL (4.20)'de görülmüştür. 31.25 µg/mL + 31.25 µg/mL (0.39) konsantrasyonlarında sinerjik etki sergilerken diğer konsantrasyonlarda

ise etki görülmemiştir (Tablo 2). Çinko NP + çinko boratın *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı aditif etki konsantrasyonları sırası ile ; 31.25 µg/mL + 125 µg/mL (0.60)'de görülmüştür. 31.25 µg/mL + 62.5 µg/mL (0.3) konsantrasyonlarında sinerjik etki sergilerken diğer konsantrasyonlarda ise etki görülmemiştir (Tablo 2). Çinko NP + çinko boratın *Enterococcus faecalis*'e karşı; konsantrasyonların hiçbirinde aditif etki görülmemiştir. Ancak 31.25 µg/mL + 31.25 µg/mL (0.21) konsantrasyonlarında sinerjik etki tespit edilmiş olup diğer konsantrasyonlarda ise etki görülmemiştir. Çinko NP + çinko boratın *Klebsiella pneumoniae* üzerinde; çinko NP 31.25 µg/mL + çinko borat 125 µg/mL (0.60) konsantrasyonlarında aditif etki, çinko NP 31.25 µg/mL + çinko borat 62.5 µg/mL (0.3) konsantrasyonlarında sinerjik etki; diğer konsantrasyonlarda ise etki görülmemiştir (Tablo 2). Çinko NP + çinko boratın MRSA 29213, metisiline dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus mitis* üzerinde; konsantrasyonların hiçbirinde aditif etki görülmemiştir. 31.25 µg/mL + 31.25 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla (0.32), (0.15) ve (0.33) oranlarında sinerjik etki görülmüş olup ve diğer konsantrasyonlarda ise etki görülmemiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Çinko ve çinko boratın standart suşlar üzerinde minimal inhibisyon konsantrasyonu

Standart suş/Bileşik	Çinko	Çinko Borat (ZB)
<i>Escherichia coli</i> 25922	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603 SHV18	0.97 µg/mL	>1024 µg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	1.95 µg/mL	>1024 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 33591	3.90 µg/mL	>1024 µg/mL
Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) <i>S. saprophyticus</i> KUEN 712	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL
<i>Streptococcus mitis</i> 12261	>1024 µg/mL	>1024 µg/mL

Tablo 2. Çinko ve çinko boratın standart suşlar üzerinde FİK İndeksi

Standart suş/FİK indeksi	Sinerjik Etki
<i>Escherichia coli</i> 25922	Zn 31.25 µg/mL + ZB 31.25 µg/mL (0.39)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603 SHV18	Zn 31.25 µg/mL + ZB 62.5 µg/mL (0.3)
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	Zn 31.25 µg/mL + ZB 31.25 µg/mL (0.21)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 33591	Zn 31.25 µg/mL + ZB 31.25 µg/mL (0.32)
Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) <i>S. saprophyticus</i> KUEN 712	Zn 31.25 µg/mL + ZB 31.25 µg/mL (0.15)
<i>Streptococcus mitis</i> 12261	Zn 31.25 µg/mL + ZB 31.25 µg/mL (0.33)

MTT analiz bulguları

Yirmi dört saat sonunda Zn NP + ZB'lerin (31.2 µg/mL) + bakteri gruplarının sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlendi (Şekil 1). Tüm veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubunun hücre canlılık oranının %100 olduğu gözlemlendi. DMSO kontrol grubu, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık göstermedi ($p > 0.05$). Bakteri suşlarının oluşturduğu toksisite Şekil 1'de olduğu gibi en yüksek *Klebsiella* ve MRKNS gruplarında görülmektedir (sırasıyla %62 ve %64 oranında) ($p < 0.001$). Canlılık oranını bakteri soylarına göre düşükten yüksek canlılık oranına göre *Klebsiella*, MRKNS, *Enterococcus*, *Streptococcus*, MRSA, *E.coli* şeklinde sıralanmaktadır. Tedavi gruplarımıza bakıldığında, Zn NP ve ZB hücre canlılığında artışa neden oldukları ve bakteri kaynaklı toksisiteyi ortadan kaldırdıkları görülmektedir. Yaptığımız analize göre (tedavi grubu-bakteri grubu) en fazla etkinlik sırasıyla MRKNS, *Klebsiella*, *Enterococcus* gruplarında tespit edilmiştir (%19, %12 ve %11 olarak) (Şekil 1) ($p < 0.001$).

