Özgün Araştırma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2025;59(1):57-70*/doi: 10.5578/mb.202501142

Geliş Tarihi (Received): 06.10.2024 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.12.2024

Temoporfin Aracılı Fotodinamik İnaktivasyonun *Leishmania tropica* Promastigotları Üzerindeki Etkileri ve Moleküler Yerleştirme Analizi

The Effects of Temoporfin-Mediated Photodynamic Inactivation on *Leishmania tropica* Promastigotes and Molecular Docking Analysis

Metin ÇALIŞKAN[1](ID), Hilal ŞİMŞEK[2](ID), Erdi Can AYTAR[3](ID), Hatice ERTABAKLAR[4](ID), Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN[5](ID)

[1] Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Uşak.
[1] *Uşak University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Uşak, Türkiye.*

[2] Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrencisi, Uşak.
[2] *Student at Uşak University, Faculty of Medicine, Uşak, Türkiye.*

[3] Uşak Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Uşak.
[3] *Uşak University Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Uşak, Türkiye.*

[4] Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.
[4] *Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Aydın, Türkiye.*

[5] Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Uşak.
[5] *Uşak University Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Uşak, Türkiye.*

**Bu çalışmanın bir bölümü, 1919B012302429 numaralı 2209A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2023/1 TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.*

Makale Atıfı: *Çalışkan M, Şimşek H, Aytar EC, Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S. Temoporfin aracılı fotodinamik inaktivasyonun Leishmania tropica promastigotları üzerindeki etkileri ve moleküler yerleştirme analizi. Mikrobiyol Bul 2025;59(1):57-70.*

ÖZ

Layşmanyaz, yaklaşık 90'dan fazla ülke ve bölgeden bildirilen, ciddi ve endemik bir bulaşıcı hastalıktır. Kutanöz layşmanyaz (KL) ise vücudun açıkta kalan bölgelerinde oluşan, başlıca semptomları arasında vektör *Phlebotomus* ısırığından altı ay sonra kronikleşebilen veya kendiliğinden iyileşebilen ciltte tek, birden fazla ülserli veya nodüler lezyonlar bulunan, ölümcül olmayan ancak kalıcı izler bırakabilen bir hastalıktır. Klasik tedavi yöntemleri, uygulamada zorluk, direnç gelişimi ve yan etki gibi bir dizi soruna neden olmaktadır. Fotodinamik tedavi (FDT), KL tedavisi için etkili, uygulaması kolay ve invaziv olmayan büyük bir potansiyel göstermektedir. Antilayşmanyal tedavi için yeni modalitelerden olan FDT, ışık ve fotosensitizerin eş zamanlı kombinasyonuyla antilayşmanyal etkileri artırmayı hedeflemektedir. Bu çalışmada, FDT'nin antilayşmanyal etkisinin incelenmesi hedefine yönelik olarak temoporfin aracılı fotodinamik inaktivasyonun *Leishmania tropica* promastigotları üzerindeki antilayşmanyal etkisinin ve olası mekanizmalarının in vitro olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Parazitler 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 µM temoporfin ile 50 dakika süreyle inkübe edilmiş ve 50 dakikalık 1.71 J/cm²'lik bir akıyla kırmızı ışığa maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığının değerlendirilmesi için MTT testi kullanılmış ve morfolojik değişiklikler Giemsa boyama yöntemiyle analiz edilmiştir. *L.tropica* promastigotlarında aşırı ifade edilen reseptörlere en

İletişim (Correspondence): *Doç. Dr. Serçin Özlem Çalışkan, Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (536) 859 12 22,* ***E-posta (E-mail):*** *srn.ozlem@gmail.com*

yüksek bağlanma afinitesini bulmak için ise moleküler yerleştirme yöntemi kullanılmıştır. Temoporfin ve kırmızı ışık kombinasyonu ile *L.tropica* promastigot canlılığının sadece temoporfin grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Temoporfin ve kırmızı ışık kombinasyonu sonucunda gözlenen IC_{50} değeri *L.tropica* için 1.924 µM olarak tespit edilmiştir. 1.924 µM konsantrasyonda sadece temoporfin ve sadece kırmızı ışık uygulamasının *L.tropica* promastigotları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca temoporfin aracılı kırmızı ışık grubunda fusiform şeklin değişmesi, kamçı ve çekirdek kaybı gibi tipik morfolojik özelliklerin kaybolduğu da tespit edilmiştir. Moleküler yerleştirme yöntemine göre ise amfoterisin B ve temoporfin 5WB5 proteininin üç boyutlu modeline sırasıyla -7.4 kcal/mol ve -6.9 kcal/mol bağlanma afinitesi göstermiştir. Temoporfin ile kırmızı ışık kombinasyonu, *L.tropica* promastigotlarını invaziv olmayan bir tedavi olarak inaktive etme potansiyeline sahiptir. Tedavide kullanılan FDT bileşenleri olan kırmızı ışık ve temoporfinin herhangi bir sitotoksik etkisinin bulunmaması, amastigot veya hayvan modelleri üzerine yapılacak daha ileri çalışmalar için önemli bir fırsat sunmakta ve potansiyel klinik uygulamalara zemin hazırlamaktadır.

Anahtar kelimeler: *Leishmania tropica; temoporfin; amfoterisin-B; fotodinamik tedavi; moleküler yerleştirme.*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious and endemic infectious disease reported in over 90 countries and regions. Cutaneous leishmaniasis (CL) manifests on exposed areas of the body, with its main symptoms being single or multiple ulcerative or nodular lesions on the skin, which can become chronic within six months after a bite from the *Phlebotomus* vector or heal spontaneously. Although not fatal, the disease can leave permanent scars. Conventional treatment methods present a range of issues, including challenges in administration, the development of resistance and side effects. Photodynamic therapy (PDT) shows significant potential as an effective, easy-to-apply, and non-invasive treatment for CL. As a new modality for antileishmanial treatment, PDT aims to enhance antileishmanial effects through the concurrent combination of light and a photosensitizer. In this study, the aim was to investigate the antileishmanial effect and possible mechanisms of temoporfin-mediated photodynamic inactivation on *Leishmania tropica* promastigotes in vitro. Parasites were incubated with temoporfin at concentrations of 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 (µM) for 50 minutes and then exposed to red light at a flux of 1.71 J/cm² for 50 minutes. The MTT assay was used to assess cell viability and morphological changes were analyzed using Giemsa staining. Molecular docking was employed to identify the highest binding affinity to overexpressed receptors in *L.tropica* promastigotes. It was found that the combination of temoporfin and red light significantly reduced the viability of *L.tropica* promastigotes compared to the group treated with temoporfin alone. The IC_{50} value observed for *L.tropica* in the temoporfin and red light combination group was 1.924 µM. At this concentration (1.924 µM), neither temoporfin alone nor red light alone had a significant effect on the viability of *L.tropica* promastigotes. Additionally, typical morphological features, such as loss of fusiform shape, flagella and nucleus, were observed in the temoporfin-mediated red light group. According to the molecular docking analysis, Amphotericin B and temoporfin exhibited binding affinities of -7.4 kcal/mol and -6.9 kcal/mol, respectively, to the three-dimensional model of the 5WB5 protein. Temoporfin combined red light has the potential to inactivate *L.tropica* promastigotes as a non-invasive treatment. The absence of any cytotoxic effects from the PDT components, red light and temoporfin in the treatment group provides an important opportunity for further studies with amastigote or animal models, paving the way for potential clinical applications.

