



# Antibakteriyel Fotodinamik Terapi Sağlıklı Keratinosit Hücrelerini Nasıl Etkiler?

## How Does Antibacterial Photodynamic Therapy Affect Healthy Human Keratinocyte Cells?

Gülce Kadıköylü\_1, Günnur Onak\_2  
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi  
İzmir, Türkiye  
[gulce\\_kadikoylu@hotmail.com](mailto:gulce_kadikoylu@hotmail.com)\_1,  
[gunnur.onak@ikc.edu.tr](mailto:gunnur.onak@ikc.edu.tr)\_2

Ozan Karaman\_3, Nermin Topaloğlu\_4  
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi  
İzmir, Türkiye  
[ozan.karaman@ikc.edu.tr](mailto:ozan.karaman@ikc.edu.tr)\_3,  
[nermin.topaloglu@ikc.edu.tr](mailto:nermin.topaloglu@ikc.edu.tr)\_4

**Özetçe—** Enfeksiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere bakterilerin direnç geliştirmesi ve diğer tedavi yöntemlerinin yetersizliği insan ve hayvan sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır. Araştırmacılar alternatif bir tedavi olarak fotodinamik terapi (FDT) yöntemi üzerinde durmaya başlamışlardır. Bu tedavi şekli ışık, ışığa duyarlı ilaç (fotosensitizan) ve oksijenin etkileşimi sonucu toksik ürünlerin oluşarak patojenlerin öldürülmesine dayanır. Fotodinamik terapi sırasında yara iyileşmesinde önemli rolü bulunan sağlıklı hücrelerin nasıl etkilendiği de üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. Bu bakımdan, bu çalışmada bazı patojenler üzerindeki öldürücü etkisi daha önce kanıtlanmış olan indosiyanın yeşil maddesinin ve 808-nm dalga boyunda ışına yapan diyot lazerin sağlıklı insan deri keratinosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kliniğe taşınmak istenen FDT yönteminde sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek ama patojenler üzerinde sitotoksik etkiler gösterecek ışık dozu ve ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesi bu araştırmanın temel amacıdır. Uygulamalardan elde edilen sonuçlara göre; 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile 4- 125 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda İSG kullanılarak yapılan FDT uygulamaları keratinosit hücrelerine zarar vermemiştir. 150 µg/ml konsantrasyon ise tüm uygulamalarda hücreleri öldürmüştür. 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu uygulanması keratinosit hücrelerine tüm İSG konsantrasyonlarında zarar vermiştir.

**Anahtar Kelimeler — Fotodinamik Terapi; 808-nm; İndosiyanın Yeşil; Antibakteriyel; Keratinosit**

**Abstract—** Rapid increase in antibiotic resistance and the inadequacy of other antibacterial treatments are serious risk factors for human and animal health worldwide. Researchers have begun to focus on photodynamic therapy (PDT) as an alternative treatment. This treatment is based on the killing of pathogens by the formation of toxic products after the interaction of light with light-sensitive drugs (photosensitizer) and oxygen. It is also important to emphasize how antibacterial photodynamic

therapy affects healthy cells which play an important role in wound healing process. In this regard, the previously proven antibacterial effect of indocyanine green and 808-nm on healthy human keratinocyte cells was investigated in this study. The main objective of this research is to determine the concentrations of indocyanine green and the energy dose of laser light which are destructive to certain pathogens and not harmful to healthykeratinocytes. According to the results of this study, PDT applications using ICG at 4-125 µg/ml concentrations and 84 J/cm<sup>2</sup> energy dose did not damage keratinocyte cells significantly. The concentration of 150 µg/ml ICG killed the cells in all applications. Application of 252 J / cm<sup>2</sup> energy dose damaged keratinocyte cells with all ICG concentrations.

