Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Cilt 22, Sayı 1, 182-185, 2018

Süleyman Demirel University
Journal of Natural and Applied Sciences
Volume 22, Issue 1, 182-185, 2018

DOI: 10.19113/sdufbed.78624

PC-3 Prostat Kanser Hücreleri Üzerinde İndosyanin Yeşili Kullanarak Yapılan Fotodinamik Terapinin AO/PI Boyama Testi Sonuçları

Mustafa Kemal RUHİ*[1], Ayşe AK CAN[2], Murat GÜLSOY[1]

[1]Boğaziçi Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü, 34684, İstanbul
[2]Ercincan Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, 24000, Erzincan

(Alınış / Received: 07.12.2016, Kabul / Accepted: 15.05.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 18.06.2017)

Anahtar Kelimeler
Fotodinamik terapi,
İndosiyanin yeşili,
Yakın kızılaltı laser,
Prostat kanseri tedavisi

Özet: Fotodinamik terapi (FDT) prostat kanseri tedavisinde henüz araştırma aşamasında olan sağaltıcı bir alternatiftir. FDT, ışığa duyarlı bir kimyasal maddenin (fotosensitizan) ışık ile aktive edilmesi ve aktive olan kimyasalın kanserli bölgedeki hücre canlılığını baskılayıcı etkiye neden olması prensibine dayanmaktadır. Bu yeni tedavi yöntemi hem seçiciliği hem de yan etkilerinin azlığı nedeniyle alternatifler arasında ön plana çıkmaktadır. FDT'de kullanılan fotosensitizanın ışıksız ortamda sitotoksik olmaması ve vücuttan kolay atılabilmesi istenmektedir. Ayrıca herhangi bir fotosensitizanın yakın kızılaltı ışık ile aktive olması, bu dalgaboyunun deriye ve diğer dokulara daha fazla nüfuz etmesinden dolayı tercih sebebidir. Bu özelliklere sahip olan İndosiyanin Yeşili (ISY) daha çok floresans özelliği ile ön plana çıkmış ve görüntüleme amaçlı olarak kullanılmıştır. Bu *in vitro* çalışmada ISY-FDT'nin farklı inkübasyon süreleri sonundaki etkisi AO/PI boyama yöntemi kullanarak ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar ISY-FDT'nin hücre canlılığını baskıladığını göstermektedir.

AO/PI Staining Test Results of Indocyanine Green-Based Photodynamic Therapy on PC-3 Prostate Cancer Cells

Keywords
Photodynamic therapy,
Indocyanine green,
Near-Infrared light,
Prostate cancer treatment

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is an alternative cancer treatment method, which is also being researhed on prostate cancer. PDT causes cellular damage by means of a light sensitive chemical agent that is excited with light of appropriate wavelength. This method stands out with its selective property and low side effects. Photosensitizers used in PDT should have a low dark toxicity and should easily be removed from the body. Furthermore, the photosensitizer should preferably be activated by infrared light that penetrates better in tissue or skin. Indocyanine green (ICG) has the ideal properties, however it was mostly prefered as a fluorescence probe in imaging research. This *in vitro* ICG-PDT study investigated the effect of PDT after different incubation times on prostate cancer cells by using AO/PI staining method. Results show that ICG-PDT inhibits cell viability.

1. Giriş

Genellikle prostatektomi ve radyoterapi yöntemleri kullanılarak tedavi edilmeye çalışılan prostat kanserinin tedavisi amacıyla araştırılmakta olan diğer bir yöntem Fotodinamik Terapidir (FDT) [1]. FDT son yıllarda üzerinde sıkça çalışılan bir uygulama olup, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerine alternatif olabilecek asgari girişimsel (minimal invasive) bir yöntemdir [2, 3]. FDT, fotosensitizan olarak adlandırılan bir kimyasal madde sayesinde ışığa duyarlı hale getirilen hedef dokunun, uygun ışık kaynağı kullanılarak ortadan kaldırılması prensibine dayanır. Ayrı ayrı uygulandıklarında toksik olmayan fotosensitizan madde ve ışık birlikte kullanıldıklarında aktive olarak, hedef bölgedeki serbest oksijen radikalleri (Reactive oxygen species / ROS) miktarını artırmaktadır [2, 4, 5]. FDT sırasında açığa çıkan ROS moleküllerinin yüksek dozlarda olmasının toksik özellik yarattığı ve hücre ölümüne neden olduğu düşünülmektedir [6-8].