Keywords: *Leishmania tropica; temoporfin; amphotericin B, photodynamic therapy; molecular docking.*

GİRİŞ

Layşmanyaz, dünya çapında 12 milyondan fazla vakayla en çok ihmal edilen ilk 10 tropikal hastalıktan biridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl yaklaşık 90 ülkede yaklaşık iki milyon yeni olgu ortaya çıkmaktadır ve bunların 1.5 milyonu kutanöz

layşmanyaz (KL)'dır[1]. KL, protozoan parazit *Leishmania*'nın neden olduğu, yaklaşık 100 ülkede endemik olan vektör kaynaklı bir enfeksiyondur. DSÖ, KL'yi kontrol edilemeyen ve ihmal edilmiş bir tropikal hastalık olarak listelemiştir[2]. Hastalığın ne kadar ciddi olduğu ve nasıl tedavi edileceği parazit türüne, konağa, endemik bölgeye, sosyoekonomik duruma ve tıbbi bakımın mevcudiyetine bağlıdır[3]. KL tedavisinde kullanılan ilaçlar (antimon bileşikleri, amfoterisin B, miltefosin, paromomisin, pentamidin) farklı sistemik toksisiteye, daha yüksek maliyete ve ilaç direncine sahiptir[4]. Toksisite, yan etkiler, eş zamanlı enfeksiyonlar ve parazit direnci, hastanın geleneksel tedavilere uyumunu bozmaktadır[5]. Bu nedenle, hastaları tedavi etmek için etkili, alternatif tedavi seçeneklerine acil ihtiyaç vardır. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri de toksik ve invaziv olmayan ve lokal uygulamaya imkan sağlayan bir yöntem olan fotodinamik tedavi (FDT)'dir[6].

FDT teriminin üç temel bileşeni vardır: Fotosensitizer, ışık ve moleküler oksijen. Fotosensitizer, hedef dokuda özel olarak birikir ve uygun dalga boyundaki görünür ışığa maruz kaldığında, reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek için moleküler oksijeni aktive eder. Bu bileşenler tek başlarına toksik değillerdir. Birlikte kullanıldığında sitotoksik ROS oluşumuna neden olurlar[7]. *Leishmania* türleri, FDT için birincil hedefler olmuştur. Çeşitli çalışmalarda üroporfirin, malahit yeşili, metilen mavisi, ftalosiyanin, kloroalüminyum, metil aminolevulinat, hematoporfirin, aminolevulinik asit, feoforbid a, kurkumin, hiperisin ve klorin-e6 gibi fotosensitizerlerin, *Leishmania* türlerinin hem amastigot hem de promastigot formları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir[8-10].

Klorin bazlı bir fotosensitizer olan temoporfinin 1980'lerde keşfedilmesinden bu yana, şu anda klinik FDT'de bulunan en güçlü ikinci nesil fotosensitizerlerden biridir[11]. Temoporfin (ticari olarak Foscan®) aracılı FDT baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunun tedavisi için 2001 yılında Avrupa Birliği'nde klinik olarak onaylanmıştır[12,13]. Klinikte temoporfin aracılı FDT, hem çok düşük bir ilaç dozunda (0.15 mg/kg) hem de ışık yoğunluğunda (10 J/cm^2) uygulanmaktadır. Kanserli hücreleri yok etmede sıklıkla kullanılan, antilayşmanyal etkisi son yıllarda araştırılmaya başlanan kırmızı ışık kaynağı ile bu ışığa uygun fotosensitizer temoporfinin birlikte kullanıldığı antilayşmanyal FDT yönteminin foto-sitotoksisitesi bugüne dek araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, temoporfin aracılı fotodinamik inaktivasyonun *Leishmania tropica* promastigotlarına olan etkisinin sitotoksik ve morfolojik açıdan gösterilmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, moleküler yerleştirme yöntemiyle de temoporfinin *L.tropica* promastigotlarında aşırı ifade edilen reseptörlere en yüksek bağlanma afinitesinin bulunması ve bunun FDT'de kullanım için umut verici bir ajan olup olamayacağı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın metodolojik yapısının "hücre kültürü çalışması" olması nedeniyle Dünya Tabipleri Birliği Helsinki Bildirgesi "İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkeleri" gereğince etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Parazitin Üretilmesi

L.tropica promastigotları çalışma başlangıcına dek sıvı azotta saklandı. Promastigotlar sıvı azottan alınıp hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra %10 "fetal bovine serum (FBS)" içeren RPMI-1640 besiyerinde kültürü yapıldı. Ekim yapılan flasklar 26 °C'de etüvde inkübe edildi.

Temoporfin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Temoporfin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya), bu çalışmada bir fotosensitizer olarak kullanıldı. Temoporfin stok çözeltisi, DMSO içinde 256 µM olarak hazırlandı. Temoporfin konsantrasyonları 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 µM olacak şekilde RPMI besiyeriyle hazırlandı.

Gruplar

Çalışmada, temoporfin ve kırmızı ışık uygulanmamış kontrol grubu, amfoterisin B uygulanan pozitif kontrol grubu, kırmızı ışık uygulanan grup, temoporfin grubu ve temoporfin aracılı kırmızı ışık grubu olmak üzere beş grup yer aldı.

