TÜBİTAK

5-ALA Uygulanmış Farklı Kanser Dokularına Model Hücrelerde Femtosaniye Lazer ile Fotodinamik Tedavinin Teranostik Etkilerinin Araştırılması

Program Kodu: 1002

Proje No: 115Z002

Proje Yürütücüsü:
Doç.Dr. Meltem DEMİREL KARS

Araştırmacı:
Prof. Dr. Hamdi Şükür KILIÇ

Bursiyer:
Seda DEMİRCAN

MART 2019
KONYA

ÖNSÖZ

Fotodinamik terapi (FDT), yerel ya da sistemik ajanlarla ışığa duyarlı hale getirilen hedef lezyonun uygun dalga boyundaki ışık kaynakları ile ışınlanarak ortadan kaldırılması prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemi olarak tanımlanabilir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA, ALA) ya da 5-amino-4-oxo-pentanoik asit ise canlılarda porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak kullanılan bir üründür. FDT'nin mekanizması basit olarak fotosensitizanların (FS) ışık ile aktivasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin esansiyel hücre komponentlerini geri dönüşümsüz biçimde okside ederek doku hasarı ve nekrozu oluşturması prensibine dayanır.

Bu projede MCF-7 (meme kanseri), SKMEL-30 (metastaik melanoma), UMUC3 (ileri evre mesane kanseri), MCF-10A (sağlıklı meme hücresi) hücre hatlarına uygulanan fotodinamik tedavide prekürsor olarak 5-ALA kullanılmıştır. Söz konusu hücrelere ilk etapta ALA ve daha sonrasında femtosaniye lazer ile UV bölgesinden başlayıp NIR (Near Infra Red) bölgesine kadar farklı dalga boylarında, 30 saniye ve 60 saniye femtosaniye lazer uygulanarak SKMEL-30, MCF-7, UMUC3 ve MCF-10A hücrelerinin üremelerine etkisi araştırılmıştır. Önce hücrelere toksik olmayan 5-ALA uygulanmış, UV-NIR bölgesi dalga boylarına femtosaniye lazer ışınına maruz kalan hücrelerde 5-ALA protoporfirin IX'a dönüşerek süperoksit radikallerini meydana getirmesini ve hücreyi ölüme yönlendirmesi beklenmiştir. Bu yöntemle hücre proliferasyonunu azaltan uygun lazer dalga boyu ve ALA miktarlarında fotodinamik tedavi tekrar edilip flow sitometri ile hücrelerde apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır. Hücre canlılık testi sonuçlarına göre 1mM 5-ALA uygulaması ve 400-440 nm ve 600-630 nm Fs laser dalga boyu ışıması ile yapılan 5-ALA-FDT'nin farklı kanser hücrelerine model hücrelerin üremelerinin engellenmesinde en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada diğer bir amaç, floresan özellikte bir madde olan protoporfirin IX'a dönüşebilen floresan özellik taşımayan 5-ALA'nın farklı kanser dokularına model hücrelere (MCF-7,SKMEL-30 ve UMUC3) uygulanarak konfokal mikroskop vasıtasıyla hücre içi görüntüleme yapabilmektir. Çalışmamızda 5-ALA'nın prekürsor olarak kullanılmasının hücre içerisinde floresan PpIX birikimine neden olduğu da konfokal mikrsokop analiziyle görüntülenmiştir. Böylece hem teşhis hem de tedaviye yönelik (teranostik) bir çalışma yürütülerek özellikle cilt ve mesane kanserlerinde uygulanması daha olası bir tedavi yönteminin in-vitro koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvar altyapısı kullanılarak yürütülmüştür.

Bu proje TÜBİTAK (115Z002) tarafından desteklenmiştir.

TÜBİTAK

İÇİNDEKİLER

Önsöz ..... **i**

Şekil Listesi ..... **iii**

Tablo Listesi ..... **iv**

Özet **1**

Abstract **2**

1. Giriş **3**

2. Literatür Özeti **4**

2.1. Fotodinamik Terapi **4**

2.2. 5-Aminolevulinik asit (ALA) **4**

2.3. Aminolevulinik asitin fotodinamik tedavide kullanılması ve klinik önemi **6**

3. GEREÇ VE YÖNTEM **9**

3.1. Hücre Hatları ve Kültür Ortamı **9**

3.2. Hücrelerde ALA Etkisinin Değerlendirilmesi **9**

3.3. Hücrelere ALA-FDT Uygulanması **10**

3.4. Sitotoksisite Analizleri **11**

3.5. 5-ALA Uygulamasıyla Hücrelerde Floresan Birikim Oluşturulması Analizi **11**

3.6. Fotodinamik Tedavi Sonrası Apoptoz, Nekroz Analizleri **12**

4. BULGULAR **13**

4.1. Hücre Hatları ve Kültür Ortamı **13**

4.2. Hücrelerde 5-ALA etkisinin değerlendirilmesi **14**

4.3. Hücrelere 5-ALA-FDT Uygulanmasının etkileri **15**

4.4. ALA Uygulamasıyla Hücrelerde Floresan Birikim Oluşturulması Analizi **22**

4.5. Fotodinamik Tedavi Sonrası Apoptoz, Nekroz Analizleri **23**

4.5.1.MCF-7 hücresi için fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri **23**

4.5.2. UMUC-3 hücresi için fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri **27**

4.5.3.SKMEL-30 hücresi için fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri **30**

5. TARTIŞMA/SONUÇ **34**

6. KAYNAKLAR **36**

TÜBİTAK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Canlılarda ALA biyosentezi iki farklı yolakla gerçekleşmektedir: (1) Süksinil-CoA ve Glisin kullanılarak (Shemin pathway, C-4 pathway) ve (2) glutamat kullanılarak (C-5 pathway) (Sasaki v.d., 2002). **5**

Şekil 2 Protoporfirinin kimyasal yapısı **6**

Şekil 3 Fotodinamik tedavi (TÜBİTAK destekli sonuçlanmış kariyer projemizden alıntıdır, KARS, 2014). **7**

Şekil 4 Uygun besiyeri ortamlarında kültüre edilmiş MCF-7, MCF-10A, SKMEL-30 ve UMUC-3 hücrelerinin ters mikroskopla elde edilen görüntüleri. **13**

Şekil 5 MCF-7 hücrelerinin farklı ALA miktarlarıyla 24 saatlik inkübasyonundan sonraki görüntüleri. A) No-ALA control, B) 5mM ALA, C) 2,5 mM ALA, D) 1,25 mM ALA görüntüleri **15**

Şekil 6 ALA uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi. **16**

Şekil 7 ALA uygulanmışUMUC-3 mesane kanseri hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi. **16**

Şekil 8 ALA uygulanmış SKMEL-30 melanoma hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi. **17**

Şekil 9 ALA uygulanmış MCF-10A hücrelerinde 440 nm ve 630 nm dalga boylarının 30 ve 60 saniye süre ile uygulanmasıyla oluşan FDT etkisi....**18**

Şekil 10 UMUC-3 hücrelerinde hücre içi floresan birikim 5- A) 5-ALAsız kontrol B) ALA uygulaması ve PBS yıkamalardan sonra (40X-oil, 512x512). **22**

Şekil 11 MCF-7 hücrelerinin 440 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **24**

Şekil 12 MCF-7 hücrelerinin 440 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **25**

Şekil 13 MCF-7 hücrelerinin 660 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **26**

Şekil 14 MCF-7 hücrelerinin 660 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **27**

Şekil 15 UMUC-3 hücrelerinin 420 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **28**

Şekil 16 UMUC-3 hücrelerinin 420 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **28**

Şekil 17 UMUC-3 hücrelerinin 630 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **29**

Şekil 18 UMUC-3 hücrelerinin 630 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **29**

Şekil 19 SKMEL-30 hücrelerinin 400 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **30**

Şekil 20 SKMEL-30 hücrelerinin 400 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **31**

Şekil 21 SKMEL-30 hücrelerinin 600 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **31**

Şekil 22 SKMEL-30 hücrelerinin 600 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri **32**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Kullanılan hücre hatları ve kültür ortamları **.....9**
Tablo 2 FDT sonrası UMUC-3 canlılık analizi**……..19**
Tablo 3 FDT sonrası SKMEL-30 canlılık analizi**……..…..20**
Tablo 4 FDT sonrası MCF-7 canlılık analizi**…….……..21**

ÖZET

5-Aminolevulinik asit (5-ALA, ALA) canlılarda porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak kullanılan bir moleküldür. Normal Heme metabolizmasında ALA hücre içinde floresan özellikteki bir madde olan protoporfirin IX'a (PpIX) dönüşmektedir. PpIX ışık altında serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin hücre içinde birikmesi hücre üzerine sitotoksik bir etki meydana getirmektedir. Fotodiinamik tedavi (FDT) fotosentizan maddenin uygulanması ve tedavi edilecek bölgenin lazer kaynağı ile ışınlanması temeline dayanan bir fotokemoterapidir.

Bu projede MCF-7 (meme kanseri), SKMEL-30 (metastaik melanoma), UMUC3 (ileri evre mesane kanseri), MCF-10A (normal meme dokusu) hücre hatlarına uygulanan fotodinamik tedavide prekürsor olarak ALA kullanılmıştır. Söz konusu hücrelere ilk etapta ALA ve daha sonrasında femtosaniye lazer ile UV bölgesinden başlayıp NIR (Near Infra Red) bölgesine kadar farklı dalga boylarında (230 nm-800 nm), 30 saniye ve 60 saniye femtosaniye lazer uygulanarak SKMEL-30, MCF-7, UMUC3, MCF-10A hücrelerinin üremelerine etkisi araştırılmıştır. Bu yöntemle hücre proliferasyonunu azaltan uygun lazer dalga boyu ve ALA miktarlarında fotodinamik tedavi tekrar edilip flow sitometri ile hücrelerde apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır. Bu çalışmada diğer bir amaç, floresan özellikte bir madde olan protoporfirin IX'a dönüşebilen ALA'nın farklı kanser dokularına model hücrelere (MCF-7,SKMEL-30 ve UMUC3) uygulanarak konfokal mikroskop vasıtasıyla hücre içi görüntüleme yapabilmektir.

Sonuç olarak hücre canlılık testi ve apoptoz/nekroz analizleri sonuçlarına göre 400-440 nm ve 600-630 nm Fs laser dalgaboyu ışıması ile yapılan 5-ALA-FDT'nin farklı kanser hücrelerine model hücrelerin üremelerinin engellenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında, 630 nm'de Fs indüklemesiyle, 30 sn ve 60 sn uygulama sürelerinden sonra apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümünün belirgin olduğu gözlendi. 5-ALA'nın prekürsor olarak kullanılmasının hücre içerisinde floresan PpIX birikimine neden olduğu da konfokal mikroskop analiziyle görüntülenmiştir. 5-ALA ve Fs lazer ile yapılan fotodinamik tedavinin farklı kanser dokularına model hücrelerin proliferasyonunu azalttığı ve 5-ALA'nın kanser hücrelerinde PPIX'u artırıp floresan birikime neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle 5-ALA FDT ve görüntülemede aynı anda kullanılabilecek etkili bir teranostik etkendir. Bu çalışmayla lazer dalga boyunun FDT'nin etkisini belirleyen önemli bir parametre olduğu da belirlenmiştir. Ayrıca literatürle karşılaştırıldığında kısa süreli Fs lazer uygulamasının, sürekli lazer uygulamalarına göre FDT için etkili bir kaynak olabileceği sonucu da ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik tedavi, 5-ALA (Aminolevulinik Asit), MCF-7, UMUC3, SKMEL-30, Femtosaniye Lazer

ABSTRACT

5-Aminolevulinic acid (5-ALA, ALA) is a molecule which is used as precursor in biosynthesis of tetrapyrols such as porphyrin, vitamin B12 and chlorophyll, in living organisms.. In normal Heme metabolism, ALA is transformed into a fluorescent agent protoporphyrin IX (PpIX), in the cells. PpIX forms free oxygen radicals (O_2) under light source. . The accumulation of free oxygen radicals results in cytotoxic effect in the cell. Photodynamic treatment (PDT) is a photocemotherapy based on the application of photosensitizing agent and irradiation of the region to be treated by laser source.