Çalışmamızda dokuya giriş mesafesi yüksek olan kızılaltı laser ve bu dalgaboyunda ışığı soğuran İndosiyanin yeşili (ISY) fotosensitizan kullanılmıştır.

*İlgili yazar: kemal.ruhi@boun.edu.tr

ISY, FDT dışında klinikte kalp debisi ölçümü, kan plazma hacmi, karaciğer fonksiyonu ölçümü, retinal ve koroidal damarların görüntülenmesi ve laser dikiş alanlarında da kullanılmakta olan FDA onaylı bir polimetin boyadır. [9-12]. Engel vd. (2008)'nın yaptığı bir çalışmaya göre ISY yan etkisi oldukça azdır ve vücuttan atılımı oldukça hızlıdır [13].

Bu araştırmada belirli dozlarda indosiyanin yeşili ve yakın kızılaltı laser kullanılarak yapılan FDT'nin 24, 48 ve 72 saat sonraki etkisi, akridin oranj (AO) ve propidyum iyodit (PI) boyaması yöntemi kullanılarak ortaya konmuştur. Nükleer boyama kimyasalı olarak kullanılan bu boyalardan AO hem canlı hem cansız hücreleri boyayarak yeşil floresans üretirken, PI sadece ölü hücrelerin bütünlüğü bozulmuş zarlarından geçebilmekte ve onları boyayarak kırmızı floresans üretmesine neden olmaktadır [14].

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre dizisi ve kültür aşaması

Projede kullanılan PC-3 ATCC ® CRL-1435™ prostat kanseri hücreleri, Boğaziçi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü, Hücre Kültürü Laboratuvarında rutin kültür koşullarında kültür edilerek yeterli sayıya ulaşmaları sağlanmıştır.

2.2. Laser sistemi

Bu çalışmada 808 nm dalgaboyunda ışıma yapan bilgisayar kontrollü diyot laser kullanılmış, optik fiber ve kolimatör kullanılarak ışığın kuyucuklara homojen olarak transferi sağlanmıştır.

2.3. FDT uygulaması

Deneylerde kullanılan laser ve ISY dozlarının tek başına hücre canlılığını etkilemediği grubumuz tarafından yapılan önceki deneylerde ortaya konmuştur. Veri burada gösterilmemiştir.

FDT uygulamasında yapılanlar sırasıyla şöyledir;

- Hücreler yeterli sayıya ulaştığında flasklar inkübatörden (%5 CO_2, 37°C) alındı ve hücreler tripsinlenerek kaldırıldı.
- Kaldırılan hücreler hemositometre yöntemiyle sayıldı.
- 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 48 kuyucuklu plakalara ekilip 24 saat inkübe edildi.
- 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyerleri 100 µM ISY içeren besiyerleri ile değiştirildi ve plakalar inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan 24 saat sonra, 100 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki laser ışığı kuyucuklara uygulandı.

2.4. AO/PI boyama yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi

FDT uygulaması sonrasında üç adet plaka 24, 48 ve 72 saatlerde ölçüm almak için inkübasyona bırakılmıştır. Plakalardaki hücreler belirtilen sürelerin sonunda AO/PI boyamasına tabi tutulmuştur.

Kısaca, laser uygulaması sonrasında 1:1 hacimde hazırlanan 25 mg/ml AO ve 25 mg/ml PI solüsyonları ile hücreler 20 saniye boyunca boyanmıştır. Daha sonra 10 saniye boyunca PBS ile yıkanan hücrelerin morfolojisi floresans mikroskopta incelenmiştir. Boyamalardan sonra floresans mikroskobu kullanılarak her kuyucuğun beş ayrı noktasının fotoğrafı çekilmiş ve bu fotoğraflardaki canlı ve canlı olmayan tüm hücreler sayılmıştır. Fotoğraflar üzerinden yapılan hücre sayımları sonucu hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki formül (1) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$H = \frac{C}{T} \times 100 \qquad (1)$$

H: Hücre canlılığı yüzdesi
C: Canlı hücre sayısı
T: Toplam hücre sayısı

2.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS Statistics Viewer V22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle her grubun absorbans değerleri normalize edilmiş ve bu değerlerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm gruplar normal dağılım gösterdiğinden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı One-Way ANOVA testi kullanılarak gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi 5% ($p \leq 0.05$) olarak alınmış ve tüm deneyler üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.