Temoporfin grubu: Sadece temoporfin uygulanan grup (1 x 10^7 promastigot/mL olan parazit örnekleri bir saat boyunca temoporfine maruz bırakılıp kırmızı ışık uygulanmamış grup).

Temoporfin aracılı kırmızı ışık grubu: Temoporfin + kırmızı ışık uygulanan grup (1 x 10^7 promastigot/mL olan parazit örnekleri 50 dakika boyunca temoporfine maruz bırakılan ve daha sonra serbest temoporfin ortamdan uzaklaştırılıp, 50 dakika boyunca kırmızı ışık uygulanan grup).

Fotodinamik Tedavinin Uygulanması

Işık kaynağı olarak 640 nm dalga boyunda kırmızı ışık yayan üç panel, 287 ampulden oluşan LED (O'melon Omega LED) sistemi kullanıldı. Kırmızı ışık kaynağının kullanılmasının sebebi, temoporfin absorpsiyon bandının 652 nm dalga boyu olmasıydı. *L.tropica* promastigotları 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 µM temoporfin konsantrasyonlarıyla 50 dakika inkübe edildikten sonra hücreler 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Ortamdaki serbest temoporfini uzaklaştırmak için hücreler santrifüj edildi ve "fosfat tamponlu salin [phosphate buffered saline (PBS)]" ile yıkandı. Kırmızı ışık uygulaması hücrelere taze PBS eklenerek gerçekleştirildi. Işık çıkışı bir güç ölçer (Newport, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak ölçüldü. Elli dakikalık bir süre içinde 0.570 mW/cm²'lik bir ışınım ve 1.71 J/cm²'lik bir akı elde edildi. Işık uygulandıktan sonra, tüm gruplara taze RPMI eklendi ve 26 °C'de 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi.

Hücre Canlılığı Analizi

[3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazolyum bromür] MTT analizi, hücresel metabolik aktiviteyi ölçerek dolaylı olarak hücre canlılığını belirleyen kolorimetrik bir yöntemdir. *L.tropica* promastigotlarının canlılığı, üreticinin talimatlarına göre MTT hücre proli-

ferasyon kiti I (Roche Diagnostic, Almanya) kullanılarak değerlendirildi. Tedavi sonrası MTT reaktifi hücrelere eşit miktarda eklendi ve ardından 37 °C'de dört saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından çözündürme tamponu eklenerek hücre canlılığı, üreticinin talimatlarına göre 550 ile 600 nm arasında değişen dalga boylarında, Multiskan Sky mikroplaka spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. IC_{50} değerleri hücre canlılığı yüzdeleri kullanılarak belirlendi.

Giemsa Boyama

Kontrol, ışık-kontrol, sadece temoporfin ve temoporfin aracılı kırmızı ışık gruplarının morfolojik farklarını belirlemek için Giemsa boyama yöntemi gerçekleştirildi. Her bir gruptan bir miktar parazit örneği alınıp lam üzerine aktarılarak kuruması beklendi ve 10 dakika boyunca metanolle sabitlendi. Daha sonra lamlar oda sıcaklığında 20 dakika Giemsa (1:5) ile boyanarak ışık mikroskobunda hücre morfolojileri incelendi.

Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

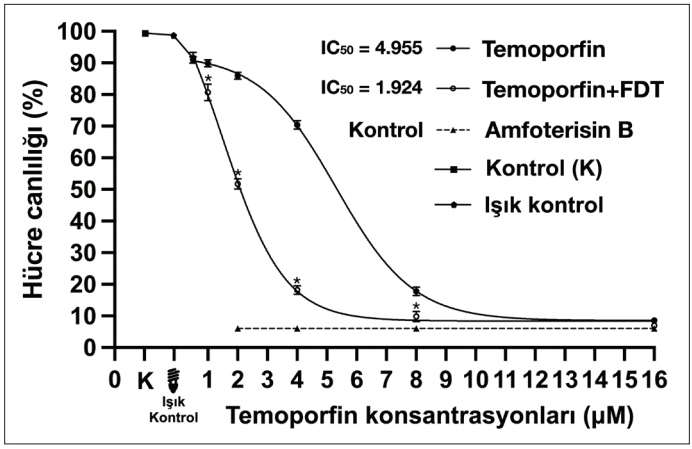
Moleküller Chem-Draw Ultra 18.0 programında çizildi ve minimal enerji formları Chem 3D 18.0 programında elde edilip Mol2 formatında kaydedildi. Enzimleri kaydetmek için protein veri bankası (PDB) kullanıldı. *Leishmania* 4E-IP1'e (5WB5) (2.70 Å) bağlı *Leishmania* IF4E-1 seçildi ve PDB formatında saklandı. AutoDock Vina 1.5.7 yazılımı ve bağlanma enerjileri (kcal/mol) kullanılarak molekül-enzim etkileşimleri belirlendi[14]. 2D ve 3D görseller BIOVIA Discovery Studio Visualizer yazılımıyla gösterildi[15].

İstatistiksel Analiz

Tüm veriler, SPSS 25.0 programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar Student's t testi kullanılarak belirlendi ve $p< 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Temoporfinin 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 µM konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testiyle değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna göre temoporfin grubundaki 0.5 ve 1 µM konsantrasyonlar ve temoporfin + kırmızı ışık grubundaki 0.5 µM konsantrasyon dışındaki tüm konsantrasyonlar anlamlı ölçüde sitotoksisite göstermiştir ($p< 0.05$). Temoporfin grubuna göre temoporfin aracılı kırmızı ışık grubunun 0.5 ve 16 µM konsantrasyonları hariç tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksisite farkı gözlemlenmiştir ($p< 0.05$). Özellikle 2 ve 4 µM temoporfinle kırmızı ışık uygulamasının aynı konsantrasyondaki sadece temoporfin uygulamasına göre belirgin bir sitotoksisite yarattığı gözlemlenmiştir. Sadece temoporfin uygulaması sonucu *L.tropica* promastigotları IC_{50} değeri 4.955 µM, temoporfin aracılı kırmızı ışık uygulamasının *L.tropica* promastigotları IC_{50} değeri 1.924 µM olarak tespit edilmiştir. Sadece kırmızı ışık uygulamasının ise *L.tropica* promastigotlarında herhangi bir sitotoksik etkisi saptanmamıştır. Pozitif kontrol olarak uygulanan amfoterisin B'nin de uygulanan çalışma dozlarında *L.tropica* promastigotlarını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 1). Sonuç olarak, *L.tropica* promastigotları üzerine temoporfin aracılı kırmızı ışık uygulamasının, sadece temoporfin uygulamasına göre önemli ölçüde inhibisyona sebep olduğu gözlemlenmiştir.