In this project, photodynamic therapy was applied on to MCF-7 (breast canser), SK-MEL30 (metastatic melanoma), UMUC-3 (high grade urinary bladder cancer), MCF-10A (normal breast tissue) cell lines; ALA was used as precursor material for the production of photosensitizer. The cells were firstly treated with ALA and then femtosecond laser at the wavelengths selected from UV to NIR (Near Infra Red) region (230 nm-800 nm) for 30 seconds and 60 seconds periods. The effect of PDT on the proliferation of SKMEL-30, MCF-7, UMUC3, MCF-10A was investigated. Consequently, photodynamic therapy was repeated with appropriate ALA amount and at the selected laser wavelengths that caused decrease in cell proliferation. After the application, apoptosis / necrosis was measured in the cells by flow cytometry. Another objective of this study was to perform intracellular imaging in the different types of cancer tissues (MCF-7, SKMEL-30 and UMUC3) by means of a confocal microscope through application of ALA that is converted into fluorescent agent protoporphyrin IX.

According to the cell viability tests and apoptosis/necrosis analysis results; the most effective Fs laser wavelengths that prevent cell viability of different cancer cell lines, were found to be 400-440 nm and 600-630 nm. . PDT at 630 nm exerted cell death by necrosis and apoptosis after 30 s and 60 s treatment periods. The use of 5-ALA as a precursor of PpIX accumulation for fluorescence analysis in the cells, was also demonstrated by confocal microscopy. Photodynamic therapy with 5-ALA and Fs laser have been demostrated to reduce the proliferation of model cells of different cancer tissues. Therefore, 5-ALA is an effective theranostatic agent that can be used simultaneously in PDT and imaging. In this study, it was determined that laser wavelength is an important parameter that determines the faith of PDT. In addition, compared to the literature, short-term Fs laser application can be an effective source of PDT with respect to continuous laser applications.

Keywords: Photodynamic therapy, 5-ALA (Aminolevulinic acid), MCF-7, UMUC3, SKMEL-30, femtosecond laser

1. GİRİŞ

Fotodinamik terapi (FDT), yerel ya da sistemik ajanlarla ışığa duyarlı hale getirilen hedef lezyonun uygun dalga boyundaki ışık kaynakları ile ışınlanarak ortadan kaldırılması prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemi olarak tanımlanabilir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA, ALA) ya da 5-amino-4-oxo-pentanoik asit ise canlılarda porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak kullanılan bir üründür. FDT'nin mekanizması basit olarak fotosensitizanlar'ın (FS) ışık ile aktivasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin esansiyel hücre komponentlerini geri dönüşümsüz biçimde okside ederek doku hasarı ve nekrozu oluşturmasına dayanır. Bu olay şöyle gerçekleşir: ışık emilimini takiben FS daha yüksek üçlü enerji durumuna uyarılır ve bu uyarılma ile ya bir substrat ile reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturur (tip 1 reaksiyon) veya enerjisini moleküler oksijene transfer ederek yüksek derecede reaktif olan tekil oksijen meydana getirir (tip 2 reaksiyon). Klinik FDT'de daha çok hakim olan tip 2 reaksiyondur. Reaktif tekil oksijen hedef dokuda vasküler endoteli ve hücre membranlarını hasarlayarak doku yıkımına neden olur. Eksite olan oksijenin yaşam süresinin kısa olması nedeniyle hasar çok lokalizedir ve daha uzaktaki sağlıklı doku etkilenmez. Reaktif tekil oksijen hedef dokuda apopitozis ve vasküler endotel hasarına neden olur. Hücre hasarı, lizozomal membran ve mitokondriyal kökenlidir.

Bu projede MCF-7 (meme kanseri), SKMEL-30 (metastaik melanoma), UMUC3 (ileri evre mesane kanseri), MCF-10A (normal meme dokusu) hücre hatlarına uygulanan fotodinamik tedavide prekürsor olarak ALA kullanılmıştır. Söz konusu hücrelere ilk etapta ALA ve daha sonrasında femtosaniye lazer ile UV bölgesinden başlayıp NIR (Near Infra Red) bölgesine kadar farklı dalga boylarında, 30 saniye ve 60 saniye femtosaniye lazer uygulanarak SKMEL-30, MCF-7, UMUC3, MCF-10A hücrelerinin üremelerine etkisi araştırılmıştır. Hücrelere uygulanan 5-ALA protoporfirin IX'a dönüşerek UV-NIR bölgesi dalga boylarında FS lazer uyarımıyla süperoksit radikallerini meydana getirmesi ve hücreyi apoptoza yönlendirmesi sağlanmıştır. Bu yöntemle hücre proliferasyonunu azaltan uygun lazer dalga boyu ve ALA miktarlarında fotodinamik tedavi tekrar edilip flow sitometri ile hücrelerde apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır. Bu çalışmayla ulaşılan diğer bir sonuç ise, floresan özellikte bir madde olan protoporfirin IX'a dönüşebilen ve floresan olmayan ALA'nın farklı kanser dokularına model hücrelere (MCF-7,SKMEL-30 ve UMUC3) uygulanarak konfokal mikroskop vasıtasıyla hücre içi görüntüleme yapılmış olmasıdır. Böylece hem teşhis hem de tedaviye yönelik (teranostik) bir çalışma yürütülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (FDT), yerel ya da sistemik fotosentizan maddelerle ışığa duyarlı hale getirilen hedef lezyonun uygun dalga boyundaki ışık kaynakları ile ışınlanarak ortadan kaldırılması prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemi olarak bilinmektedir (Tope v.d., 2003).

FDT konusundaki ilk deneysel gözlem 1900 yılında "Oscar Raab" isimli bir tıp öğrencisi tarafından yapılmıştır. Tümör tedavisinde ilk kez kullanımı ise 1978 yılında gerçekleşmiştir. 1990 yılında Avustralyalı Kennedy ve arkadaşları, ilk kez yerel amino levülinik asit (ALA) kullanmak suretiyle deri tümörlerini tedavi etmişlerdir. Tedavi yöntemi ilk kez 1995 yılında özefagus kanseri için FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almış, deri hastalıkları alanında ise ilk kez 1999 yılında aktinik keratozlar için FDA onayı verilmiştir (Hönigsmann v.d., 2008).

FDT dermatolojide onkolojik ve non-onkolojik hastalıkların yanı sıra bazı bronkopulmoner, gastrointestinal (Dilkes v.d., 1996), kolorektal (Wang v.d., 2007), genitoüriner (Denzinger v.d., 2008) ve hatta serebral malignitelerde de kullanılmaktadır (Varma, 2001). En etkili olduğu ve yaygın olarak kullanıldığı endikasyonlar ise aktinik keratoz (Jeffes v.d., 1997), Bowen hastalığı (Calzavara, 2008) ve yüzeyel bazal hücreli karsinomdur (Gold, 2004; Zelickson, 2005).

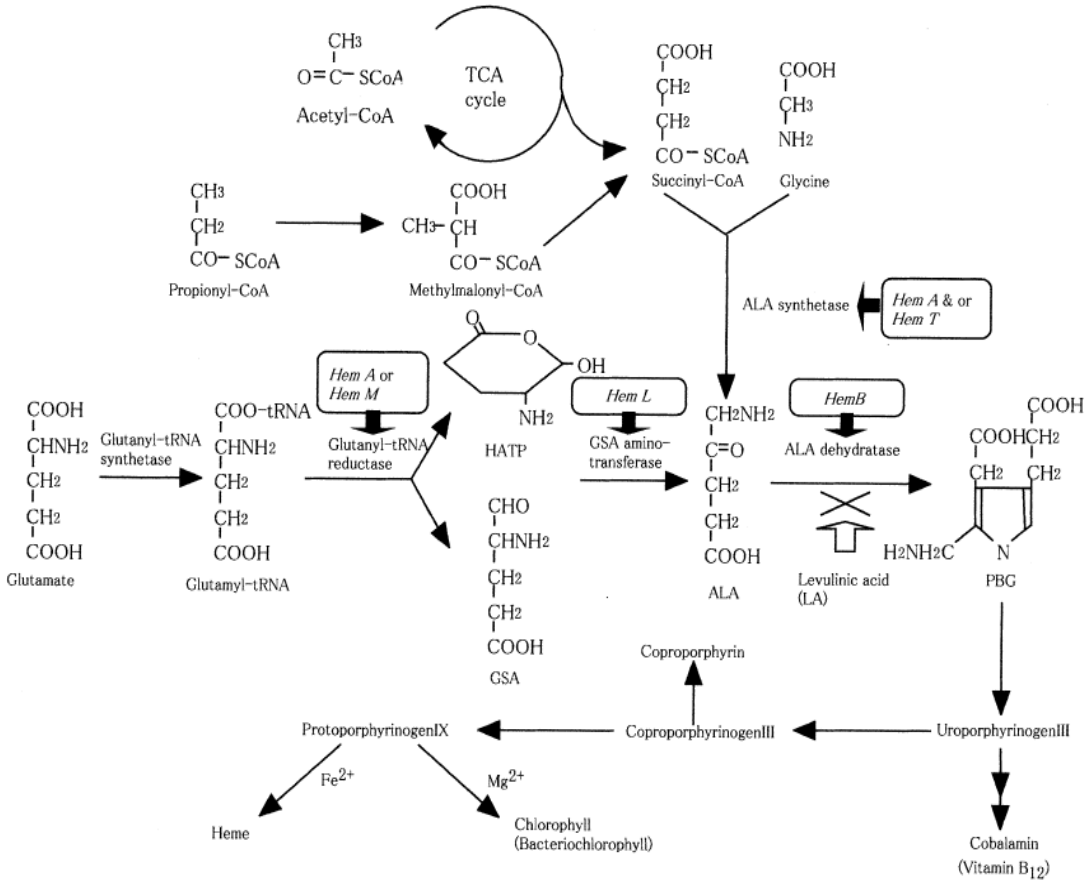
Fotodinamik tedavinin avantajları

- Hedef dokuya özgün olması,
- Derin etki göstermemesi,
- Bir seansta çok sayıda lezyon iyileştirmesi,
- Hastalar tarafından iyi tolere edilmesi,
- Tekrarlayan uygulamalarla birikim toksisitesi göstermemesi,
- İyi kozmetik sonuçlar vermesidir (Tope, 2003).

2.2. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA)

5-Aminolevulinik asit ya da 5-amino-4-oxo-pentanoik asit, porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak yer almaktadır (Tangprasitip v.d., 2007; Beale, 2006; Sasaki v.d., 2002). Canlılarda ALA biyosentezi iki farklı yolakla gerçekleşmektedir: (1) Süksinil-CoA ve Glisin kullanılarak (Shemin pathway, C-4 pathway) ve (2) glutamat kullanılarak (C-5 pathway) (Sasaki v.d., 2002).

Bu iki yolak Şekil 1'de gösterilmektedir.

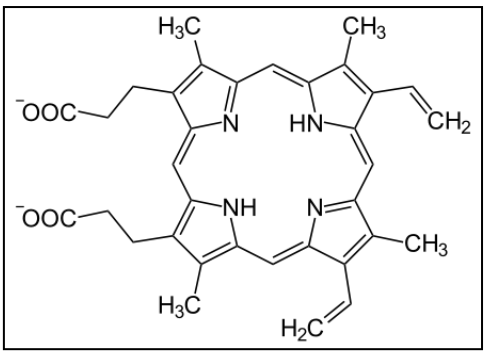


Şekil 1. Canlılarda ALA biyosentezi iki farklı yolakla gerçekleşmektedir: (1) Süksinil-CoA ve Glisin kullanılarak (Shemin pathway, C-4 pathway) ve (2) glutamat kullanılarak (C-5 pathway) (Sasaki v.d., 2002).

5-aminolevulinik asitin (ALA olarak da kullanılmaktadır) tarım, medikal ve biyoteknoloji alanlarında kullanılma potansiyeli vardır (Sasaki v.d., 2002). Foto yaşlanmış deri, aktinik keratozlar, psoriasis, açık yaralar ve bazal hücreli karsinom (BHK)'larda ve skuamöz hücreli karsinom (SHK)'larda olduğu gibi anormal keratin tabakaları normal bir deriye göre artmış bir ALA penetrasyonu gösterirler. Ayrıca tümör hücreleri gibi hızlı bir döngüye sahip hücreler daha çok PPIX üretir. Normal derinin ALA'ya göreceli duyarsızlığı ve tümör hücrelerinde ALA'nın artmış döngüsü hasta dokunun seçicilik nedenleridir. ALA ile indüklenen PPIX vücuttan 24 saatte temizlenir.