**Keywords — Photodynamic Therapy, 808-nm; Indocyanine Green; Antibacterial; Keratinocyte**

### I. GİRİŞ

Uzun süreli ve yüksek miktarlarda antibiyotik kullanımının mikrobiyotaya üzerindeki olumsuz etkileri ve antibiyotik direncin artma potansiyeli nedeniyle antibiyotiklerin kullanımı klinik uygulamalarda istenmemektedir [1]. Bu durum araştırmacıları alternatif tedavi yöntemleri bulmaya yöneltmiştir. Bu alanda antibakteriyel fotodinamik terapi (FDT) konvansiyonel antimikrobiyal tedaviye alternatif olarak klasik yöntemlerle kombinasyon halinde veya yalnız başına çok az yan etkileri olan bir tedavi şekli olarak ortaya çıkmaktadır [1,6].

Fotodinamik terapi; ışık, fotosensitizan olarak adlandırılan ışığa duyarlı madde ve oksijenin etkileşimi prensibine dayanan bir tedavi şeklidir [2,8]. Fotosensitizan molekülleri spesifik dalga boyuna sahip bir ışık kaynağı tarafından uyarılarak hedef hücrelerde oldukça toksik olan tekli oksijen üretimine yol açar ve oksidatif hasar yoluyla hedef hücrelerin ölümüne yol açar [3,7].



Enfeksiyon tedavisinde alternatif tedavi yöntemi olarak son yıllarda yoğun şekilde araştırılan fotodinamik terapinin antibakteriyel etkisinin yanısıra yara iyileşmesinde önemli fonksiyonları bulunan sağlıklı deri hücrelerine yaptığı etkilerinin araştırılması da büyük önem taşımaktadır. Fotodinamik terapi farklı hücre türleri üzerinde farklı etkiler gösterebilir. Bakteriler hücre duvarına sahiptirler ve bu sebeple fotosensitizanın bu hücrelerle olan etkileşimi hücre duvarı olmayan hücrelere göre farklılık göstereceği ve böylece bakteriler üzerindeki antibakteriyel fotodinamik terapi uygulamalarının ökaryot hücreler üzerinde aynı sonucu vermeyeceği düşünülmektedir.

Kliniğe taşınmak istenen antibakteriyel FDT uygulamasında sadece patojenlerin yüksek oranda öldürülmesi değil sağlıklı hücreler üzerinde de zararlı etkilerinin minimuma indirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu çalışmada antibakteriyel etkisi bazı patojenler üzerinde kanıtlanmış olan indosiyanın yeşil maddesinin ve onu uyaran 808-nm dalga boyuna sahip lazerin [4] sağlıklı insan deri keratinosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

## II. YÖNTEM

### A. Hücre Kültürü

Bu çalışmada İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Laboratuvarlarında bulunan sağlıklı insan deri keratinosit hücre hattı (HS2) kullanılmıştır. Öncelikle hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak açılmıştır ve 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültürü şişelerinde DMEM besiyortamı, ısıyla inaktive edilmiş 10%'luk FBS çözümü, penisilin ve streptomisin kullanılarak kültüve edilmiştir. Hücreler %95 hava %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde tek tabaka halinde %80 konflüansa ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Gerekli hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücreler 2-4 pasajlamadan sonra fotodinamik terapi uygulamasına hazır hale gelmiştir.

### B. Işığa Duyarlı Madde

Bu çalışmada 808-nm dalgaboyundaki ışığı soğurabilen İndosiyanın yeşil (İSG) maddesi kullanılmıştır. Her deney öncesinde taze olarak hazırlanan 4, 10, 25, 50, 100, 125, 150 µg/ml konsantrasyonlarındaki İSG çözümünün keratinosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İSG maddesinin hazırlanmasındaki tüm aşamalar İSG'nin etkisini kaybetmemesi için karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

### C. Lazer Cihazı ve Optik Düzenek

Bu deneyde 808-nm dalgaboyunda ışımaya yapan diyot lazer kullanılmıştır. İSG yakın kızılötesi ışıkta en iyi soğurma yaptığı için bu dalgaboyuna sahip lazer kullanılmıştır. Lazer ve fotodinamik terapi deney gruplarında, 84 J/cm<sup>2</sup> ve 252 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda lazer uygulaması gerçekleştirilmiştir.