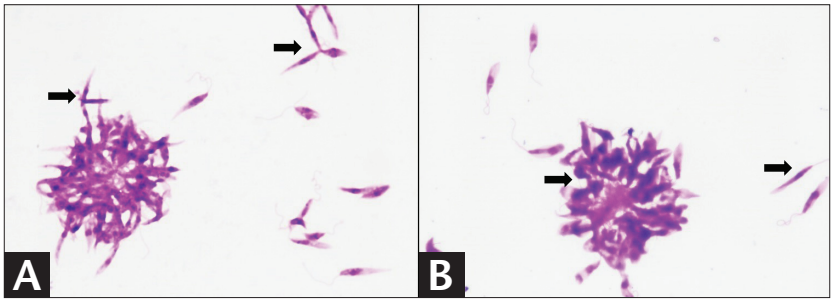
Şekil 1. *Temoporfin ve temoporfin aracılı kırmızı ışığın L.tropica promastigotlarına etkisi.*

**p< 0.05, *Temoporfin grubuna göre anlamlı.*

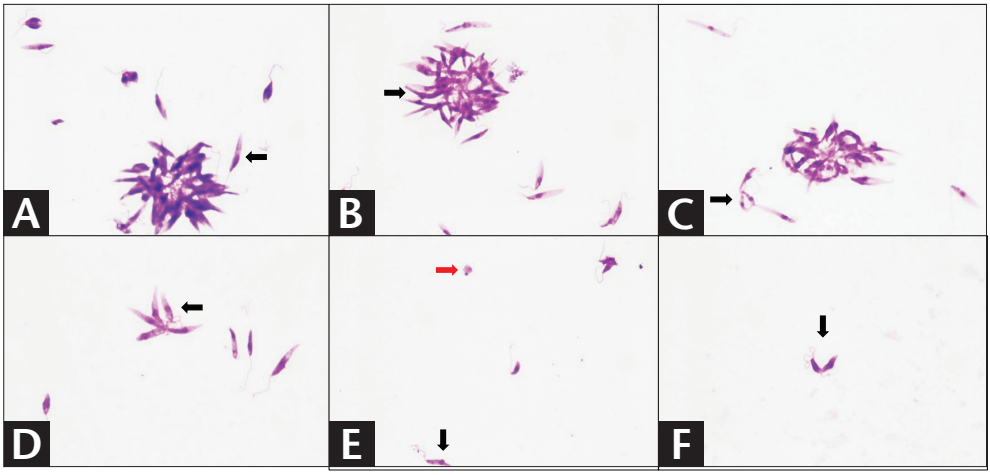
Kontrol ve kırmızı ışık gruplarındaki parazitlerin, tek çekirdekli, kinetoplast, dar gövde ve kamçı ile fusiform görünümü gibi *Leishmania* cinsine özgü tipik morfolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2A, 2B).

Sadece temoporfin uygulanan gruplar morfolojik olarak incelendiğinde 0.5, 1, 2, 4 µM konsantrasyonlarda *L.tropica* parazitlerin morfolojik özelliklerinde değişimin olmadığı, tipik morfolojik özellikleri koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3A, 3B, 3C, 3D). Fusiform şeklin değişimi 8 ve 16 µM konsantrasyonda gözlemlenmiştir (Şekil 3E, 3F).

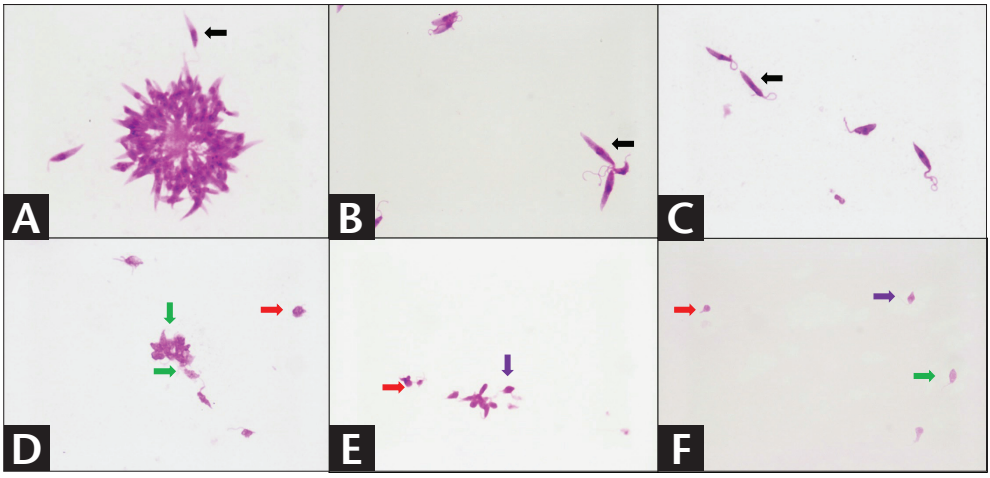
Temoporfin aracılı kırmızı ışık gruplarında ise 0.5, 1 ve 2 µM konsantrasyonda tipik morfolojik özelliklerin korunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4A, 4B, 4C). Fakat 1 ve 2 µM konsantrasyonda boyanan parazit sayısında azalma tespit edilmiştir. Bu da MTT hücre canlılığı analizi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Öte yandan 4, 8 ve 16 µM temoporfin aracılı kırmızı ışık gruplarında parazitlerin sayı olarak azlığı, kamçı, çekirdek ve kinetoplast içermediği, yuvarlak ve geniş yapılara sahip olduğu ve tipik morfolojik yapılarını kaybettikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4D, 4E, 4F).