ALA'nın ana avantajları hızlı temizlenmesi nedeniyle uzun süreli sistemik fotosensitivitesinin olmayışı, tedavinin tamamının yani fotosensitizasyon ve ışınlamanın aynı günde tamamlanabilmesidir (Gold v.d., 2005).

ALA porfirin ve klorofil gibi tetrapirollerin sentezinde prekürsor madde olarak kullanılmaktadır. Fazla miktarlarda ALA kullanıldığı zaman hücrede (bitki veya hayvan) protoporfirin IX akümülasyonu olmaktadır. Protoporfirin IX (PpIX) ise ışık altında serbest oksijen radikalleri oluşturmakta ve bu da hücreye zarar vermekte ve sonunda hücre apoptoz veya nekroz yoluyla ölmektedir. Protoporfirin IX floresan bir madde olması nedeniyle de uygulama alanlarında avantaj sağlamaktadır (Sasaki v.d., 2002; Tangprasittipap ve Prasertsan, 2002; Beale, 2006). ALA uygulanan hücrelerde yüksek derişimlerde PpIX birikimi olmakta ve bu hücreler ışığa maruz kaldıkları zaman hücreleri öldüren serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (Kars v.d., 2014).



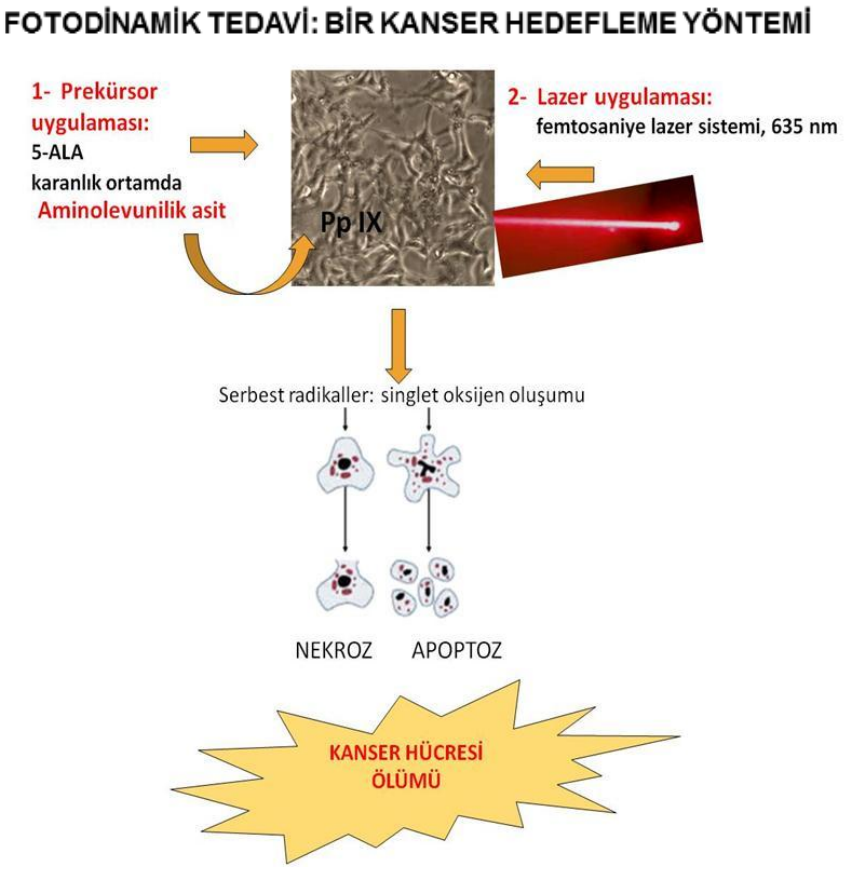
Şekil 2. Protoporfirin IX'un kimyasal yapısı

2.3. Aminolevulinik asit'in fotodinamik tedavide kullanılması ve klinik önemi

Fotodinamik tedavi (FDT) ışığa duyarlı (fotosentizan) maddenin topikal ya da sistemik yolla uygulanmasından sonra ilgili bölgenin uygun ışık kaynakları ile ışınlanması prensibine dayanan bir tür fotokemoterapidir. Fotosentizan madde ve ışık etkileşimi reaktif oksijen radikalleri oluşturarak istenmeyen dokunun nekroz veya apoptoza bağlı ölümünü ve yok edilmesini sağlar (Dougherty v.d., 1998). Fotosensitizan madde olarak porfrin prekürsörü ve deriveleri kullanılırken; ışık kaynağı olarak sürekli lazer, pulslu lazer, LED lambalar veya inkoherent ışık kaynakları kullanılabilmektedir. FDT dermatolojide malign hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Birol ve Kundakçı, 2000). Fotodinamik tedavi aynı zamanda retinada bulunan sarı noktadaki bozulmaların, yani yaşa bağlı makuler dejenerasyon tedavisinde de kullanılmaktadır (Brown ve Mellish, 2001). Bu yöntem cilt ve göz hastalıklarının tedavisi ve diğer tümör hücrelerini yok etmek amacıyla da uygulanmaktadır (Gluck v.d., 1996). Malignan hücreler fotosentizan maddeyi normal hücrelere oranla daha fazla aldıkları veya biriktirdikleri için, ışığa maruz kaldıklarında normal hücrelere göre daha çabuk ölürler (Lydaki v.d., 1997; Daziano v.d., 1998). Bu özelliğiyle FDT bir çeşit seçici

mekanizmaya sahiptir. Metastatik meme kanseri dünya çapında en zor tedavi edilen meme kanseri türlerindendir. Hastanın tedavi yöntemlerine dirençlilik göstermesi pek çok faktöre bağlı olabilmektedir. Son yıllarda kemoterapötik hedefler geliştirilmesi alanlarında bilimsel çalışmalar olmasına rağmen daha gelişmiş tedavi yöntemlerine gereksinim vardır. Metastatik meme ve mesane kanseri üzerinde yoğun araştırmalar ve klinik denemeler yapılmaktadır, fakat hastalığın prognozu ve sağ kalım süresinde önemli ilerlemeler kaydedilememiştir. Mesane ve meme kanseri geleneksel kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olduğu için immünoterapi, radyoterapi ve gen terapisinin uygulandığı çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Bu gelişmelere rağmen daha yeni ve etkili bir tedavi yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. 5-ALA'nın kendisi doğrudan ışığa duyarlandırıcı özelliğe sahip değildir, fotosentizan olan protoporfirin IX'a (PpIX) metabolize olur (Szeimies v.d., 1996). Protoporfirin IX'un fotoaktivasyonu sonucu oluşan reaktif ve kısa ömürlü sitotoksik serbest oksijen radikalleri mitokondrial ve lizozomal membranlarda önemli düzeyde hücre hasarına ve sonrasında apoptoz ve nekroza sebep olurlar (Linuma v.d., 1994).

Fotodinamik terapi kısaca aşağıdaki gibi şematize edilebilir:



Şekil.3 Fotodinamik tedavi (Araştırmacısı olduğum TÜBİTAK destekli sonuçlanmış kariyer projesi çıktısı olan yayından alıntıdır, Kars v.d, 2014).

Ayrıca PpIX'un diğer fotosentizanlara göre kısa, 48 saatten daha uzun olmayan yarı ömrünün olması da önemli bir avantajdır.(Casas, 2001; Kennedy v.d, 1990; Fukuda v.d., 1993). Bu şekilde hedef dokuda uzun süre birikimi de önlenmiş olur. Protoporfirinin heme'e metabolize edilmesinde rol alan ferro şelataz enzimi PpIX'un uzun süreli birikimi engellenmektedir. Bu enzimin aktivite veya ifadesinin, tümör hücrelerinde daha az olduğu belirtilmektedir. Tümör hücrelerinde PpIX birikimi normal hücrelere göre daha fazla olduğu için tümör hücrelerinin ALA-FDT foto-kemoterapisine duyarlı olduğu belirtilmiştir (Malik v.d., 1987; Gibson v.d, 1999). Bu gerçek de ALA-FDT tedavisinin tümörü hedefleyen ve kanser tedavisinde umut olabilecek bir tedavi olduğunu göstermektedir. Nitekim ALA-FDT tedavisi meme kanserinin yanısıra cilt kanseri ve cilt hastalıkları (Lui v.d,, 1992) akciğer (Baumgartner, 1996), endometrium (Wyss v.d., 1998) ve beyin (Stummer v.d., 1998) gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde uygulanmıştır.

Protoporfirin IX bir porfirin derivesidir, yapılarında pirol halkaları bulunur. Bu bileşikler görününür ışığı emer, güneş ışığını direkt bir fotosentizan olarak kullanır. PpIX 405 nm ışık ile uyarıldığında 610nm dalga boyunda floresan ışık yayar. Floresan ışık kısa sürede, reaktif oksijen radikalleri oluşumuyla kaybolur (Bark, 2010). Kırmızı renk veren floresan özelliğinden dolayı protoporfirin IX aynı zamanda görüntüleme amaçlı klinik yöntemlerde ve malignant hücrelerin erken teşhisinde kullanılmaktadır (Krıegmair, 1996). PpIX bu özelliği ile cerrahi müdahaleler sırasında uygulama yapılan bölgenin floresan olarak görüntülenmesinde de kullanılabilmektedir.

Proje yürütücüsünün daha önce araştırmacı olduğu TÜBİTAK destekli kariyer projesinde (TÜBİTAK-111T523) elde edilen sonuçlar, 1mM ALA'nın oluşturduğu fotosentizan PpIX'un 635 nm dalgaboyunda femtosaniye lazere maruz bırakılması sonucu SKMEL-30 hücrelerinde proliferasyon %30 seviyelerine düşmüştür. Bahsi geçen Kariyer projesinde SKMEL-30 melanoma hücrelerinde 1 ve 2 mM ALA uygulanan hücrelerde yalnızca 635nm ve 800 nm dalga boylarında femtosaniye lazer ile oluşturulan fotodinamik tedavinin etkisi belirlenmiştir. 635 nm dalga boyu uygulamasının hücre proliferasyonunu daha çok düşürdüğü ortaya koyulmuştur (Kars v.d, , 2014). Bu projede ise farklı kanser türlerine ve dokularına model hücrelerde UV bölgesinden (230nm) başlayarak NIR bölgesine (800nm) değişen toplam 30 dalga boyunda femtosaniye lazer uygulanıp FDT etkisi belirlenmiştir. Lazer uygulamaları Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Hızlı Lazer Ünitesinde Prof. Dr. Hamdi Şükür Kılıç yürütücülüğünde yapılmıştır

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre hatları ve kültür şartları

Projede meme kanseri MCF-7, cilt kanseri SKMEL-30, mesane kanseri UMUC-3, normal meme dokusu MCF-10A gibi tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hatları kullanılmıştır. Hücrelerin kültür ortamı olarak %10 (v/v) fötal dana serumu (fetal bovine serum, FBS) içeren RPMI 1640 (MCF-7, MCF-10A) vasat , %10 FBS içeren MEM Earl's (UMUC-3) vasat, %10 FBS içeren DMEM F12 (SKMEL-30) vasat kullanılacaktır. Bakteri enfeksiyonunu önlemek için MCF-7 ve UMUC-3 hücrelerinin vasatına gentamisin (1mg/ml), SKMEL-30 hücre hattına ise %1 penisilin/streptomycin eklenerek, hücreler 37°C'de, %5'lik CO_2'de inkübatörde bekletilmiştir. Yapışkan hücreler hücre kültürü kabının %70'ini kapladığında tripsin-EDTA ile yeni kültür ortamına pasajlanmıştır. Çalışma sırasında, hücreler sıvı nitrogen içinde dondurularak saklanmıştır.