3. Bulgular

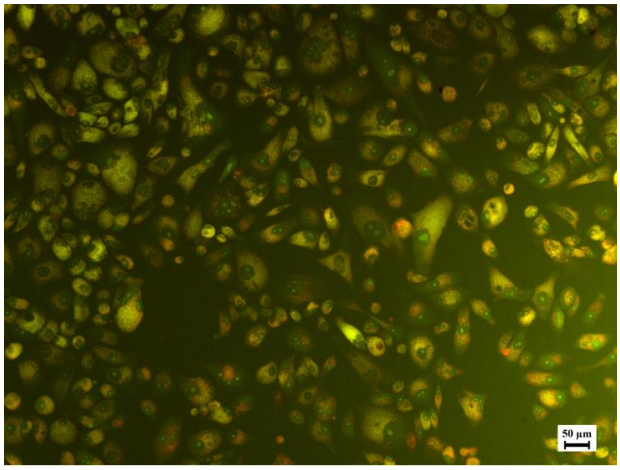
AO/PI boyaması sonrası mikroskop kamerası ile çekilen fotoğraflardan bazıları aşağıda verilmiştir. Şekil 1 ve Şekil 2 kontrol grubunda boyama sonrası aynı bölgeden farklı filtreler kullanılarak alınan, Şekil 3 ve Şekil 4 FDT grubunda boyama sonrası aynı bölgeden farklı filtreler kullanılarak alınan görüntüyü içermektedir.

Çekilen fotoğraflardaki canlı ve canlı olmayan hücreler sayıldıktan sonra her fotoğraf için hücre canlılığı yüzdeleri hesaplanmış ve bu yüzdelerin ortalamaları alınarak Şekil 5'teki grafik oluşturulmuştur.

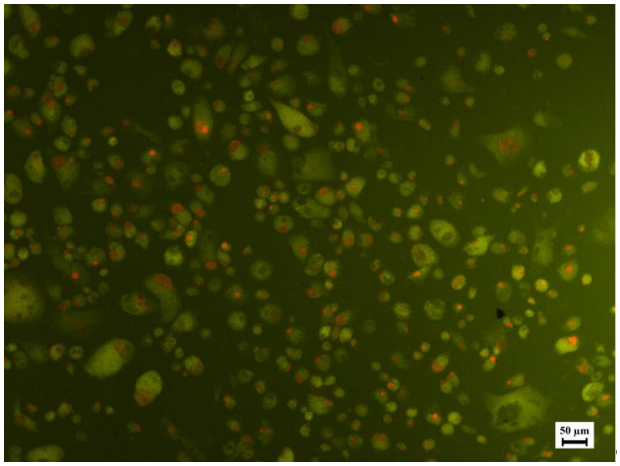
İstatistik sonucuna göre tüm deney gruplarıyla kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı

bir farklılık mevcuttur. (n=5, df=5, f=725.899, sig=0.00).

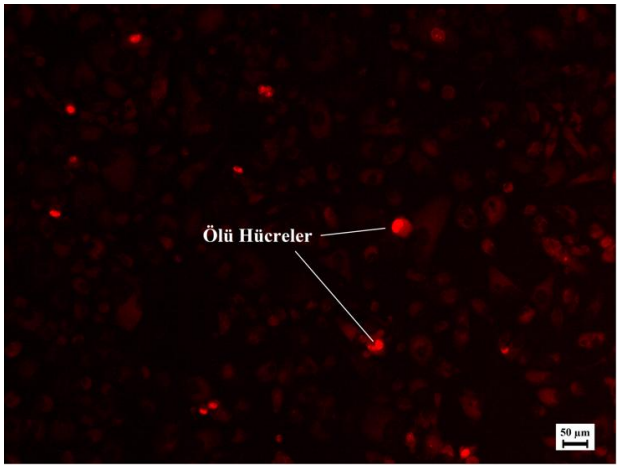
FDT'nin yaklaşık %80 oranında hücre canlılığını yok ettiği görülmektedir. Diğer yandan 24, 48 ve 72 saatlik deney gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Buna göre tedavinin etkinliği zamana bağlı olarak değişmemiştir.