Şekil 2. *Kontrol ve kırmızı ışık uygulanan grupların Giemsa boyama bulguları. Siyah ok: Tipik morfolojik özellikler.*



Şekil 3. *L.tropica promastigotları üzerine temoporfin uygulaması sonucu Giemsa boyama bulguları. Siyah ok: Tipik morfolojik özellikler, Kırmızı ok: Yuvarlak şekil.*



Şekil 4. *L.tropica promastigotları üzerine temoporfin aracılı kırmızı ışık uygulaması sonucu Giemsa boyama bulguları. Siyah ok: Tipik morfolojik özellikler, Kırmızı ok: Yuvarlak şekil, Mor ok: Kamçı kaybı, Yeşil ok: Çekirdek ve kinetoplast kaybı.*

Tablo I, amfoterisin B ve temoporfinin hedef proteinle bağlanma etkileşimlerinin sonuçlarını özetlemektedir. Amfoterisin B, -7.4 kcal/mol bağlanma enerjisi ve -0.11 ligand etkinliğiyle 12.50 µM inhibisyon sabiti (Ki) sergilemiştir. Buna karşılık temoporfin,

Tablo I. *Bileşiklerin Hedef Proteinle Bağlanma Etkileşimlerinin Sonuçları*

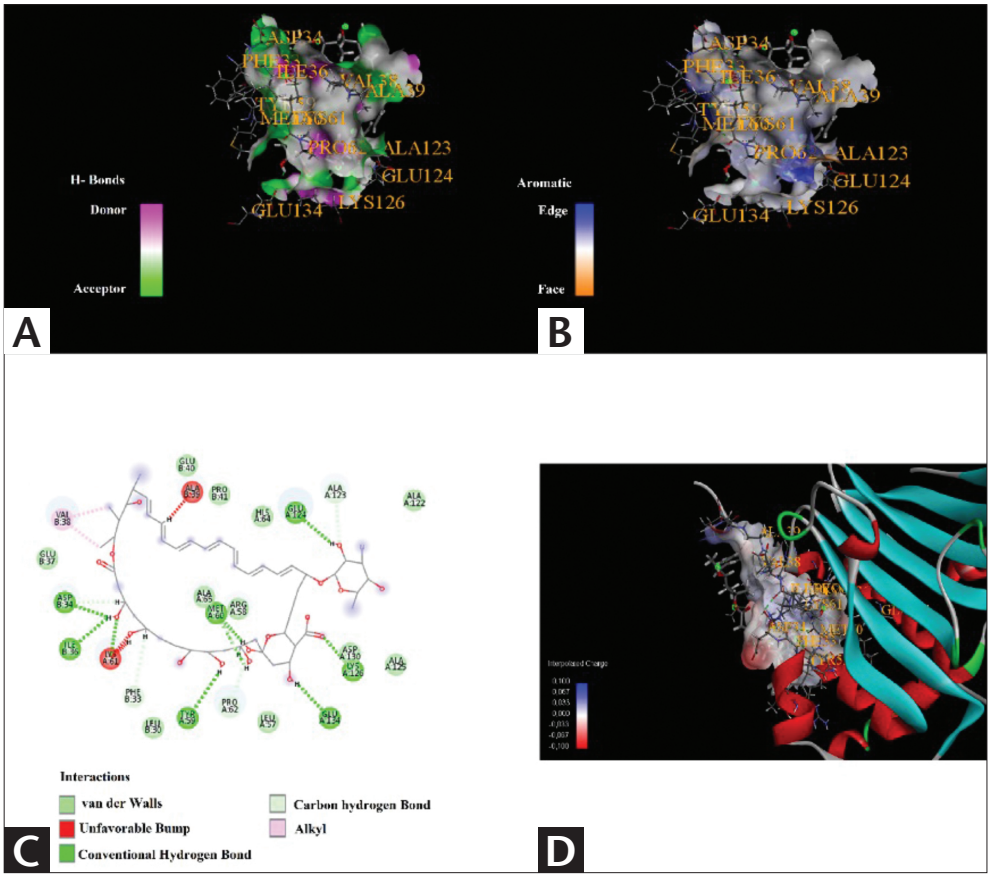
	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Ligand Verimliliği	İnhibisyon Sabiti [(Ki) (µM)]
Amfoterisin B	-7.4	-0.11	12.50 µM
Temoporfin	-6.9	-0.10	11.65 µM

-6.9 kcal/mol kısmen daha az elverişli bağlanma enerjisi ve -0.11 ligand etkinliğiyle 11.65 μM inhibisyon sabiti (Ki) sergilemiştir. Bu sonuçlar, her iki bileşiğin de hedef protein için güçlü bağlanma afinitesine sahip olduğunu, amfoterisin B'nin temoporfine kıyasla kısmen daha elverişli bir bağlanma profili gösterdiğini göstermektedir.

Tablo II, bileşiklerin *Leishmania* 4E-IP1'e bağlandığında, *Leishmania* IF4E-1 (5WB5) ile kenetlenmiş konformasyonlarının öngörülen etkileşimlerini özetlemektedir. Amfoterisin B için, 5WB5 proteiniyle birkaç geleneksel hidrojen bağı etkileşimi gözlemlenmiştir (Şekil 5).

Tablo II. *Leishmania 4E-IP1'e (5WB5) Bağlı Leishmania IF4E-1'e Karşı Bileşiklerin Yerleştirilmiş Konformasyonlarının Öngörülen Etkileşimleri*