Tablo 1. Kullanılan hücre hatları ve kültür ortamları

Hücre Hattı	Kullanılan Medium	Antibiyotik Miktarı (v/v)	FBS Miktarı
MCF-7, MCF-10A	RPMI 1640	% 0.1 Gentamisin	%10 FBS
SKMEL-30	DMEM F12	% 1 Penicilin/ Streptomycin	%10 FBS
UMUC-3	MEM Earl's	% 0.1 Gentamisin	%10 FBS

3.2. Hücrelerde ALA etkisinin değerlendirilmesi

ALA'nın tek başına etkisinin meme, cilt ve mesane hücrelerinde belirlenmesi için 3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl] 1-2,5-diphenyltetrazolium bromide (XTT) kiti kullanılmıştır. ALA uygulanmış hücreler 96 gözlü kültür kaplarında vasat kontrol, ALA kontrol ve hücre kontrol gözleri hariç her göze 10^4 hücre ekilerek hücreler bir gece üreme ortamında bekletilmiştir. 24 saat sonra her göze XTT çözeltisi (50µl) eklenmiş ve canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerinin oluşması için hücreler 4 saat daha bekletilmiştir. Hücre üremesindeki inhibisyon, kromojenik ürünün 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve % proliferasyon değişiminin hesaplanması ile bulunmuştur (Kars v.d.,, 2006). Hücrelere tek başına toksik olmayan ALA konsantrasyonu belirlenmiş ve FDT deneylerinde bu ALA miktarlarıyla deneyler sürdürülmüştür.

3.3. Hücrelere ALA-FDT uygulanması

ALA kullanarak yapılan fotodinamik tedavi uygulaması için hücreler trifan mavisi ile boyanarak ışık mikroskop altında aşağıda verilen protokole uygun olarak sayılmıştır;

- Medium aspire edilir.
- 1 ml (T25 kültür kabı için 1 ml, T75 kültür kabı için 2ml) Tripsin ile hücreler flasktan kaldırılır. 37°C'de % 5 CO_2 ve nemli etüvde hücreler kalkana kadar bekletilir.
- Mikroskop altında hücrelerin kalkıp kalmadığı kontrol edilir.
- Hücreler kalktıysa 5 ml medium (T25 için toplam hacim 6 ml'ye, T75 için 7 ml'ye tamamlanır) ile 15 ml'lik falcon tüpüne alınır ve 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır, peletin üzerine 10 ml medium eklenir (dilüe edilir) ve iyice pipetaj yapılır (İyice karışması için pastör pipeti ile de pipetaj yapılır).
- 9 µl falcon tüpünün içerisinden alınır ve cam bir tüpe konulur ve üzerine 100 µl Trypan blue eklenerek pipetaj yapılır.
- 15 µl örnek alınarak thoma lamında sayılarak gerekli miktar hesaplanır.

Daha sonra hücreler 96 gözlü hücre kaplarına (10,000 hücre/kuyu) ekilip normal kültür ortamında, inkübatörde bir gece bekletilmiştir. Daha sonra hücreler her kuyucuğa eşit miktarda toksik olmayan ALA dozu uygulanarak (1 mM), bir gece inkübe edilmiştir. Işık kaynağı ışık spektrumundan seçilen 30 dalga boyunda (800, 770, 740, 710, 690, 660, 630, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440, 420, 400, 380, 360, 340, 320, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230nm) femtosaniye lazer ışınıdır. Lazer kaynağı 45 mW/cm^2 güce ayarlanmıştır. Bu değer daha önceki projede çeşitli denemelerle optimize edilmiştir. 30 saniye ve 60 saniye olmak üzere farklı sürelerde lazere maruz kalan hücreler aynı kültür ortamında 24 saat diğer analizler için bekletilmiştir. Lazer uygulaması 96 kuyulu kültür plakaların tabanından yapılmıştır ve ışının plakanın iç tarafına geçtiğinde azalan enerjisi hesaplanarak lazer uygulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Femtosaniye lazer sistemi, aşırı kısa 90 fs süreli, 1kHz tekrarlama oranına sahip laser pulsları halinde 200-2500 nm dalga boyu bölgesinde lazer demeti üretmektedir. Lazer sisteminin aşırı kısa laser pulsları sağlaması nedeniyle sadece lazer spot hacmi içerisinde kalan bölgeye enerji transferi gerçekleştirmekte çevresel ısınmaya neden olmamaktadır. Lazer enerjisi dairesel nötral densiteli filtre kullanılarak kontrol edilmekte ve optik güç ölçer ile ölçülmektedir. Bu metod ile lazer enerjisi azaltılır ve böylece çevre dokularda oluşan termal ve mekanik hasar minimum düzeye indirgenir. Lazer uygulamaları Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Hızlı Lazer Ünitesinde Prof. Dr. Hamdi Şükür Kılıç yönetiminde yapılmıştır.

3.4. Sitotoksisite analizleri

ALA-FDT'nin fototoksik etkisinin meme, cilt ve mesane hücrelerinde belirlenmesi için 3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl] 1-2,5-diphenyltetrazolium bromide (XTT) kiti kullanılmıştır. Hücreler 96 gözlü kültür kaplarında vasat kontrol, ALA kontrol ve hücre kontrol gözleri hariç her göze 10^4 hücre ektikten sonra hücreler bir gece üreme ortamında bekletilmiştir. Farklı dalga boylarına 30 ve 60 saniye maruz kaldıktan 24 saat sonra her göze XTT çözeltisi (50µl) eklenmiş ve canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerinin oluşması için hücreler 4 saat daha bekletilmiştir. Hücre üremesindeki inhibisyon, kromojenik ürünün 490 nm (ref. 630 nm) dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve % proliferasyon değişiminin hesaplanması ile bulunmuştur (Kars v.d, 2006). ALA-FDT ve toksisite analizleri en az üç tekrarlı yapılmıştır.

Bu çalışmada, FDT dalga boyları ALA-fototerapi ile tedavi edilen kanser hücrelerinin canlılığı% 50-60'a kadar olduğunda etkili olarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı testleri genellikle canlılığın yüzde ellisini engelleyen koşulları bulmayı amaçlar (IC_{50} değeri v.b.). Bu yüzden, burada hücre ölüm mekanizmalarını incelemek için, hücre canlılığının % 50-60'a kadar ve daha düşük olduğu koşulları seçtik. Aynı zamanda kontrol hücresi canlılığı ise yüzde 50'nin üzerinde olmalıdır. Bu şartları sağlayan uygulama parametrelerinde apoptoz-nektroz analizi yapılarak hücre ölümü mekanizmalarının daha doğru bir aralıkta ifade edebileceği düşünülmüştür.

3.5. 5-ALA Uygulamasıyla hücrelerde floresan birikim analizi

Hücrelerde Protoporfirin IX birikiminin floresan spektrofotometre ile belirlenmesi için hücreler flasklara ekilip bir gece kültüre edilmiştir. Hücrelerin yüzeyleri serumsuz besiyeri ile yıkanıp, serumsuz besiyerine ALA eklenerek karanlık ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. Kontrol flasklarına ALA eklenmemiştir. Karanlıkta tutmak, ışık ve ALA'nın etkileşerek hücrelerde fototoksik etkisinin engellenmesi için önemlidir. Numuneler soğuk PBS ile üç kez yıkandıkdan sonra konfokal mikroskop (Nikon A1+) ile canlı hücrede floresan tespit edilmiştir (Emisyon: 614 nm). ALA muamele edilmemiş hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı dedektölerden alınan (SD, TD) aydınlık alan ve konfokal görüntüleri çakıştırılıp hücre içi floresan birikimi gösterilmiştir (NIS elements software).

3.6. Fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri

Fotodinamik tedavi yöntemi uygulanarak hücreleri ölüme götüren mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır. XTT analizleriyle hücrelerin proliferasyonuna olumsuz etki eden şartlar belirlendikten sonra, hücreleri ölüme götüren şartlar lazer dalga boyu ve süre) tekrar edilip Apoptoz/ Nekroz analizleri yapılmıştır. Kısaca, UMUC-3 hücreleri için 630 nm ve 420 nm; SK-MEL-30 hücreleri için 600 nm ve 400 nm ve MCF-7 hücleri için 440 nm ve 630 nm fs lazer uygulaması 30s ve 60s süreleri yapılmıştır. Bir gece inkübasyondan sonra hücreler kültür kaplarından tripsin ile ayrıştırılarak, apoptoz-nektoz ölüm mekanizmaları araştırılmıştır.

Bu amaçla apoptoz belirteci Annexin V (APC floresan boyası ile konjuge), nekroz belirteci 7-AAD florasan kitleri BD'den temin edilmiştir. Fotodinamik tedavinin MCF-7, UMUC-3 ve SKMEL-30 cilt kanseri hücrelerini öldürme mekanizması (apoptoz, nekroz) bu kit kullanılarak BD FACS Aria III hücre akım sitometresiyle belirlenmiştir (Kars v.d., 2014). Deney prosedürü kısaca aşağıdaki gibidir:

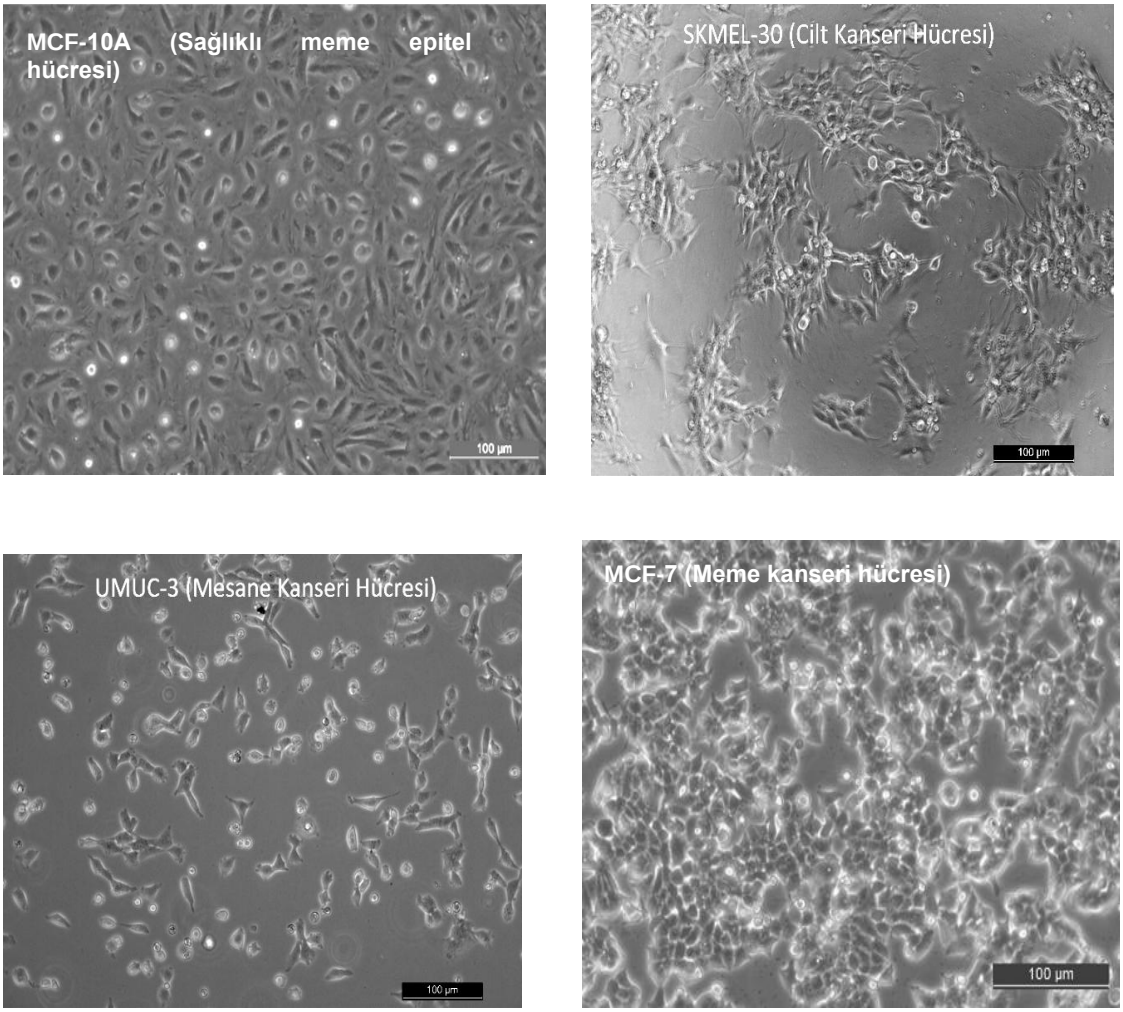
1. Hücrelere fotodinamik tedavi uygulanır.
2. Uygulamadan bir gün sonra 1mL'de 1×10^6 hücre elde edilir.
3. Hücreler 0,1 mL 1X Annexin V bağlanma tamponunda süspande edilir.
4. Hücrelerin üzerine 5 µl Annexin V ve 5 µl 7-AAD boyası eklenir. Daha sonra 400 µl 1X Annexin V bağlanma tamponu eklenir.
5. Hafifçe vortekslenip 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bağlama için bekletilir.
6. Hücre akım sitometrisinde boyanmamış hücreler kontrol olarak kullanılarak analiz yapılır.