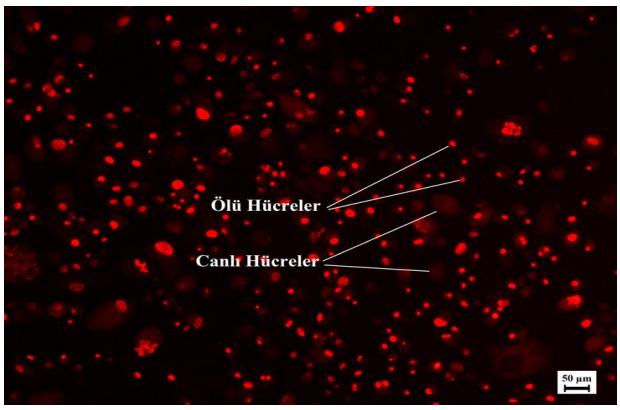
Şekil 1. Kontrol grubunda AO/PI boyaması sonrası hücrelerin görünümü



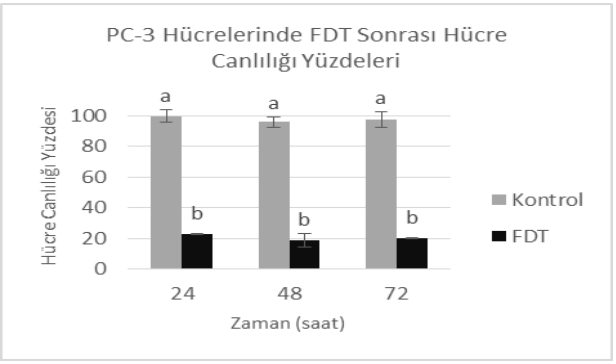
Şekil 2: Kontrol grubunda AO/PI boyaması sonrası cansız hücreler



Şekil 3: FDT uygulaması yapılan grupta AO/PI boyaması sonrası hücrelerin görünümü



Şekil 4: FDT uygulaması yapılan grupta AO/PI boyaması cansız hücreler



Şekil 5: Hücre canlılığı yüzdeleri grafiği

4. Tartışma ve Sonuç

Prostat ve prostat kanseri ile ilgili FDT çalışmalarına bakıldığında Feoforbit-a veya 5-ALA gibi ISY dışındaki fotosensitizanlar kullanılarak yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara rastlanmıştır [15, 16]. Ayrıca FDT'nin uygun parametrelerinin belirlenmesi amacıyla sağlıklı köpek prostatı üzerinde de FDT çalışmaları yapılmıştır. Bu araştırmalarda sağlıklı köpek prostatının kullanılmasının sebebi, köpek prostatının yapısal olarak insan prostatına benzerliği ve sağlıklı dokunun kanserli doku ile benzer şekilde yok edilebileceğinin varsayılmasıdır [17,18]. Kawczyk-Krupka vd (2015)'ın köpek prostat dokusu kullanarak yaptığı başka bir çalışmada 200 J/cm^2 enerji yoğunluğunun dokuda perforasyona neden olmadığı belirlenmiştir [19]. Çalışmamızla benzer olarak, Colasanti vd. (2004)'nın yaptığı *in vitro* araştırmada 805 nm dalgaboylu ve 108 J/cm^2 enerji yoğunluklu laser ışığı, yaklaşık 2 ve 4 µM ISY ile birlikte denemiştir. Radyoterapi ile kombine bir şekilde yapılan FDT uygulamaları sonucunda, bu uygulamaların hücre canlılığını baskılayıcı yöntemler olduğu, fakat iki tedavi yönteminin birbirinden bağımsız çalıştığı belirlenmiştir [20]. Bu yöntemin PC-3 prostat kanser hücrelerinin canlılığını büyük ölçüde baskıladığı bizim çalışmamızda da ortaya konmuştur. Diğer yandan FDT uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra gerçekleştirilen AO/PI boyama sonuçları birbirine benzer sonuçlar vermiş ve bu inkübasyon zamanlarının sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemediği görülmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada, ISY

kullanılarak yapılan FDT uygulamasının prostat kanser hücreleri üzerinde, inkübasyon süresinden bağımsız olarak baskılayıcı özelliğe sahip olduğu AO/PI boyama testi ile ortaya konmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma Boğaziçi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 15XP3 kodu ile desteklenmiştir. Çalışmamız süresince laboratuvarının olanaklarından faydalanmamızı sağlayan Doç. Dr. Bora Garipcan'a teşekkür ederiz.