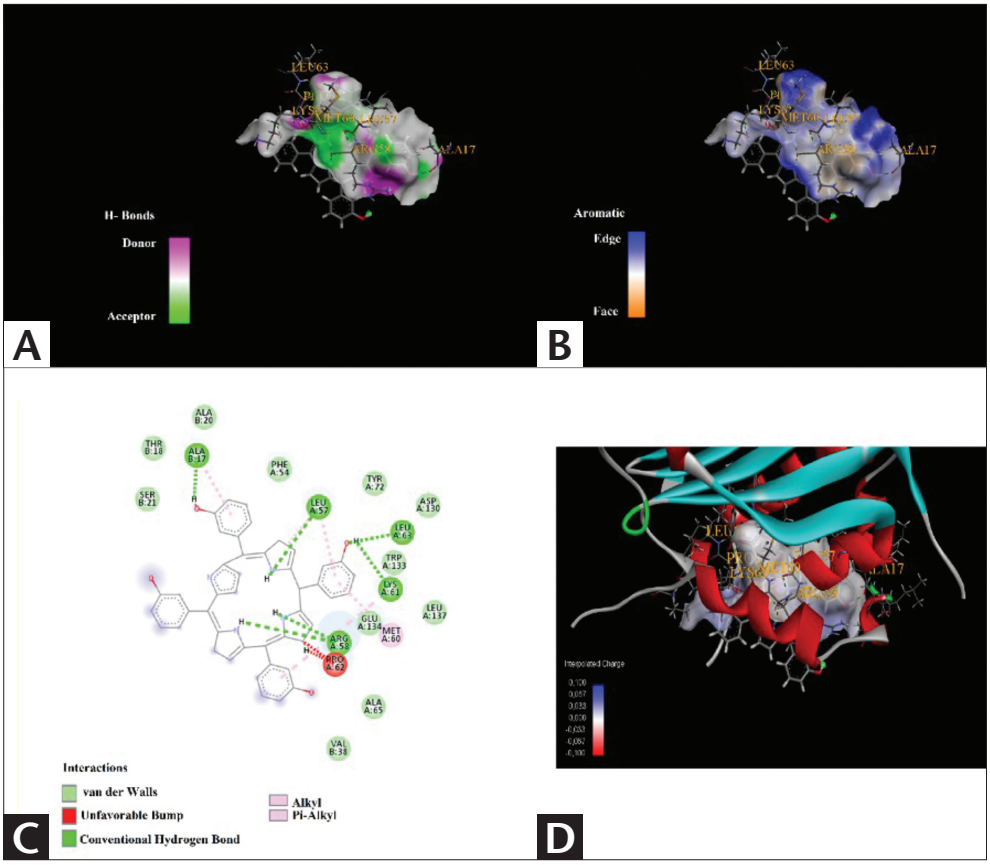
Ligand	Protein	Amino Asit	Etkileşim	Mesafe
Amfoterisin B	5WB5	A: LYS61:HZ1 -: [001: O11	Geleneksel Hidrojen Bağı	1.96
		A: LYS126:HZ2 -: [001: O17	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.47
		: [001:H1 - A: MET60:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	1.68
		: [001:H2 - A: GLU134:OE2	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.74
		: [001:H6 - A: GLU124:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.23
		: [001:H16 - B:ASP34:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.64
		: [001:H16 - B: ILE36:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.64
		: [001:H16 -: [001: O10	Geleneksel Hidrojen Bağı	1.61
		: [001:H19 - A: TYR59:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.69
		: [001:H20 - A: MET60:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.54
		A: PRO62:HD2 -: [001: O2	Karbon Hidrojen Bağı	2.33
		A: ALA123: HA -: [001: O7	Karbon Hidrojen Bağı	2.60
		:[001:H23 - A:MET60:O	Karbon Hidrojen Bağı	1.89
		: [001:H32 - B: PHE33:O	Karbon Hidrojen Bağı	2.87
		: [001:H35 - B: ASP34:OD1	Karbon Hidrojen Bağı	2.39
		: [001:H68 -: [001: O4	Karbon Hidrojen Bağı	1.92
		: [001:C44 - B: VAL38	Alkil	3.95
		: [001:C45 - B: VAL38	Alkil	3.79
Temoporfin	5WB5	A: LEU63:HN -: [001: O2	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.42
		: [001:H5 - A: ARG58:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.46
		: [001:H10 - B: ALA17:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	1.75
		: [001:H14 - A: LEU57:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.70
		: [001:H21 - A: LYS61:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	1.77
		: [001:H24 - A: ARG58:O	Geleneksel Hidrojen Bağı	2.15
		: [001 - A: LEU57	Alkil	3.73
		: [001 - B: ALA17	Pi- Alkil	4.08
		: [001 - A: LEU57	Pi- Alkil	5.09
		: [001 - A: MET60	Pi- Alkil	5.03
		: [001 - A: LYS61	Pi- Alkil	5.30



Şekil 5. *Amfoterisin B'nin 5WB5 proteinleriyle etkileşim diyagramı. A: H-bağları, B: Aromatik, C: 2D yapı D: 3D ara yük.*

Şekil 5'te sunulan Amfoterisin B'nin etkileşimleri, hedef proteinle güçlü bir bağlanma profili sergilediğini göstermektedir. Bu bileşiğin LYS61, LYS126, MET60, GLU134, GLU124, ASP34 ve ILE36 gibi amino asitlerle hidrojen bağları oluşturduğu, bunun yanı sıra karbon-hidrojen ve alkil etkileşimleri kurduğu belirlenmiştir. Etkileşimleri mesafeleri de Tablo II'de gösterilmiştir.

Temoporfin için, 5WB5 proteini ile çeşitli etkileşimler Şekil 6'da gösterilmiştir. Temoporfin'in proteinle hem hidrojen bağları hem de alkil/pi-alkil etkileşimleri yoluyla etkili bir bağlanma sağladığı gözlemlenmiştir. Bu bağlanmaların LEU63, ARG58, ALA17, LEU57, MET60 ve LYS61 gibi amino asitlerle gerçekleştiği tespit edilmiş ve etkileşim mesafeleri Tablo II'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, her iki bileşiğin de hedef proteinle farklı etkileşim profilleri sergilediğini ve bunun potansiyel olarak biyolojik aktivitelerini etkileyebileceğini göstermektedir.



Şekil 6. *Temoporfinin 5WB5 proteinleriyle etkileşim diyagramı. A: H-bağları, B: Aromatik, C: 2D yapı, D: 3D interpole edilmiş yük açısından.*

TARTIŞMA

Bu çalışma, KL enfeksiyonlarına neden olan ve Türkiye'de endemik *L.tropica* promastigotlarının tedavisine odaklanmıştır. *Leishmania* spp. promastigotlarına farklı fotosensitizerler kullanılarak FDT uygulaması içeren önemli sayıda in vitro çalışma bulunmaktadır. İlk in vitro bulgu, Dutta ve arkadaşları tarafından yapılan[16], layşmanyaziste alüminyum ftalosiyanin aracılı FDT'nin, parazitin morfolojik özelliklerine hızla zarar verdiğini ve promastigotları öldürdüğünü bildiren çalışmadır. Song ve arkadaşları[17], *Leishmania amazonensis* promastigotları üzerinde metilen mavisi bazlı FDT'yi araştırdıkları bir çalışmada; metilen mavisi konsantrasyonu arttıkça toksisitenin arttığını ve metilen mavisi ile kombine FDT kullanımının metilen mavisi tek başına kullanımından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Montayo ve arkadaşları[18], *Leishmania panamensis* promastigotları üzerinde hiperisin bazlı FDT'nin parazit sayılarında azalmaya neden olduğunu; Morgenthaler ve arkadaşları[19] ise dimetil ve dietil karbaporfirin ketallerinin *Leishmania tarentolae* promastigotlarının

büyümesini baskıladığını bildirmişlerdir. Her iki fotosensitizerin FDT'de kullanım için umut verici ajanlar olduğunu belirtmişlerdir.