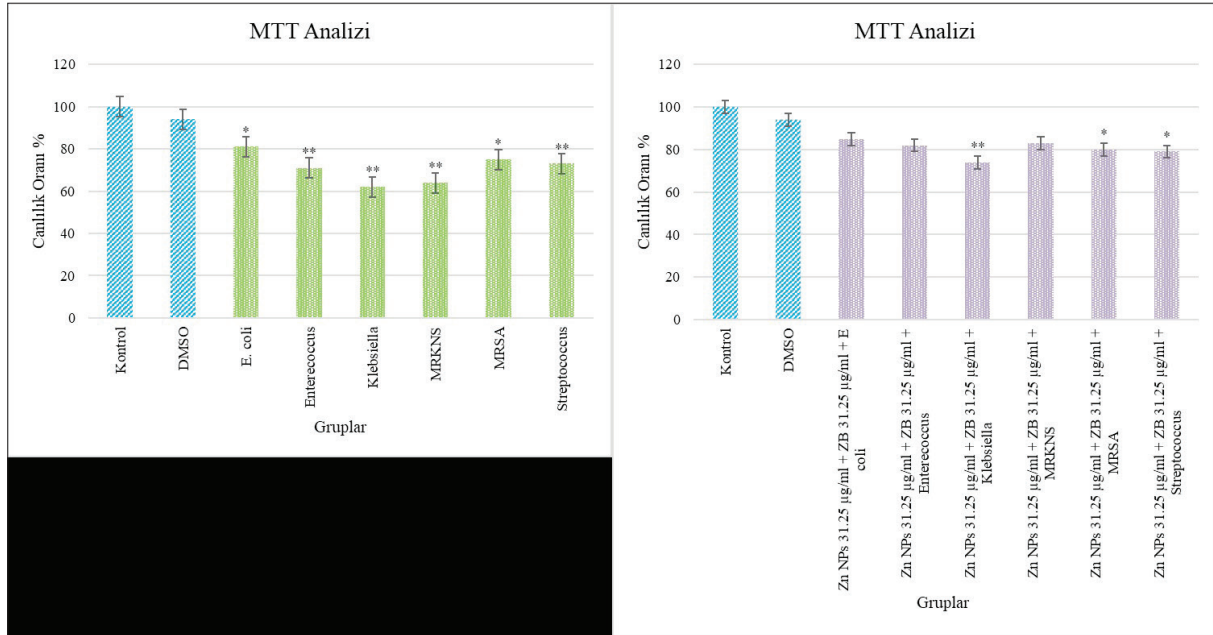
İmmüno Floresan Analiz

DNA hasarının oluşumunu (8-OHdG) incelemek için immüno floresan analiz uygulandı (Şekil 1). Yapılan değerlendirmede kontrol grubunda 8-OHdG

ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi. DMSO kontrol grubu (pozitif kontrol olarak) 8-OHdG ekspresyonu istatistik olarak kontrol grubuyla anlamlı farklılık görülmedi. Bakteri gruplarına baktığımızda *E. coli*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, MRKNS ve *Streptococcus* - HepG2 gruplarında çok şiddetli düzeyde intrasitoplazmik 8-OHdG ekspresyonlarına rastlanıldı. Tedavi gruplarında ise Zn NP ve ZB eklenmesi ile beraber DNA hasarının azaldığı görülmektedir. Değerlendirmeler sonucunda Zn NP+ ZB + *E. coli* grubunda orta düzeyde, Zn NP + ZB + *Enterococcus* grubunda hafif düzeyde, Zn NP + ZB + *Klebsiella* grubunda orta düzeyde, Zn NP + ZB + MRKNS grubunda orta düzeyde, Zn NP + ZB + MRSA grubunda orta düzeyde, Zn NP + ZB + *Streptococcus* grubunda orta düzeyde etki etmiştir. İmmüno floresan bulguların analiz verileri istatistiksel analizleri Tablo 3'te sunuldu.

TARTIŞMA

Çinko nanopartikül küçük boyutları, yüksek konsantrasyonları sayesinde güçlü bakterisidal etkiye sahiptir.^[23-25] ABD Gıda ve İlaç Dairesi (21 CFR 182.8991) tarafından genellikle güvenli bir malzeme olarak kabul edildiğinden, güvenliği ve biyoyoumluluğu nedeniyle gıda, kozmetik ve tıpta yaygın olarak kullanımında güvenli bir malzeme olarak bildirilmektedir.^[25,26]



Şekil 1. MTT analiz sonuçları sunulmaktadır.

* $p < 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı, ** $p < 0.001$ istatistiksel açıdan anlamlı.

Tablo 3. İmmünofloresan bulguları

	8-OHdG Ekspresyon Seviyeleri
Kontrol	19.84 ± 0.74
DMSO	18.53 ± 0.92
<i>E. coli</i>	103.48 ± 1.26**
<i>Enterococcus</i>	80.06 ± 1.02 ^{αα}
<i>Klebsiella</i>	108.15 ± 1.45 ^{ββ}
MRKNS	102.26 ± 1.89 ^{aa}
MRSA	105.98 ± 2.09 ^{bb}
<i>Streptococcus</i>	103.24 ± 1.74 ^{xx}
Zn NP + ZB + <i>E. coli</i>	49.82 ± 1.23*
Zn NP + ZB + <i>Enterococcus</i>	37.65 ± 1.18 ^α
Zn NP + ZB + <i>Klebsiella</i>	51.18 ± 1.84 ^β
Zn NP + ZB + MRKNS	52 ± 1.56 ^a
Zn NP + ZB + MRSA	51.37 ± 1.33 ^b
Zn NP + ZB + <i>Streptococcus</i>	48.66 ± 1.42 ^x

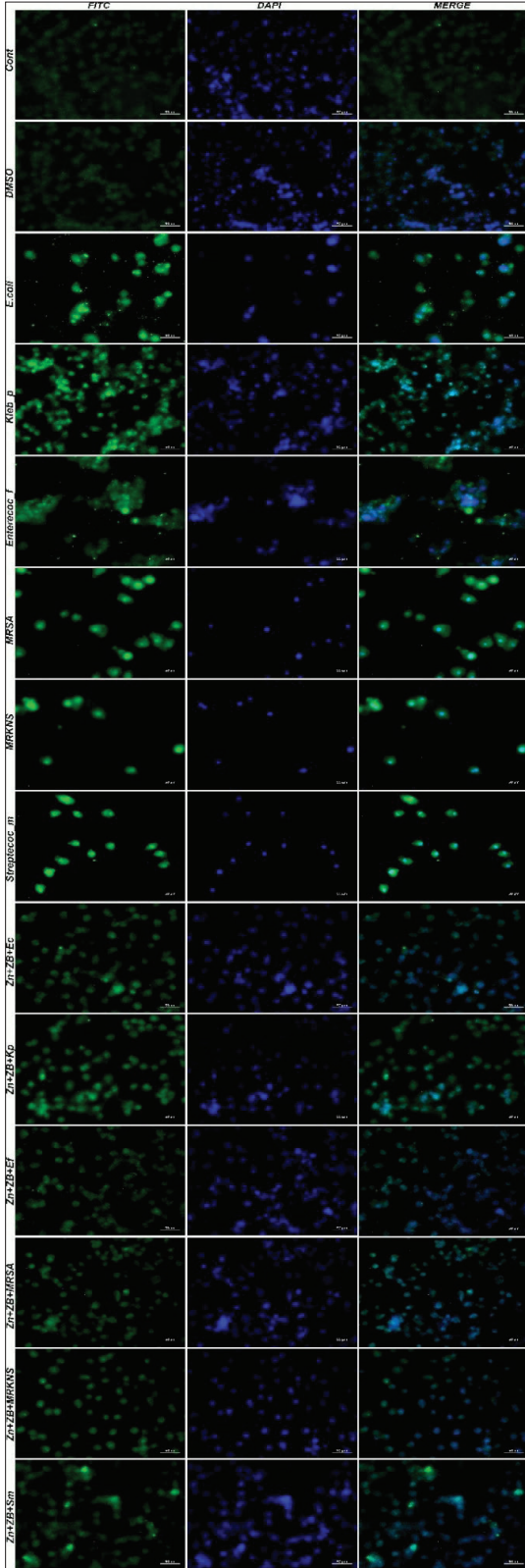
Farklı sayıdaki aynı ifadeler istatistiksel olarak anlamlı farkı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