### D. Deneysel Prosedür

Bu çalışmada dört ayrı deney grubu oluşturulmuştur; Kontrol, Lazer, İSG ve FDT gruplarıdır. Hücreler inkübatörden alınarak 96 kuyucuklu plakalara deney grupları göz önünde bulundurularak ekilmiştir. Bir gece boyunca plaka yüzeyine tutunmaları için 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plakalarda bulunan besiyortamları PBS çözümü ile

yıkanmıştır. İSG ve FDT gruplarına belirli konsantrasyonlarda hazırlanan İSG solüsyonları eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol ve Lazer gruplarındaki besiyortamları tazesiyle değiştirilmiş ve İSG eklenmemiştir. Lazer ve FDT gruplarındaki plakalar 84 J/cm<sup>2</sup> ve 252 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda ışığa maruz bırakılmıştır. Bütün bu uygulamalar karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

### E. Uygulamalar Sonrasında Yapılan Analizler

1) *MTT Analizi*: Yapılan uygulamalardan sonra hücre canlılığını tespit etmek için MTT analizi yapılmıştır. Bunun için 96 kuyucuklu plakalarda deneyi gerçekleştirdiğimiz hücrelerin üzerine 100 µl MTT çözümü eklenmiştir. 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra kuyucukların içinden çözümü çekilerek DMSO eklenmiştir. 5-10 dakika bekleme süresinden sonra mikropilaya okuyucuda kuyucukların absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değerler kontrol grubuna göre canlı hücre sayısını vermiştir.

2) *Akridin Turuncusu / Propidyum İyodür Boyaması*: Yapılan uygulamaların hücre canlılığı üzerindeki etkisini mikroskopla incelemek amacıyla bu boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Uygulamalardan sonra AO/PI stok çözümü gerekli oranda PBS ile seyreltilerek deney çözümü hazırlanmıştır. Plaka kuyucuklarındaki hücrelerin üzerine bu çözümden 50 µl eklenerek 2 dakika inkübatörde etkileşimin sağlanması için beklenmiştir. İnkübatörden alınan hücreler 1 kez PBS ile yıkanmıştır ve floresan mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülerde canlı hücreler yeşil renk ışımaya yaparken ölü hücreler kırmızı renkte ışımaya yapmaktadır.

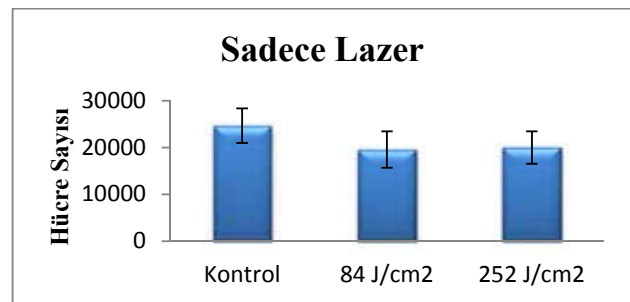
### F. İstatistiksel Analiz

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

## III. SONUÇLAR

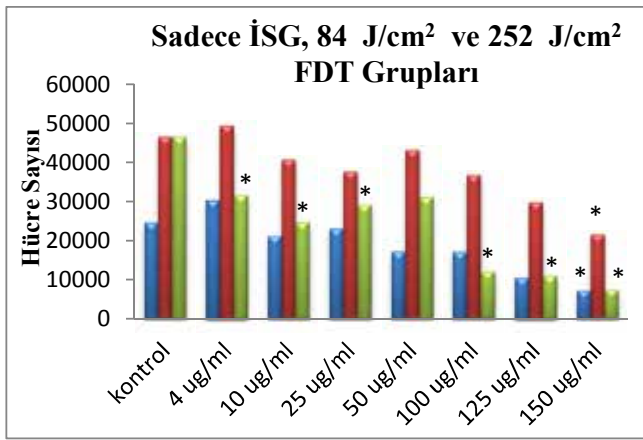
### A. MTT Analizi:

Yapılan uygulamalar sonucunda Şekil 1'de görüldüğü üzere sadece lazer uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.