Birçok protozoan parazit, hücre ölümü sırasında kaybolan, metazoanlara benzer karakteristik şekilleriyle tanımlanmaktadır[20]. Maciel ve arkadaşları[21], *Leishmania braziliensis* ve *L.amazonensis* üzerinde kurkumin aracılı FDT'nin sırasıyla %92 ve %82 oranında ölüm oranına sahip olduğunu, Giemsa boyama ile morfolojik olarak hücre boyutunda değişiklik, çekirdek ve kamçı kaybı gibi yapısal konformasyonda değişikliklerin indüklendiğini bildirmişlerdir. Aureliano ve arkadaşları[22], *L.amazonensis* promastigotları üzerinde metilen mavisi tabanlı FDT sonrası parazitlerin kamçı yapısının kaybı, sitoplazmada yoğun vakuolizasyon, hücre büzülmesi ve mitokondri-kinetoplast kompleksinin genişlemesi gibi morfolojik değişiklikler gözlemlemişlerdir. Ayrıca *L.braziliensis* ve *Leishmania major* promastigotları üzerinde temoporfin gibi klorin bazlı bir fotosensitizer olan klorin-e6 aracılı FDT'nin parazit sayısını azalttığı ve morfolojik değişikliklerin ortaya çıktığı bildirilmiştir[23]. Özlem Çalışkan ve arkadaşlarının[9,24] iki ayrı çalışmasında feoforbid a, metilen mavisi, kloralüminyum ftalosiyanin, toluidin mavisi ve malahit yeşili aracılı FDT'nin *L.tropica* promastigotlarının canlılığı üzerindeki etkisinin yanı sıra morfolojik olarak yuvarlak şekil, kamçı ve çekirdek kaybı gibi atipik hücre özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışma, temoporfin aracılı fotodinamik inaktivasyonun *L.tropica*'nın MTT testinde hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. Parazit sayısı, temoporfin konsantrasyonu kırmızı ışıkla birleşince daha da azalmıştır. Temoporfin aracılı kırmızı ışıkla fotodinamik inaktivasyonun gözlenen IC_{50} değeri, *L.tropica* için 1.924 µM olarak tespit edilmiştir. Bu konsantrasyondaki sadece temoporfinin *L.tropica* promastigotları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ve kırmızı ışığın tek başına etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Morfolojik olarak kontrol, ışık ve sadece temoporfin grubunda çekirdek, kinetoplast ve kamçı belirgin olmak üzere fusiform görünümün korunduğu tespit edilmiştir. Temoporfin aracılı kırmızı ışık grubunda ise yuvarlak şekil, sitoplazmada genel bir azalma, fusiform şeklin değişmesi, kamçı ve çekirdek kaybı gibi morfolojik olarak önemli değişiklikler gözlemlenmiştir.

Literatürdeki fotosensitizörler incelendiğinde, *Leishmania* spp. promastigotlarında kullanılan bileşik yük, lipofilik veya amfifilik özellikler, fotosensitizerde metal varlığı ve yokluğu, elektrostatik etkileşim dahil olmak üzere birçok farklı fotosensitizer bulunmaktadır. Bu fotosensitizerler parazitik formlara karşı etkilidir. Çalışmada kullanılan temoporfin nötr bir fotosensitizerdir. Parazitin membran yüzeyinde negatif yük olması nedeniyle parazitik hücrelerle daha iyi etkileşime girme potansiyeline sahiptir. Ek olarak, klorin bazlı bir fotosensitizer olan temoporfinin amfifilik karakteri, hücredeki fosfolipid zarlarından iyi bir şekilde nüfuz etmesini sağlamaktadır.

Temoporfin aracılı FDT'nin etki mekanizması henüz bilinmediğinden ayrıca bu çalışmada, moleküler yerleştirme simülasyonları uygulanmıştır. Pozitif kontrol olan amfoterisin B ve fotosensitizer olarak kullanılan temoporfinin *Leishmania* IF4E-1 proteinine

bağlanma afinitesi hesaplanmıştır. *Leishmania* parazitleri, yaşam döngüleri boyunca ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'nin (LeishIF4E) izoformlarının farklı ifadesi yoluyla mRNA translasyonunun ince ayarlı bir düzenlemesini sergiler. 4E etkileşimli proteinler (4E-IP'ler) ve LeishIF4E gibi allosterik modülatörler arasındaki etkileşim, bu başlatma faktörünün mRNA başlığına olan afinitesini etkilemektedir[25]. Ökaryotik genomlardan gelen mRNA'lar, mRNA dizisinin 5' ucunda bir 7-metilguanosin (m7G) başlığına (m7GpppN yapısı) sahiptir. Bu m7G in vitro transkripsiyon sırasında bir 5', 5'-trifosfat köprüsü (ppp) ile mRNA'nın ilk nükleotidine bağlanır ve mRNA'yı ekzonükleazlar tarafından yıkılmaktan korur. mRNA 5' başlığı ökaryotik başlama faktörü eIF4E'nin, mRNA'nın başlığına bağlanmasını ve onun ribozoma yüklenmesini sağlar[26]. Temoporfinin etkili olduğu durumlarda, bu etkileşimlerin sonucunda mRNA'nın başlatma faktörü eIF4E tarafından tanınmasının engellenmesi, mRNA'nın ribozomlara yüklenimini durdurarak translasyon sürecini baskılayabileceği öngörülmektedir. Bu durum, *Leishmania* parazitlerinin protein sentezini bozarak hücresel işlevlerini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle temoporfinin potansiyel tedavi stratejileri için önemli bir bileşen olabileceğini göstermektedir. Yapılan yerleştirme çalışmaları, amfoterisin B ve temoporfinin 5WB5 proteininin üç boyutlu modeline bağlanma afinitelerini değerlendirmiştir. Amfoterisin B, -7.4 kcal/mol bağlanma enerjisi gösterirken, temoporfin ise -6.9 kcal/mol bağlanma afinitesi sergilemiştir. Bu sonuç, temoporfinin amfoterisin B'ye yakın bir bağlanma enerjisi profilini desteklemekte ve dolayısıyla temoporfinin geleneksel ilaç olan amfoterisin B kadar etkili bir kimyasal olabileceğini, fototoksik etkileri de düşünüldüğünde etkili bir fotosensitizer olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgular, özellikle *Leishmania* tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi açısından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Temoporfinin bağlanma afinitesinin, amfoterisin B'nin etki mekanizmalarını benzer şekilde yansıtması, onun klinik uygulamalarda da etkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, temoporfinin fotosensitizer olarak sahip olduğu özellikler, özellikle FDT gibi inovatif yöntemlerle birleştirildiğinde, *Leishmania* enfeksiyonlarının yönetiminde önemli bir alternatif strateji oluşturabilir. Bu durum, hem tedavi etkinliğini artırma hem de olası yan etkileri azaltma potansiyeli taşımaktadır, bu da temoporfinin araştırma ve geliştirme süreçlerinde daha fazla dikkate alınmasını gerektirmektedir