Bu işlem sonunda Annexin V apoptotik hücre zarında açığa çıkan fosfotidil serine bağlanarak apoptoza giden hücreleri gösterirken, geç apoptoz veya nekroz sırasında oluşan kırık DNA'ları 7-AAD boyamaktadır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre hatları ve kültür ortamı

MCF-7, MCF-10A,, SKMEL-30 ve UMUC-3 hücreleri uygun vasatlarda kültüre edildi (Şekil 4). Çalışmalar için gerekli hücreler 37°C'de, %5'lik CO_2'de inkübatörde bekletilmiştir. Yapışkan hücreler hücre kültürü kabının %70'ini kapladığında tripsin-EDTA ile yeni kültür ortamına pasajlanmıştır. Çalışma sırasında, hücreler sıvı nitrogen içinde dondurularak saklanmıştır.



Şekil 4. Uygun besiyeri ortamlarında kültüre edilmiş MCF-7, MCF-10A, SKMEL-30 ve UMUC-3 hücrelerinin ters mikroskopla elde edilen görüntüleri.

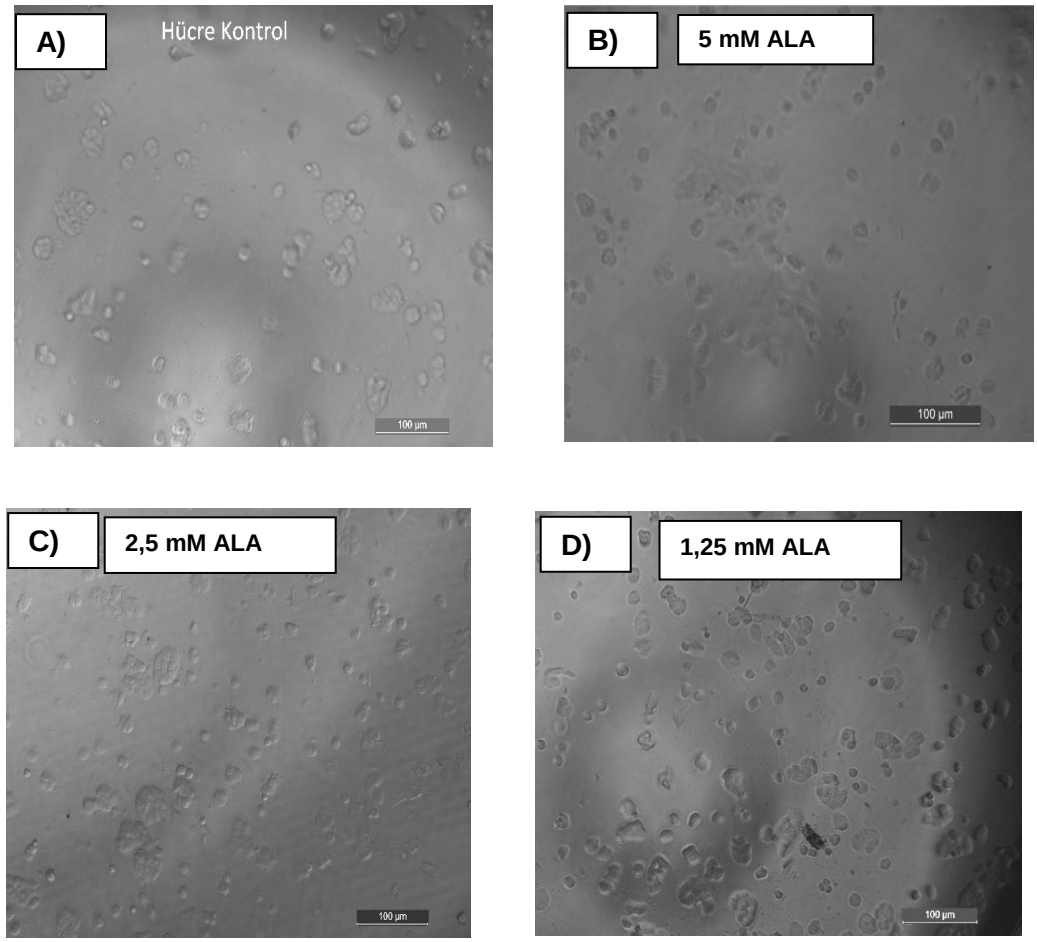
4.2. Hücrelerde ALA etkisinin değerlendirilmesi

Hücre proliferasyon hızının belirlenmesi, tümör biyolojisinin temel parametrelerinin anlaşılması için önemlidir. Bu, hücre proliferasyon testlerinin karşılaştırmalı olarak analizini gerektirmektedir. Mevcut hücre proliferasyon testleri Deoxyribonucleic acid (DNA) sentezi, metabolik aktivite, proliferasyon işaretçileri ve ATP içeriğinin ölçümüne dayalı testler olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılabilir.

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 2,3-Bis(2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT), MTS, WST1 gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. XTT ile proliferasyonanalizi yönteminin çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan (turuncu) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır (Terzioğlu v.d., 2013).

MCF-7,SKMEL-30, MCF-10A, UMUC-3 hücrelerinin her birine ALA uygulanmış ve hücreler için IC50 değeri belirlenememiştir. Çünkü hücreler üzerinde 5 mM konsantrasyona kadar ALA'nın toksik bir etkisi bulunmamıştır. ALA'nın 5 mM ile 0,019 mM konsantrasyonları arasında herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı için çalışmada ALA'nın konsantrasyonu 1 mM olarak seçilmiştir.

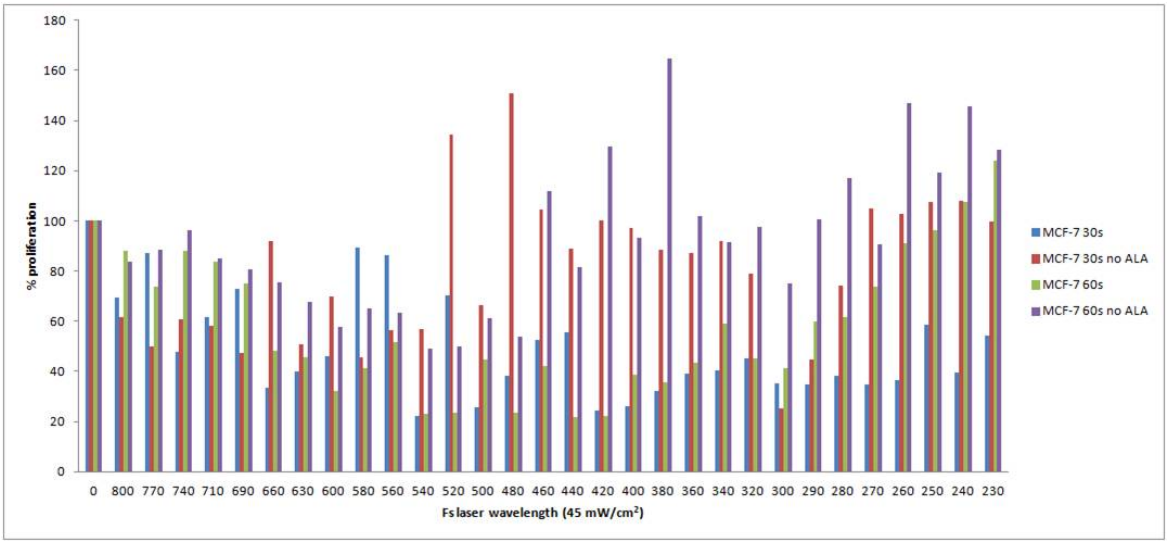
- **MCF-7 hücrelerinin 96 kuyulu plakada 24 saat süreyle farklı miktarlarda 5-ALA ile muamele edilmesi ardından mikroskop altında alınan görüntüler.**



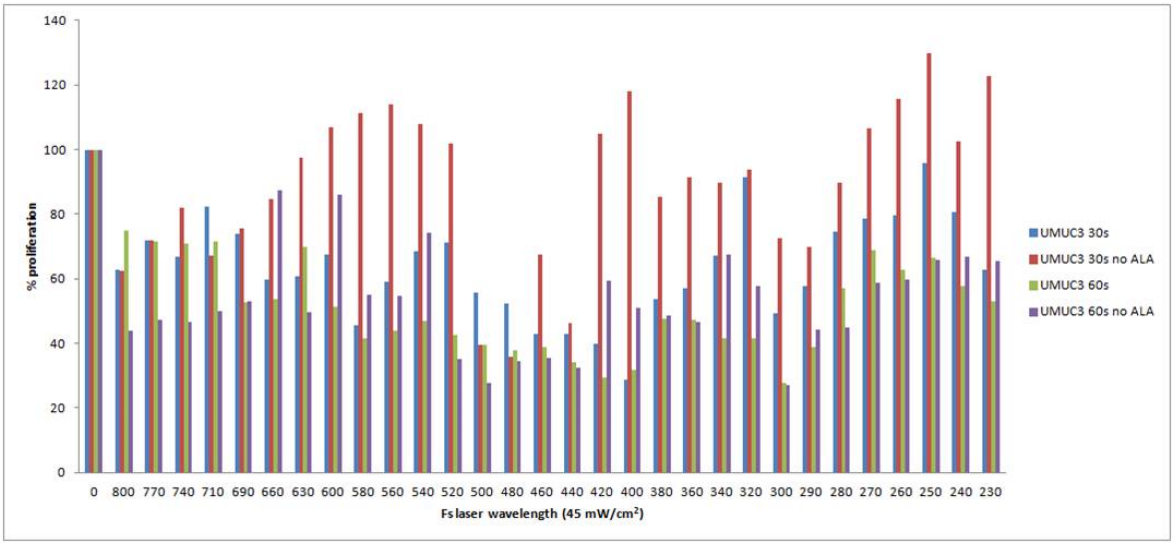
Şekil 5. MCF-7 hücrelerinin farklı ALA miktarlarıyla 24 saatlik inkübasyonundan sonraki görüntüleri. A) No-ALA control, B) 5mM ALA, C) 2,5 mM ALA, D) 1,25 mM ALA

4.3. Hücrelere ALA-FDT uygulanmasının etkileri

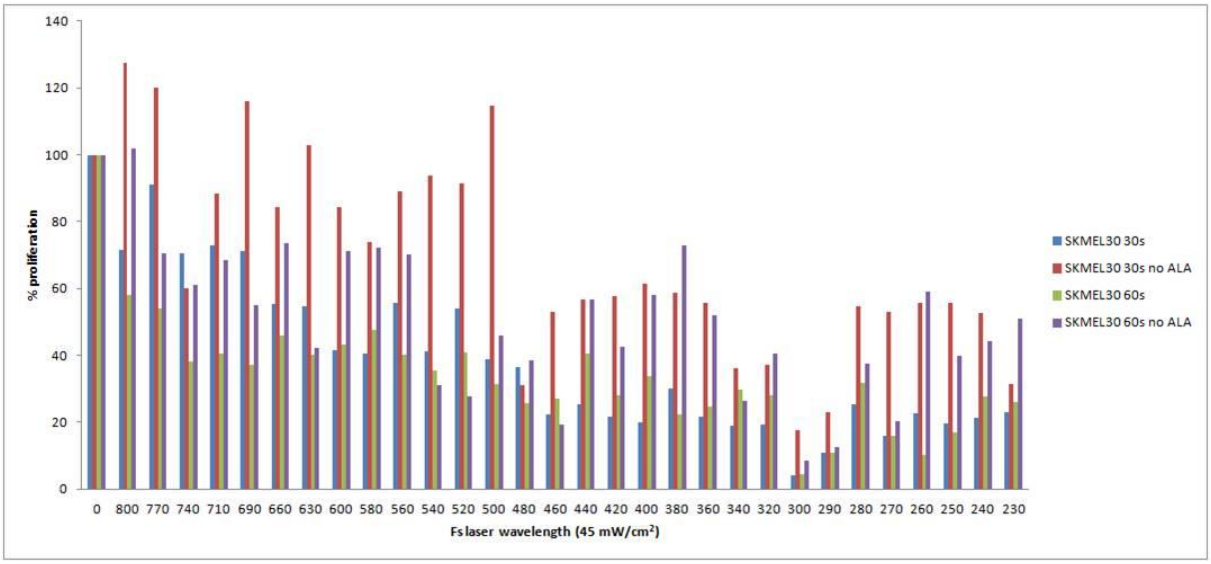
96 gözlü kültür kaplarına ekilen hücrelere her kuyucuğa eşit miktarda olacak şekilde toksik olmayan ALA dozu uygulanarak (1 mM), bir gece inkübe edilmiştir. Işık kaynağı ışık spektrumundan seçilen 30 dalga boyunda (800, 770, 740, 710, 690, 660, 630, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440, 420, 400, 380, 360, 340, 320, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230nm) femtosaniye lazer ışınıdır. 30 saniye ve 60 saniye olmak üzere farklı sürelerde lazere maruz kalan hücreler aynı kültür ortamında 24 saat inkübe edilmiş ardından XTT testi yapılmış ve hücre üreme yüzdeleri hesaplanarak Şekil 6,7 ve 8'de verilen grafiklerde sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 6. ALA uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi.