Şekil 1. 84 ve 252 J/cm<sup>2</sup> 808-nm lazer ışık dozunun keratinosit hücreleri üzerindeki etkisi

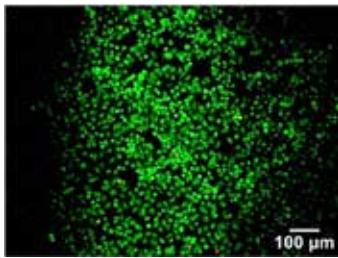
Şekil 2’te görüldüğü üzere lazer uygulamalarına benzer bir şekilde 4-125 µg/ml aralığındaki sadece İSG uygulamalarında kontrol grubuna göre hücre sayısında anlamlı bir değişiklik gerçekleşmemiştir. Fakat 150 µg/ml ilaç uygulaması hücre sayısında ciddi bir azalmaya sebep olmuştur. 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile 4 – 150 µg/ml konsantrasyon aralığında İSG uygulanan gruplarda ise 150 µg/ml İSG konsantrasyonuna kadar hücrelerde anlamlı bir azalma görülmemiştir. Ancak 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile 150 µg/ml ilaç keratinosit hücrelerinde ciddi oranda ölüme sebep olmuştur. 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ve aynı konsantrasyonlardaki İSG uygulamalarının hepsinde yüksek oranda hücre ölümü gerçekleşmiştir (Şekil 2).



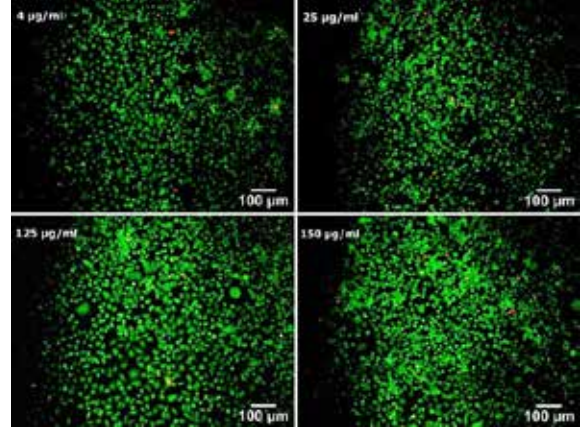
Şekil 2. Mavi sütun 4 - 150 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulanan İndosiyanın Yeşilin keratinosit hücreleri üzerindeki etkisini, sırasıyla kırmızı ve yeşil sütunlar 84 J/cm<sup>2</sup> ve 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile birlikte 4, 10, 25, 50, 100, 125, 150 µg/ml konsantrasyonundaki İndosiyanın Yeşil uygulamasının keratinosit hücreleri üzerindeki fotoinaktivasyon etkisini göstermektedir. \* deney grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (p ≤ 0,05).

### B. Akridin Turuncusu/ Propidyum İyodür Boyaması:

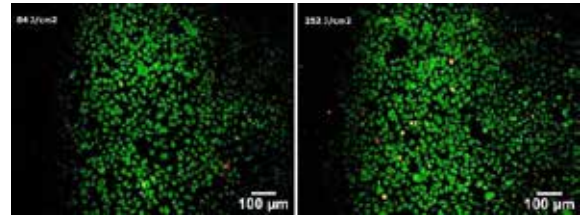
- Şekil 4 ve Şekil 5’te görüldüğü üzere sadece lazer ve sadece İSG grubunda bulunan hücrelerde kontrol grubuna (Şekil 3) göre anlamlı bir hücre ölümü gözlemlenmemiştir. MTT analiz sonuçlarıyla paralellik gösterir şekilde sadece 150 µg/ml ilacın uygulandığı grupta daha fazla kırmızıya boyanmış hücre görülmektedir.