Sonuç olarak, temoporfin aracılı kırmızı ışık ile tedaviyi takiben gözlemlenen sitotoksisite ve hücre morfolojisindeki değişiklikler (yuvarlak, geniş, kamçı, çekirdek ve kinetoplast içermeyen yapılar), moleküler yerleştirme ile geleneksel tedavide kullanılan ilaç kadar yüksek bağlanma afinitesi, *L.tropica* promastigotları için düşük maliyetli, toksik ve invaziv olmayan bir tedavi olarak önemli bir potansiyel sunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın bir bölümü, 1919B012302429 numaralı 2209A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2023/1 TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmanın metodolojik yapısının "hücre kültürü çalışması" olması nedeniyle Helsinki Bildirgesi "İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkeleri" gereğince etik kurul onayı gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Orabi MAA, Lahiq AA, Al Awadh AA, Alshahrani MM, Abdel-Wahab BA, Abdel-Sattar ES. Alternative non-drug treatment options of the most neglected parasitic disease cutaneous Leishmaniasis: A narrative review. Trop Med Inf Dis 2023; 8(5): 275. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050275
2. De Vries HC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. Am J Clin Dermatol 2022; 23(6): 823-40. https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8
3. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther 2009; 22(6): 491-502. https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x
4. Abpeikar Z, Safaei M, Alizadeh AA, Goodarzi A, Hatam G. The novel treatments based on tissue engineering, cell therapy and nanotechnology for cutaneous Leishmaniasis. Int J Pharm 2023; 633: 122615. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122615
5. Prasanna P, Kumar P, Kumar S, Rajana VK, Kant V, Prasad SR, et al. Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis-A review. Bio Pharmacother 2021; 141: 111920. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111920
6. Man E, Price HP, Hoskins C. Current and future strategies against cutaneous parasites. Pharm Res 2022; 39(4): 631-51. https://doi.org/10.1007/s11095-022-03232-y
7. Oluwajembola AM, Cleanclay WD, Onyia AF, Chikere BN, Zakari S, Ndifreke E, et al. Photosensitizers in photodynamic therapy: An advancement in cancer treatment. Res Chem 2024; 10: 101715. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101715
8. Sharma R, Viana SM, Ng DK, Kolli BK, Chang KP, de Oliveira CI. Photodynamic inactivation of *Leishmania braziliensis* doubly sensitized with uroporphyrin and diamino-phthalocyanine activates effector functions of macrophages in vitro. Sci Rep 2020; 10(1): 17065. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74154-1
9. Özlem Çalışkan S, İlikçi Sağkan R, Karakaş H, Sever S, Yıldırım C, Balıkçı M, et al. Efficacy of malachite green mediated photodynamic therapy on treatment of Cutaneous Leishmaniasis: In vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther 2022; 40: 103111. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103111
10. Çalişkan E, Uncu HB, Akoğlu G. Cutaneous leishmaniasis treated with daylight methylene blue photodynamic therapy. Int J Dermatol 2024; 63(2): e65-e7. https://doi.org/10.1111/ijd.16977
11. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydro- xyphenyl)chlorin) - a second-generation photosensitizer. Photochem Photobiol 2011; 87: 1240-96 . https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x
12. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photo- sensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. Photochem Photobiol 2009; 85: 1053-74. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x
13. European Medicines Agency (EMA). Foscan. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/foscan (Accessed date: 20.05.2019).
14. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem 2010; 31(2): 455-61. https://doi.org/10.1002/jcc.21334
15. Biovia DS. Discovery studio modeling environment. San Diego, CA: Dassault Systemes, 2015.

16. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(11): 4474-84. https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4474-4484.2005
17. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EHY, Cardoso JL, Uchoa AF, et al. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. Photomed Laser Surg 2011; 29(10): 711-5. https://doi.org/10.1089/pho.2010.2915
18. Montoya A, Daza A, Muñoz D, Ríos K, Taylor V, Cedeño D, et al. Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in vitro and in vivo studies. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(9): 5804-13. https://doi.org/10.1128/AAC.00545-15
19. Morgenthaler JB, Peters SJ, Cedeño DL, Constantino MH, Edwards KA, Kamowski EM, et al. Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. Bioorg Med Chem 2008; 16(14): 7033-8. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.037
20. Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Lüder CGK, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. Parasites Vectors 2010; 3: 104. https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-104
21. Maciel LTR, Marcolino LMC, Maciel FBSP, Pinto JG, Ferreira-Strixino J. Effect of serial photodynamic therapy with curcumin on *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. Res Soc Develop 2021; 10(11): e219101119544. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19544
22. Aureliano DP, Lindoso JAL, de Castro Soares SR, Takakura CFH, Pereira TM, Ribeiro MS. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther 2018; 23: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.005
23. Pinto JG, Pereira AHCP, de Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. Chlorin E6 phototoxicity in L. major and L. braziliensis promastigotes-in vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther 2016; 15: 19-24. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.04.014
24. Caliskan Ozlem S, Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertug S. Evaluation of photodynamic therapy against *Leishmania tropica* promastigotes using different photosensitizers. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2022; 38: 354-64. https://doi.org/10.1111/phpp.12758
25. Hernández-Alvarez L, Oliveira AB, Hernández-González JE, Chahine J, Pascutti PG , de Araujo AS, et al. Computational study on the allosteric mechanism of *Leishmania major* IF4E-1 by 4E-interacting protein-1: Unravelling the determinants of m7GTP cap recognition. Comput Struct Biotecnol J 2021; 19: 2027-44. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.036
26. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: Biological functions and applications. Nucleic Acids Res 2016; 44(16): 7511-26. https://doi.org/10.1093/nar/gkw551

Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.
Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.
©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.