Kaynakça

[1] Zuluaga, M-F., Sekkat, N., Gabriel, D., van den Bergh, H., Lange, N. 2013. Selective Photodetection and Photodynamic Therapy for Prostate Cancer through Targeting of Proteolytic Activity. Molecular Cancer Therapeutics, 12(3), 306-313.

[2] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: An update. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61, (4), 250-281.

[3] Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S-I. , Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. 2011. Current states and future views in photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 12, 46-67.

[4] Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., Gołab, J. 2005. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. Acta Biochim Pol., 52(2), 339-52.

[5] Robertson, C. A., Evans, D. H., Abrahamse, H. 2009. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 96(1), 1-8.

[6] Doshi, Y., Patil, P. S., Shah, N., Dixit, S., Shah, M. 2010. Photodynamic therapy: A new vista in management of periodontal diseases. Journal of the International Clinical Dental Research Organization, Vol 2, Issue 2, May-August.

[7] Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., K. Bojarczuk, K., Golab, J. 2011. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer, Molecules, 16, 4140-4164.

[8] Ayaru, L., Bown, S. G., Pereira, S. P. 2005. Photodynamic Therapy for Pancreatic and Biliary Tract Carcinoma. International Journal of Gastrointestinal Cancer, vol. 35, no. 1, 04-14.

[9] El-Daly, S. M., Gamal-Eldeen, A. M., Abo-Zeid, M. A. M., Borai, I. H., Wafay H. A., Abdel-Ghaffar, A. R. 2013. Photodynamic therapeutic activity of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 10 (2), 173-185.

[10] Tseng, W. W., Saxton, R. E., Deganutti, A., Liu, C. D. 2003. Infrared laser activation of indocyanine green inhibits growth in human pancreatic cancer, Pancreas, 27(3), 42-45.

[11] Machalkova, K., Skorpikova, J., Svihalek, J., Mornstein, V. 2005. The Study of cytotoxicity and phototoxicity of indocyanine green in vitro. Scripta Medica (BRNO), 78, 305-312.

[12] Berlien, H. P., Müller, G. J. 2003. Applied Laser Medicine. Springer, 205.

[13] Engel, E., Schraml, R., Maisch, T., Kobuch, K., König, B., Szeimies, R. M., Hillenkamp, J., Bäumler W., Vasold, R. 2008. Lightinduced decomposition of indocyanine green. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(5), 177717-83.

[14] Bank, H. L. 1988. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. In Vitro Cellular & Developmental Biology, Volume 24, Number 4.

[15] Xu, D. D., Lam, H. M., Hoeven, R., Xu, C. B., Leung, A. W. N., Cho, W. C. S. 2013. Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 10, 278-287.

[16] Fukuhara, H., Inoue, K., Kurabayashi, A., Furihata, M., Fujita, H., Utsumi, K., Sasaki, J., Shuin, T. 2013. The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 10, 399-409.

[17] Moore, C. M., Emberton, M., Bown, S. G. 2011. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer - An Emerging Approach for Organ-Confined Disease. Lasers in Surgery and Medicine, 43:768–775.

[18] Selman, S. H. 2007. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 4, 26-30.

[19] Kawczyk-Krupka, A., Wawrzyniec, K., Musiol, S. K., Potempa, M., Bugaj A. M., Sieron, A. 2015. Treatment of localized prostate cancer using WST-09 and WST-11 mediated vascular targeted photodynamic therapy - A review. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 12 567–574.

[20] Colasanti, A., Kisslinger, A., Quarto, M., Riccio, P. 2004. Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an in vitro human prostate model. Acta Biochimica Polonica, 51, (4): 103