Şekil 7. ALA uygulanmış UMUC-3 mesane kanseri hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi.



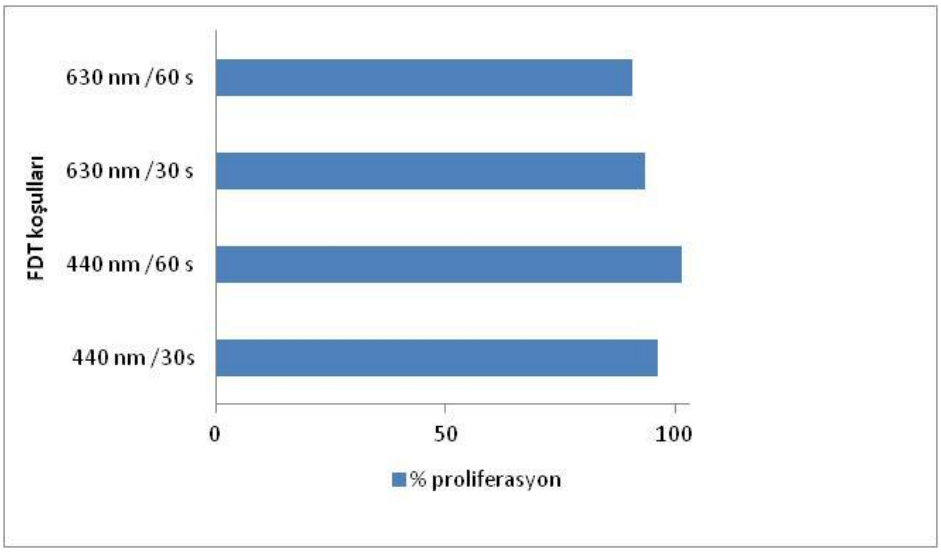
Şekil 8. ALA uygulanmış SKMEL-30 melanoma hücrelerinde 230 nm-800 nm arası dalga boylarında FDT etkisi.

FDT sonrası hücre canlılık testlerine göre, 45 mW/cm^2 380-420 nm ve 540-660 nm arası dalga boylarında femtosaniye lazer uygulaması 1mM 5-ALA'nın oluşturduğu protoporfirin IX aracılığıyla meme, mesane ve cilt kanserine model hücrelerde hücre üremesini yüksek oranda azalttığı saptanmıştır. FDT'nin daha agresif olan UMUC-3 ve SKMEL-30 hücrelerine göre MCF-7 hücrelerinde daha etki olduğu gösterilmiştir (Şekil 6).

ALA-fototerapi ile tedavi edilen hücrelerin canlılık oranları % 50-60'a kadar ve daha düşük olduğunda FDT dalga boyları etkili olarak değerlendirildi. Ek olarak, ikinci anahtar seçim kriteri ise kontrol (ALA olmayan) grubunun hücre canlılığını % 60'tan daha fazla sağlayan FDT dalga boyunun seçilmesiydi. Yani her iki kriteri taşıyan dalgaboylarından seçim yapıldı.
İleri evre mesane kanseri, metastatik melanom ve meme kanseri hücrelerinde yaşayabilirlik testleri, 400-440 nm ve 600-630 nm femtosaniye lazer ışınımı ile fs FDT'nin model hücre hatlarında hücre canlılığını azaltmak için in vitro terapötik protokolde etkili olduğunu gösterdi (Tablo 2-4). Elde edilen sonuçlara göre FDT, MCF-7 hücrelerinin canlılığını diğer daha agresif kanser hücresi modeline kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır. UV dalga boylarında lazer ışıması, ALA olmayan hücrelerin canlılığının azalmasına neden olmuştur. Bu nedenle, UV dalga boyları ALA-fototerapi protokolünde etkili görülmemektedir. UV dalga boylarında hücre ölümü sadece UV ışığının etkisinden kaynaklanıyor olabilir. MCF-7 hücrelerinin yaşayabilirliği, 440 nm fs lazer FDT 30 saniye ve 60 saniye uygulama sonrasında sırasıyla % 55 ve % 22'ye kadar düşmüştür. Hücre canlılığı, 630 nm dalga boyunda FDT sonrasında 30 sn ve 60 sn süreleri için hücre canlılık değerleri % 40 ve % 45 bulunmuştur. UMUC-3 hücrelerinde ise 420 nm fs lazer FDT 30 saniye ve 60 saniye uygulama sonrasında sırasıyla

% 40 ve% 50 canlılık gözlenmiştir (Şekil 7). SKMEL-30 hücrelerinde 400 nm FDT, kontrol hücresine kıyasla 30 ve 60 saniye uygulamalardan sonra % 40 ve %50 hücre canlılığı bulumuştur (Şekil 8). Seçilen dalga boyları Tablolarda (1-3) işaretlenmiştir. Hücre canlılığını engelleyen bu uygulamaların moleküler altyapıları çeşitli gen ifade ve protein analizleri yapılarak da araştırılmalıdır.

MCF-10A hücrelerinde 5-ALA FDT uygulamasında MCF-7 için en etkili olduğu saptanan FDT şartları 440 nm ve 630 nm olmak üzere 2 farklı dalga boyunda çalışılmıştır. Şekil 9'da 440 nm ve 630 nm dalgaboylarındaki lazer ile 30 ve 60 saniye ışıma yapıldıktan sonra hücre üremesinin % proliferasyon sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Normal meme epitelyum hücrelerinin üremesinin meme kanseri hücreleri için en etkili FDT şartlarında etkilenmediği belirlenmiştir.



Şekil 9. ALA uygulanmış MCF-10A hücrelerinde 440 nm ve 630 nm dalga boylarının 30 ve 60 saniye süre ile uygulanmasıyla oluşan FDT etkisi.

Sonuçlara göre normal meme epitel dokuya model MCF-10A hücrelerinde FDT'nin hücrelerin üremesine olumsuz yönde bir etkisi olmamıştır. Bu da göstermektedir ki 5-ALA ve Fs lazer kullanılarak uygulanan FDT normal hücreleri değil kanser hücrelerini hedefleyen bir tedavi olarak kullanabilir (Şekil 9). Kansere model hücrelerin uygulamalar sonrası canlılık yüzdeleri Tablo2, 3 ve 4'te verilmektedir.

Tablo 2. FDT sonrası UMUC-3 canlılık analizi.

	UMUC-3 canlılık (%)			
Uygulama Fs laser (nm), süre	**30s**	**30s, No-ALA**	**60s**	**60s- No-ALA**
No-light	100.0	100.0	100.0	100.0
230	62.84	122.6	52.92	65.41
240	80.50	102.4	57.74	66.71
250	95.78	129.8	66.52	65.81
260	79.69	115.7	62.63	59.63
270	78.48	106.6	68.85	58.64
280	74.53	89.83	56.95	45.00
290	57.76	69.84	38.91	44.35
300	49.19	72.39	27.77	27.13
320	91.28	93.64	41.52	57.84
340	67.20	89.83	41.53	67.33
360	56.89	91.44	47.43	46.49
380	53.67	85.47	47.54	48.50
400	28.79	118.15	31.77	50.91
420	39.98	104.75	29.59	59.44
440	42.79	46.19	34.29	32.39
460	42.77	67.40	38.80	35.39
480	52.49	35.86	37.79	34.37
500	55.81	39.40	39.56	27.87
520	71.14	101.85	42.55	35.26
540	68.36	108.05	47.02	74.32
560	59.19	113.83	43.89	54.84
580	45.60	111.39	41.45	54.90
600	67.56	106.83	51.30	86.13
630	60.88	97.60	69.93	96.73
660	59.60	84.60	53.63	87.30
690	73.80	75.41	52.61	52.86
710	82.25	67.24	71.43	49.92
740	66.85	82.05	70.81	46.77
770	71.93	71.92	71.66	47.45
800	62.74	62.29	74.83	44.08

Tablo 3. FDT sonrası SK-MEL30 canlılık analizi.

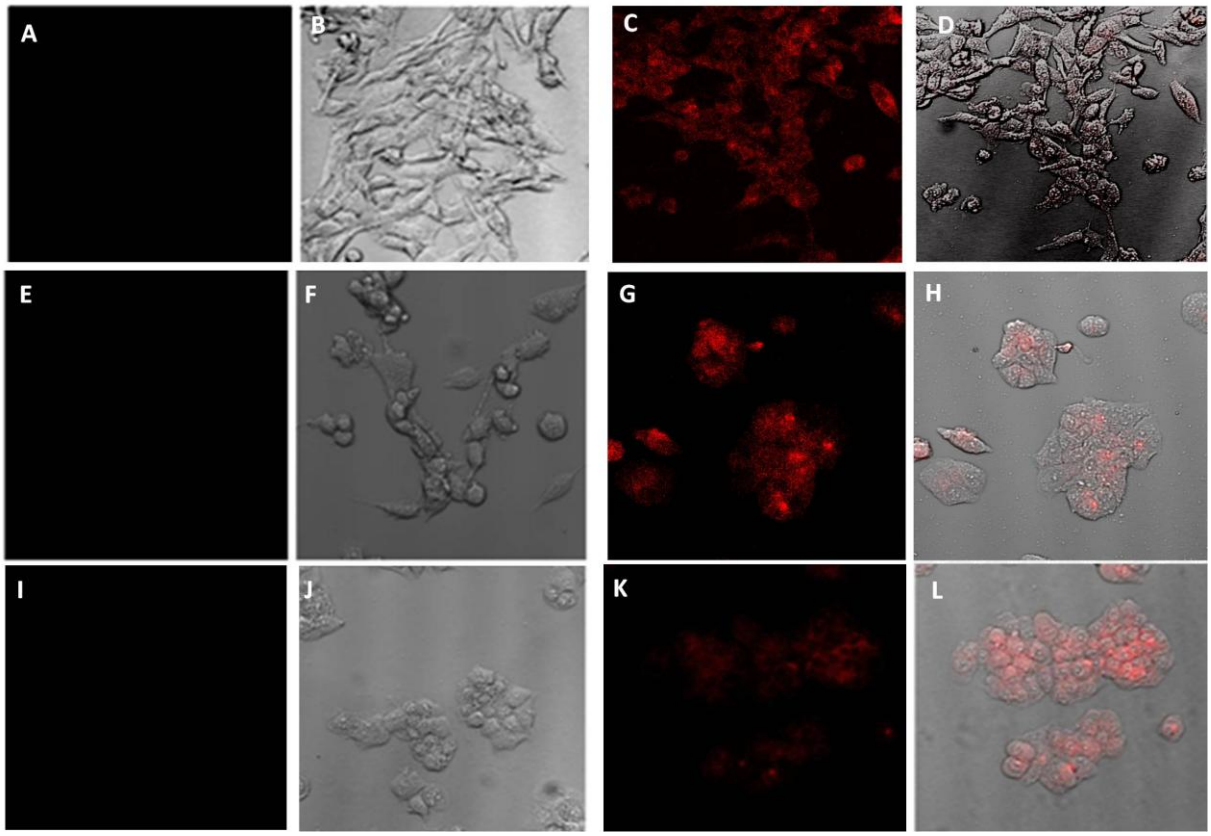
	SK-MEL30 canlılık (%)			
Uygulama Fs laser (nm), süre	**30s**	**30s, No-ALA**	**60s**	**60s- No-ALA**
No-light	100.0	100.0	100.0	100.0
230	23.08	31.54	26.00	50.97
240	21.30	52.69	27.61	44.19
250	19.82	55.70	16.98	39.92
260	22.57	55.54	10.19	59.05
270	15.88	53.11	15.95	20.40
280	25.28	54.54	31.75	37.41
290	10.73	22.98	10.95	12.70
300	4.20	17.55	4.37	8.69
320	19.21	37.08	27.99	40.43
340	19.02	36.09	29.66	26.53
360	21.76	55.62	24.80	52.10
380	29.97	58.77	22.50	72.78
400	19.86	61.51	33.88	68.23
420	21.75	57.76	28.06	42.57
440	25.21	56.66	40.37	56.74
460	22.46	53.11	27.19	19.24
480	36.57	31.20	25.71	38.42
500	38.79	114.6	31.37	45.96
520	54.10	91.32	40.73	27.71
540	41.33	93.73	35.52	30.94
560	55.55	88.93	40.09	70.04
580	40.48	73.98	47.54	72.29
600	41.57	84.44	43.20	71.26
630	54.74	102.7	40.09	42.29
660	55.30	84.34	45.99	73.64
690	71.12	116.1	37.15	54.92
710	72.82	88.29	40.69	68.54
740	70.54	59.93	38.31	61.01
770	91.03	119.9	53.91	70.51
800	71.63	127.4	58.12	101.7

Tablo 4. FDT sonrası MCF-7 canlılık analizi.