Şekil 3. Kontrol grubundaki hücrelerin görüntüleri

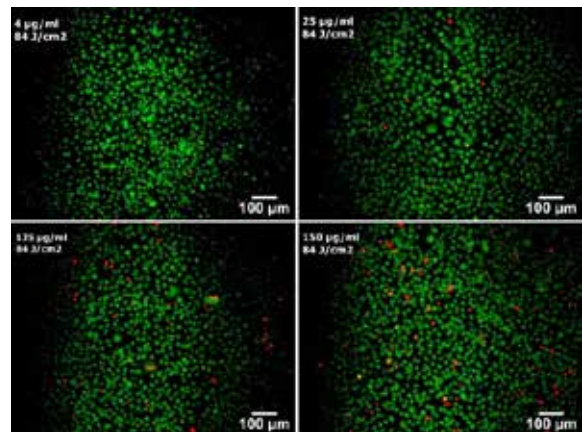


Şekil 4. Sadece İSG grubundaki hücrelerin görüntüleri



Şekil 5. Sadece Lazer grubundaki hücrelerin görüntüleri

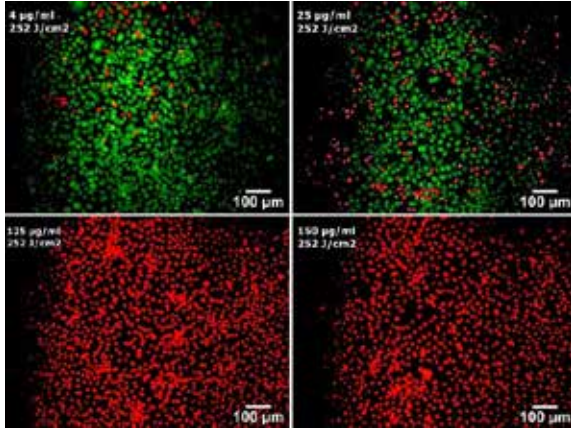
- 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozunun 4 farklı ilaç konsantrasyonu ile keratinosit hücreleri üzerinde uygulandığı grupta ilaç miktarı arttıkça hücre ölümü oranında doğrusal bir artış görülmüştür (Şekil 6). 4 ve 25 µg/ml İSG’nin kullanıldığı FDT gruplarındaki hücre ölümü kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kırmızı hücre sayısı birbirine benzer durumdadır. Ancak 125 ve 150 µg/ml ilacın kullanıldığı gruplarda kontrol grubuna göre kırmızı hücre sayısı oldukça fazladır.



Şekil 6. 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozunun uygulandığı FDT grubu

- 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu uygulamasında da ilaç konsantrasyonu arttıkça doğrusal olarak hücre ölümü artmıştır. 125 ve 150 µg/ml ilaç konsantrasyonu ve 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu uygulamasının hücrelerin tamamını öldürdüğü görülmüştür (Şekil 7). Bütün ilaç

konsantrasyonları hücre ölümü oranında kontrol grubuna göre ciddi fark oluşturmuştur.



Şekil 7. 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozunun uygulandığı FDT grubu

#### IV. TARTIŞMA

Enfeksiyon tedavisinde alternatif tedavi yöntemi olarak son yıllarda yoğun şekilde araştırılan antibakteriyel fotodinamik terapinin patojenler üzerindeki yok edici etkisinin yanısıra yara iyileşmesinde önemli fonksiyonları bulunan sağlıklı deri hücrelerine yaptığı etkilerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Yapılan araştırmalara göre fotosensitizan olarak kullanılan maddelerin ökaryot hücrelere daha kolay penetre olabildiği anlaşılmıştır ve bu durum ilacın etkinliği artırılabilir. Sağlıklı hücrelere zarar vererek klinikte uygulandığında yan etkilerin artmasına sebep olabilir [5]. Ribeiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fotosensitizan olarak curcumin, ışık kaynağı olarak led ışık kaynağı kullanmışlardır. MRSA ve L929 fibroblast hücre hattı üzerinde farklı ışık dozları ve ilaç konsantrasyonları kullanarak karşılaştırma yapmışlardır. MRSA'nın %100 fotodinamik inaktivasyonun sağlandığı gözlenirken fibroblast metabolizmasında %80 azalma kaydedilmiştir ve FDT'nin bakterilere karşı daha etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır [2].