İnorganik antimikrobiyaller arasında antimikrobiyal aktivitesi güçlü etkiye sahip olan çinko nanopartikül, reaktif oksijen türlerinin yüksek oksidatif hasarı sayesinde mikroorganizmalara güçlü etki etmektedir^[27]. Bu etki çinko iyonlarının çözülmesi sonucunda hücre hasarına sebep olan oksidatif strese bağlanma (ROS) prensibine göre oluşmaktadır^[28-31]. Çalışmamızda nanomolekül ve çinko bor karışımı bileşiğinin çinko NP + çinko borat 31.25 µg/mL + 62.5 µg/mL fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonunda en güçlü sinerjik etki *Klebsiella pneumoniae* üzerinde tespit edildi. Aditif etki ise en güçlü olarak çinko NP 500 µg/mL + çinko borat 500 µg/mL konsantrasyonunda *Escherichia coli* 25922 üzerinde görülmüştür.

Borun çeşitli türevleri üzerine yapılan bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter septicus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri gruplarına karşı aktivitesi değerlendirilmiştir^[15]. Çalışmalarda *Staphylococcus aureus* ve *Acinetobacter septicus*'un bor bileşiklerine *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dan daha duyarlı oldukları, bor tarafından biyofilmlerin inhibe edildikleri sonucuna varılmıştır^[15]. Yapılan bir başka çalışmada ise Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* kolonizasyonuna engel olmak amacı ile uygulanan borik asitin lokal etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Bu sayede

cerrahi ve/veya ileri antibiyotik tedavisine yardımcı olabileceği bildirilmiştir^[31]. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı çinko katkılı borat türevinin antibakteriyel aktivitesinin incelendiği bir başka çalışmada ise; çinko iyonlarının bakterisidal ve bakteriyostatik etki gösterdiği bildirilmiştir^[32]. Hem borik asit hem de boraksın *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter septicus* DSM 19415, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği çalışmada sadece borik asitin değil, bor türevlerinin de önemli olduğu ifade edilmiştir^[15]. Protezlerde enfeksiyona neden olan koagülaz (-) ve koagülaz (+) stafillokok suşları üzerinde borik asidin etkinliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada borik asidin biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir^[35].

Bor türevlerinin antibakteriyel olumlu sonuçlar gösterdiği çalışmalar bulunmaktadır^[21,31,33,34]. Çinko NP + çinko boratın enfeksiyon araştırmalarında kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bileşiklerin kombine antimikrobiyal etkinliği hastane ilişkili enfeksiyonların engellenmesi için umut vadeci olabilir^[21,31,33,34]. Bu çalışma çinko NP ve çinko borat bileşiklerinin *Klebsiella pneumoniae* patojenine etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışma olması ve hücre düzeyinde sitotoksik aktivitesinin belirlenmiş olması ile değer arz etmektedir.