	MCF-7 canlılık (%)			
Uygulama Fs laser (nm), süre	**30s**	**30s, No-ALA**	**60s**	**60s- No-ALA**
No-light	100.0	100.0	100.0	100.0
230	54.17	99.89	124.1	128.2
240	39.72	107.9	107.7	145.7
250	58.80	107.3	96.51	119.0
260	36.67	102.9	91.01	146.8
270	34.92	104.8	73.90	90.48
280	38.28	74.19	61.52	117.1
290	34.66	44.57	59.75	100.7
300	35.06	25.07	41.30	74.97
320	45.02	79.00	45.10	97.66
340	40.41	92.08	59.00	91.36
360	39.06	87.03	43.59	101.7
380	32.29	88.67	35.63	164.5
400	26.18	97.09	38.78	93.13
420	24.54	100.4	22.42	129.5
440	55.47	98.78	21.76	81.68
460	52.63	104.3	41.95	111.8
480	38.19	150.9	23.72	54.03
500	25.86	66.60	44.96	61.34
520	70.26	134.3	23.51	50.05
540	22.19	56.79	23.03	49.23
560	86.21	56.44	51.65	63.53
580	89.41	45.66	41.08	64.91
600	46.18	69.77	32.27	57.97
630	40.01	90.61	45.62	87.62
660	33.65	91.78	48.40	75.43
690	72.89	47.40	75.16	80.75
710	61.76	58.22	83.84	84.93
740	47.94	60.67	88.10	96.12
770	87.34	49.80	73.73	88.71
800	69.59	61.70	88.26	83.71

4.4 ALA uygulanmış hürelerde floresans birikimin konfokal mikroskopta görüntülenmesi

Hücreler 5-ALA'ya maruz bırakıldıktan sonra yıkamalar yapılmış ve hücre içerisinde PpIX birikimi konfokal mikroskop analiziyle görüntülenmiştir. 5-ALA uygulanmamış hücrelerde floresans birikimi gözlenmemişken, Floresan özellik taşımayan 5-ALA uygulaması yapıldıktan sonra hücrelerde oluşan floresan PpIX birikimi gözlenmiştir (Şekil 10). Görüntülerden ve sonuçlardan de anlaşılacağı gibi 5-ALA'nın toksik olmayan miktarı hücrelere uygulanarak kanserin teşhisine yönelik çalışma yapılabilir.



Şekil 10. Hücrelerde PpIX floresan birikiminin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi (40X-oil, 512x512). A) UMUC-3 hücreleri ALAsız, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenememiştir; B) UMUC-3 hücreleri ALAsız, transmitted detector-TD ile white field alanda görüntülenmiştir, C) ALA uygulanmış UMUC-3 hücreleri, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir; D) ALA uygulanmış UMUC-3 hücreleri SD ve TD ile görüntülenmiştir; E) SKMEL-30 hücreleri ALAsız, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenememiştir; F) SKMEL-30 hücreleri ALAsız, transmitted detector-TD ile white field alanda görüntülenmiştir; G) ALA uygulanmış SKMEL-

30 hücreleri, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir; H) ALA uygulanmış SK-MEL30 hücreleri SD ve TD ile görüntülenmiştir; I) MCF-7 hücreleri ALAsız, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenememiştir; J) MCF-7 hücreleri ALAsız, transmitted detector-TD ile white field alanda görüntülenmiştir; K) ALA uygulanmış MCF-7 hücreleri, standard detector-SD ile konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir;; L) ALA uygulanmış MCF-7 hücreleri, SD ve TD ile görüntülenmiştir. (uyarma: 405 nm; emisyon: 614 nm; (40X-oil, 512x512)).

4.5. Fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri

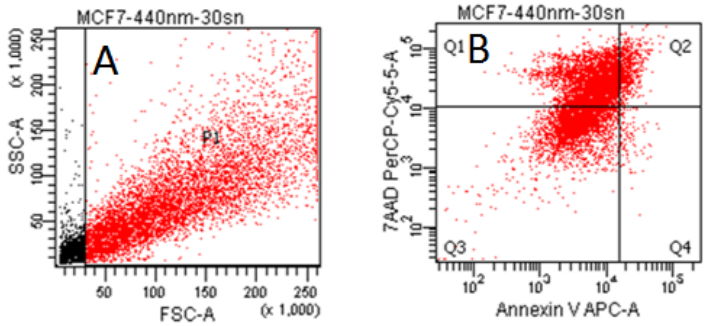
Temel olarak bir akım sitometri, süspansiyon içerisindeki boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği, DNA, protein, reseptör) bir floresans algılayıcı aracılığıyla okunmasıdır. Okunma sırasında yaklaşık olarak 10.000 adet hücre elemanı (protein, DNA v.b.) floresans ışıma yaparak okunur ve hücrelere ait floresans yoğunluğu grafiğe dökülür.

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak 7-AAD veya propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V FITC (yeşil floreans) ve non-vital boya olan 7-AAD (kırmızı floresans) ile aynı zamanda boyanan hücreler nekrotik veya geç apoptotik hücreler olarak değerlendirilir. Canlı hücreler FITC-/7AAD-, erken apoptotik hücreler ise FITC+/7-AAD- (Güleş v.d., 2008) sonuç verirler.

4.5.1. MCF-7 hücresi için fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri

MCF-7 için daha önceki aşamalarda en etkili bulunan iki farklı dalga boyu (440-630 nm) ve 2 ayrı sürede (30-60 s) FDT etkisini belirlemek için yapılan analiz sonuçları Şekil 11, 12, 13 ve 14'da gösterilmektedir. Şekil 11 üzerinde verilen A grafiğinde; granülarite (SSC-A) ve boyut (FSC-A) analizi yapılmıştır. Siyah renkli olarak gösterilen kısım hücre debrisidir ve sağa

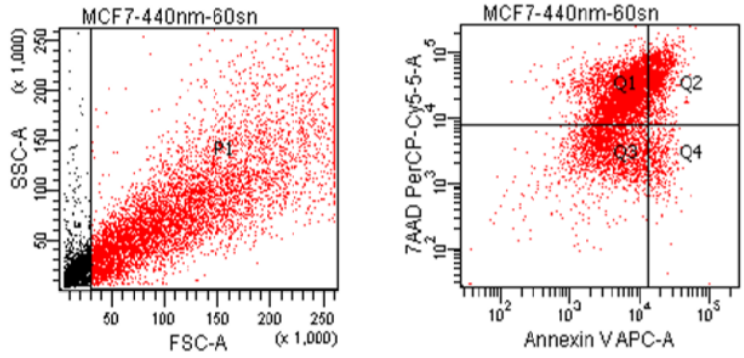
doğru gittikçe hücre boyutu büyür. B grafiğinde ise Q3 kısmında canlı hücreler, Q4 de erken apoptotik hücreler, Q2 de ise geç apoptotik hücreler vardır yani hem Annexin-V hem de 7-AAD ile boyanmış olan hücreler Q2 kadranında bulunmaktadır.



Tube: 440nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	7,701	77.0	77.0
Q1	3,698	48.0	37.0
Q2	804	10.4	8.0
Q3	3,071	39.9	30.7
Q4	128	1.7	1.3

Şekil 11. MCF-7 hücrelerinin 440 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

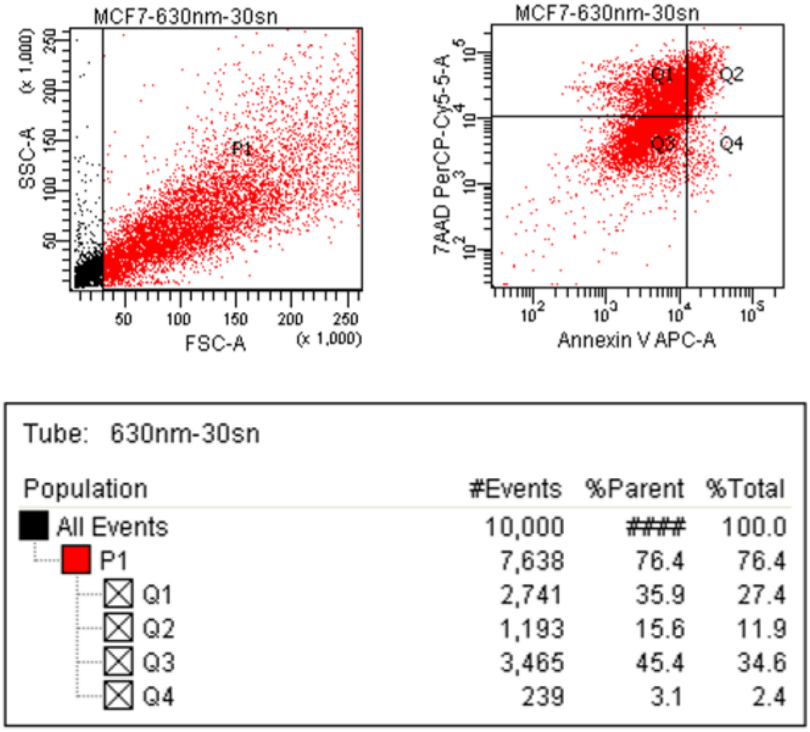


Tube: 440nm-60sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,977	69.8	69.8
Q1	3,440	49.3	34.4
Q2	1,204	17.3	12.0
Q3	1,924	27.6	19.2
Q4	409	5.9	4.1

Şekil 12. MCF-7 hücrelerinin 440 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

MCF-7 hücrelerinde 440nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 440 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s uygulamada %8 iken 60s uygulamada %12 olarak bulunmuştur.

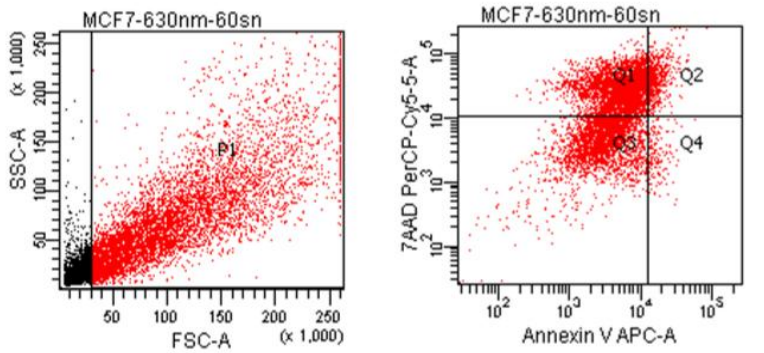


Tube: 630nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	7,638	76.4	76.4
Q1	2,741	35.9	27.4
Q2	1,193	15.6	11.9
Q3	3,465	45.4	34.6
Q4	239	3.1	2.4

Şekil 13. MCF-7 hücrelerinin 630 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

MCF-7 hücrelerinde 630 nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 630 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s uygulamada %12 iken 60s uygulamada %7,4 olarak bulunmuştur.