Bu çalışmada ise Topaloğlu ve grubunun Gram Pozitif ve Gram Negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisini başarı ile gösterdiği indosiyenin yeşil ve onu uyaran 808-nm dalga boyuna sahip lazerin kullanıldığı antibakteriyel FDT uygulamasının [4] sağlıklı insan keratinosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu uygulamalarda Gram Pozitif bir bakteri olan *S. aureus* suşunu yok etmede etkili 84 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ve 4-6 µg/ml İSG konsantrasyonu [4] kullanılan FDT gruplarında sağlıklı keratinosit hücreleri zarar görmemiştir. Fakat 150 µg/ml ilaç konsantrasyonu tek başına uygulandığında ya da lazer ile birlikte uygulandığında keratinosit hücrelerine ciddi zarar vermiştir. Gram Negatif bakteri çeşidi olan *P. aeruginosa* suşunu yok etmede etkili olan 252 J/cm<sup>2</sup> enerji dozu ile 100-125 µg/ml ilaç konsantrasyonu [4] kullanılan FDT uygulamalarında ise hücrelerin tamamına yakını zarar görmüştür. Bu dozların klinikte kullanılması ciddi yan etkilere sebep olabilir ve hastalara zarar verebilir. Bu sebeple doz ayarlaması yapılarak

antibakteriyel FDT uygulamasının hücreler üzerindeki zararlı etkilerinin minimuma indirilmesi gerekmektedir. Güvenli doz aralıkları tespit edilerek uygulamalar gerçekleştirilmelidir.

#### BİLGİLENDİRME

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 215S541 kodlu proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmalar sırasında verdiği desteklerden dolayı Emel Bakay, Melike Çağan ve Prof. Dr. Murat Gülsoy'a teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

- [1] Ronqui, M. R., Coletti, T. M. S. F. A., Freitas, L. M., Miranda, E. T., Fontana, C. R., "Synergistic Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy and Ciprofloxacin", *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 158: 122–129, 2016.
- [2] Ribeiro, A. P. D., Pavarina, A. C., Dovigo, L. N., Brunetti, I. N., Bagnato, V. S., Vergani, C. E., Costa, C. A. S., "Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts", *Lasers Med Sci*, 28:391–398, 2013.
- [3] Mroz, P., et al., "Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy", *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 7(1): 75–91, 2011.
- [4] Topaloglu, N., Gulsoy, M., & Yuksel, S., "Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-nm Diode Laser", *Photomedicine and Laser Surgery*, 31(4): 155–162, 2013.
- [5] Sharma, S. K., Mroz P., Dai T., Huang Y. Y., St Denis T. G., Hamblin M. R., "Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference?", *Israel journal of chemistry*, 52: 691–705, 2012.
- [6] Masiera, N., Bojarska, A., Gawryszewska, I., Sadowy, E., Hryniewicz, W., Waluk, J., "Antimicrobial photodynamic therapy by means of porphycene photosensitizers", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 174: 84-89, 2017.
- [7] Fu, X. J., Fang Y., Yao M., "Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection", *BioMed research international*, 2013:159-157, 2013.
- [8] Simonetti, O., Cirioni O., Orlando F., Alongi C., Lucarini G., Silvestri C., Zizzi A., Fantetti L., Roncucci G., Giacometti A., Offidani A., Provinciali M., "Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/Cl in an experimental model of *Staphylococcus aureus* wound infection", *The British journal of dermatology*, 164, 987–95, 2011.