Şekil 2. Hücre kültürü, 8-OHdG ekspresyonları, FITC, IF, Bar= 50 µm.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayına gerek yoktur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: DÇ, ÖÇ, AT, SB

Analiz/Yorum: Tüm yazarlar

Veri Sağlama: Tüm yazarlar

Yazım: DÇ, ÖÇ, AT

Gözden Geçirme ve Düzeltme: DÇ

Onaylama: Tüm yazarlar

KAYNAKLAR

1. Aydemir Ö, Demiray T, Köroğlu M, Aydemir Y. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. *Online Türk Sağlık Bilimleri Derg* 2016;1:1-8.
2. Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* 2008;28:235-49. <https://doi.org/10.1592/phco.28.2.235>
3. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009;73:345-54. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021>
4. Oliveira DC, de Lencastre H. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: A surprising observation. *PLoS One* 2011;6:e23287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023287>
5. Gündoğuş N, Gül K, Dal T, Akpolat N. Methicillin-resistant *Staphylococcus* strains isolated from adult intensive care units with E-test MIC values of different antibiotic research. *Dicle Tıp Derg* 2019;46:51-64. <https://doi.org/10.5798/dicletip.534830>
6. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
7. Vasudevan A, Mukhopadhyay A, Li J. Prediction tool for nosocomial multi-drug resistant gram-negative bacilli infections in critically ill patients prospective observational study. *BMC Infect Dis* 2014;25:615. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0615-z>
8. Desselberger U. Emerging and re-emerging infectious diseases. *J Infect* 2000;40:3-15. <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0624>

9. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res* 2010;89:1175-86. <https://doi.org/10.1177/0022034510377794>
10. Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J Microbiol Methods* 2003;54:177-82. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00037-X)
11. Roselli M, Finamore A, Garaguso I, Britti MS, Mengheri E. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *E. coli*. *J Nutr* 2003;133:4077-82. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4077>
12. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fievet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett* 2006;6:866-70. <https://doi.org/10.1021/nl052326h>
13. Irzh A, Genish I, Klein L, Solovoyov LA, Gedanken A. Synthesis of ZnO and Zn nanoparticles in microwave plasma and their deposition on glass slides. *Langmuir* 2010;26:5976-84. <https://doi.org/10.1021/la904499s>
14. Soriano-Ursua MA, Das BC, Trujillo-Ferrara JG. Boron-containing compounds: Chemo-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert Opin Ther Pat* 2014;24:485-500. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.881472>
15. Yilmaz MT. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J Med Sci* 2012;42:1423-9. <https://doi.org/10.3906/sag-1205-83>
16. Nzietchueng RM, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P, Hess K. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J Trace Elem Med Biol* 2002;16:239-44. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80051-7)
17. Borrelly J, Blech M, Grosdidier G, MartinThomas C, Hartemann P. Contribution of a 3% solution of boric acid in the treatment of deep wounds with loss of substance. *Ann Chir Plast Esthet* 1990;36:65-9.
18. Doğan A, Demirci S, Çağlayan AB, Kılıç E, Günal MY, Uslu Ü, et al. Sodium pentaborate pentahydrate and pluronic containing hydrogel increases cutaneous wound healing in vitro and in vivo. *Biol Trace Elem Res* 2014;162:72-9. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0104-7>
19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Record for SID 24880904, Source: SigmaAldrich-Aldrich, 2022.
20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Record for SID 329750498, Source: SigmaAldrich-Aldrich, 2022.
21. Celebi D, Taghizadehgalehjoughi A, Baser S, Genc S, Yilmaz A, Yeni Y, et al. Effects of boric acid and potassium metaborate on cytokine levels and redox stress parameters in a wound model infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Med Rep* 2022;26:1-11. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12809>
22. Sakoulas G, Olson J, Yim J, Singh NB, Kumaraswamy M, Quach DT, et al. Cefazolin and ertapenem, a synergistic combination used to clear persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6609-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01192-16>
23. Demirci S, Doğan A, Karakuş E, Halıcı Z, Topçu A, Demirci E, et al. Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biol Trace Elem Res* 2015;168:169-80. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0338-z>
24. Seaberg J, Montazerian H, Hossen MN, Bhattacharya R, Khademhosseini A, Mukherjee P. Hybrid nanosystems for biomedical applications. *ACS Nano* 2021;15:2099-142. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09382>
25. Maruthapandi M, Saravanan A, Das P, Natan M, Jacobi G, Banin E, et al. Antimicrobial activities of Zinc-Doped CuO microparticles decorated on polydopamine against sensitive and antibiotic-resistant bacteria. *ACS Appl Polym Mater* 2020;2:5878-88. <https://doi.org/10.1021/acscpm.0c01104>
26. Zubair N, Akhtar K. Morphology controlled synthesis of ZincO nanoparticles for in-vitro evaluation of antibacterial activity. *Trans Nonferrous Met Soc China* 2020;30:1605-14. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(20\)65323-7](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(20)65323-7)
27. Jiang S, Lin K, Cai M. ZincO nanomaterials: Current advancements in antibacterial mechanisms and applications. *Front Chem* 2020;8:580. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00580>
28. Untracht ZT, Ozcan A, Santra S, Kang EH. SDS-PAGE for monitoring the dissolution of zinc oxide bactericidal nanoparticles (Zinkicide) in aqueous solutions. *ACS Omega* 2020;5:1402-7. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02893>
29. Schubert DM. Hydrated zinc borates and their industrial use. *Molecules* 2019;24:2419. <https://doi.org/10.3390/molecules24132419>
30. Zhang W, Guo S, Han S, Yang Z, Pan S. The first mixed calcium zinc borate with a flexible [B8 O17] fundamental building block and short UV cutoff edge. *Chemistry* 2021;27:12047-51. <https://doi.org/10.1002/chem.202101647>
31. Güzel Y, Gölge UH, Göksel F, Vural A, Akçay M, Elmas S, et al. The efficacy of boric acid used to treat experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An in vivo study. *Biol Trace Elem Res* 2016;173:384-9. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0662-y>
32. Schuhlader K, Stich L, Schmidt J, Steinkasserer A, Boccaccini AR, Zinser E. Cu, Zinc doped borate bioactive glasses: Antibacterial efficacy and dose-dependent in vitro modulation of murine dendritic cells. *Biomater Sci* 2020;8:2143-55. <https://doi.org/10.1039/C9BM01691K>

33. Çelebi Ö, Çelebi D, Taghizadehghalehjoughi A, Başer S, Güler MC, Yıldırım S. Evaluation of the effect of the combination of boron compounds on chronic liver disease. *J Contemporary Med* 2023;13:163-9. <https://doi.org/10.16899/jcm.1176975>
34. Çelebi Ö, Çelebi D, Taghizadehghalehjoughi A, Başer S, Güler MC, Yıldırım S. The antibacterial effect of boron compounds and evaluation of the effects on biofilm formation in the infection model of *Klebsiella pneumoniae* on the HepG2 cell line. *J Contemporary Med* 2023;13:12-8. <https://doi.org/10.16899/jcm.1176900>
35. Batmaz G. Protez çevresi enfeksiyonlarından elde edilen klinik suşlar üzerinde geçici dolguda kullanılan düşük doz vankomisin, gentamisin ve borik asitin *in vitro* etkinliği. Uzmanlık Tezi. 2012.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Demet ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi,

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Erzurum, Türkiye

E-posta: celebiidil@atauni.edu.tr