Tube: 630nm-60sn

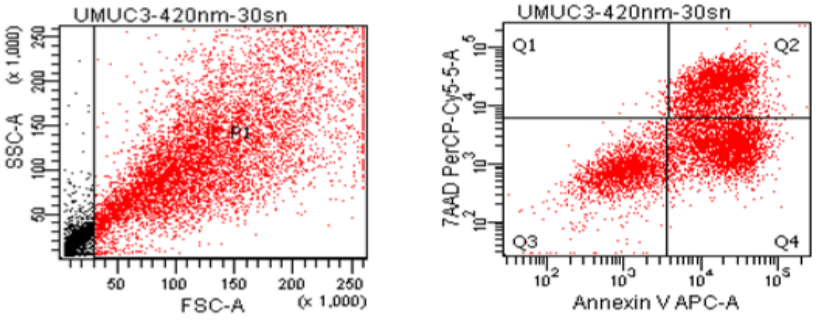
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,944	69.4	69.4
Q1	3,108	44.8	31.1
Q2	740	10.7	7.4
Q3	2,893	41.7	28.9
Q4	203	2.9	2.0

Şekil 14. MCF-7 hücrelerinin 630 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

4.5.2. UMUC-3 Hücresi İçin fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri

UMUC-3 için iki farklı dalga boyu (420-630 nm) ve 2 ayrı süre (30-60 s) için yapılan analizlerin sonuçları Şekil 15-18 de gösterilmektedir. Q4'te erken apoptotik hücreler, Q2'de ise geç apoptotik hücreler vardır yani hem Annexin-V hem de 7-AAD ile boyanmış olan hücreler Q2 kadranında bulunmaktadır.

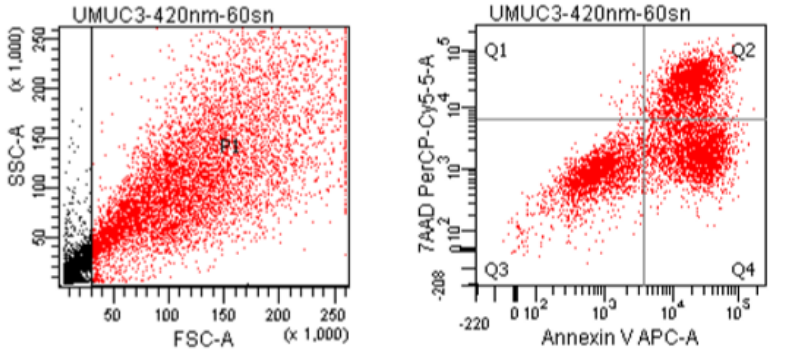
UMUC-3 hücrelerinde 420 nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 420 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s uygulamada %26 iken 60s uygulamada %22 olarak bulunmuştur. UMUC-3 hücre popülasyonu içerisinde yine azımsanmayacak sayıda apoptotik hücreler mevcuttur (Q4). 30s uygulamada apoptotik hücre popülasyonu %34 iken 60s uygulamada %28 olarak bulunmuştur.



Tube: 420nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,165	81.6	81.6
Q1	27	0.3	0.3
Q2	2,625	32.1	26.2
Q3	2,156	26.4	21.6
Q4	3,357	41.1	33.6

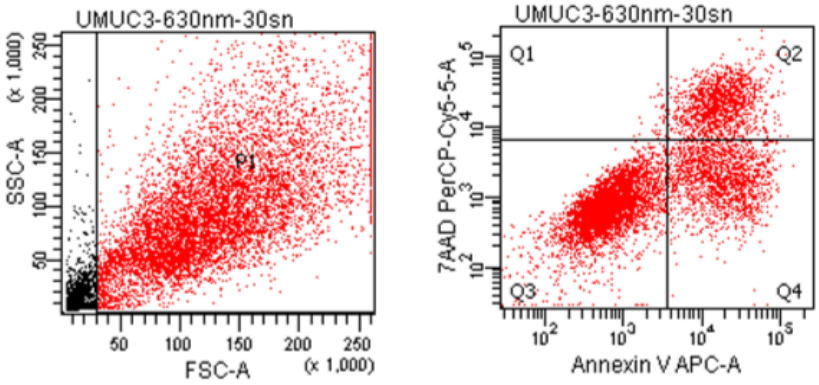
Şekil 15. UMUC-3 hücrelerinin 420 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri



Tube: 420nm-60sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	7,442	74.4	74.4
Q1	33	0.4	0.3
Q2	2,244	30.2	22.4
Q3	2,347	31.5	23.5
Q4	2,818	37.9	28.2

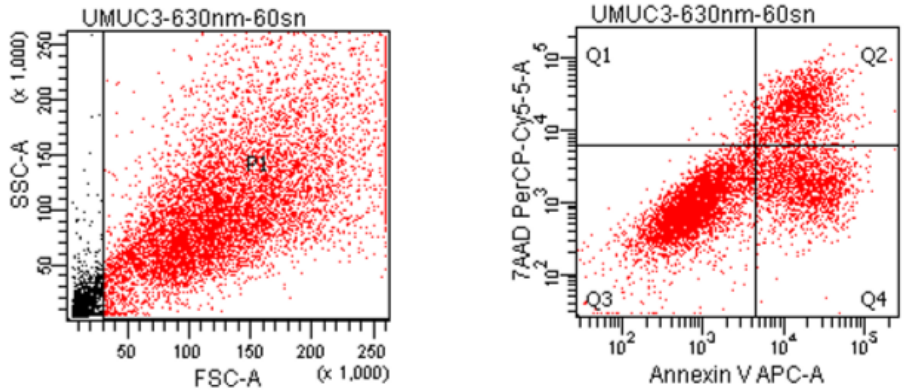
Şekil 16. UMUC-3 hücrelerinin 420 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri



Tube: 630nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,103	81.0	81.0
Q1	34	0.4	0.3
Q2	1,428	17.6	14.3
Q3	4,931	60.9	49.3
Q4	1,710	21.1	17.1

Şekil 17. UMUC-3 hücrelerinin 630 nm 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri



Tube: 630nm-60sn

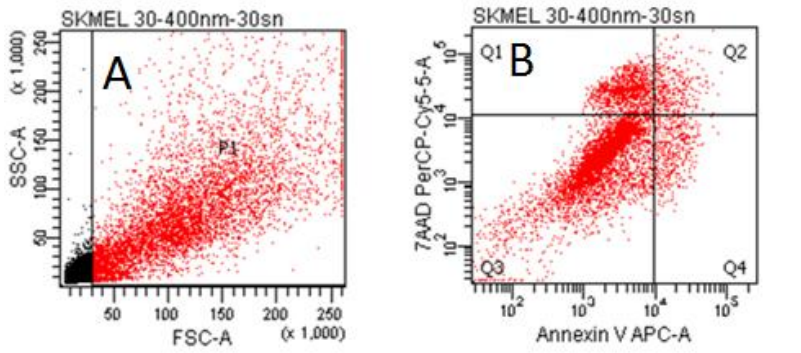
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,187	81.9	81.9
Q1	71	0.9	0.7
Q2	1,427	17.4	14.3
Q3	4,845	59.2	48.4
Q4	1,844	22.5	18.4

Şekil 18. UMUC-3 hücrelerinin 630 nm 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

UMUC-3 hücrelerinde 420 nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 630 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s ve 60s uygulamada %14 olarak bulunmuştur. Bu uygulama sonunda UMUC-3 hücre popülasyonu içerisinde yine azımsanmayacak sayıda apoptotik hücreler mevcuttur (Q4). 30s uygulamada apoptotik hücre popülasyonu %17 iken 60s uygulamada %18 olarak bulunmuştur.

4.5.3. SKMEL-30 Hücresi için fotodinamik tedavi sonrası apoptoz, nekroz analizleri

SKMEL-30 için iki farklı dalga boyu (400-600 nm) ve 2 ayrı süre (30-60 s) için yapılan analizler sonucunda Şekil 19-22'de gösterilmektedir.



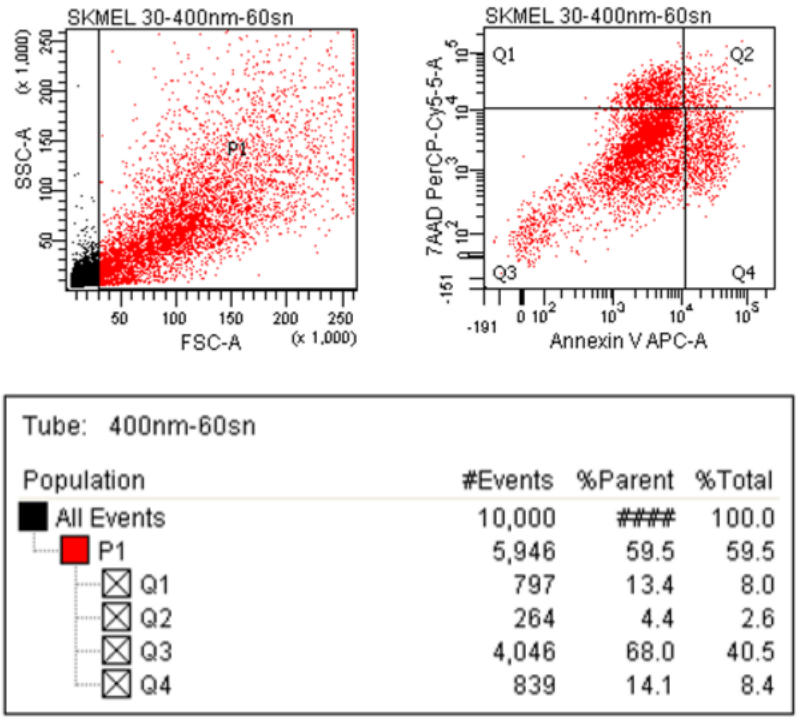
Tube: 400nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,244	62.4	62.4
Q1	971	15.6	9.7
Q2	357	5.7	3.6
Q3	4,442	71.1	44.4
Q4	474	7.6	4.7

Şekil 19. SKMEL-30 hücrelerinin 400 nm, 30s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

SKMEL-30 hücrelerinde 400 nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 400 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s uygulamada %4 iken 60s uygulamada %3 olarak bulunmuştur. SKMEL-30 hücre popülasyonu içerisinde apoptotik hücreler de mevcuttur (Q4). 30s uygulamada apoptotik hücre popülasyonu %5 iken 60s uygulamada %8 olarak bulunmuştur. Flow sitometri analiz sonuçlarına baktığımızda popülasyonun %40 kadarının parçalanmış hücreler olması nedeniyle analize dahil edilmediği gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlar P1 yani toplam sayılan hücre popülasyonun %60'ı

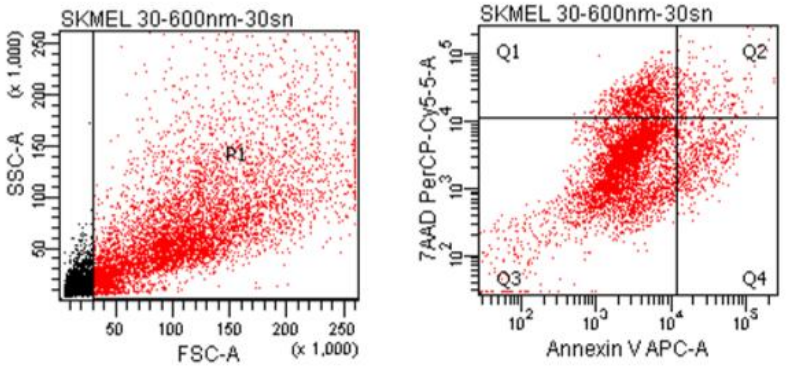
üzerinden verilmektedir. Analize başlamadan önce de popülasyonda yaklaşık %40 civarı morfolojisi düzgün olmayan ya da parçalanmış hücre olduğu düşünülebilir.



Tube: 400nm-60sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	5,946	59.5	59.5
Q1	797	13.4	8.0
Q2	264	4.4	2.6
Q3	4,046	68.0	40.5
Q4	839	14.1	8.4

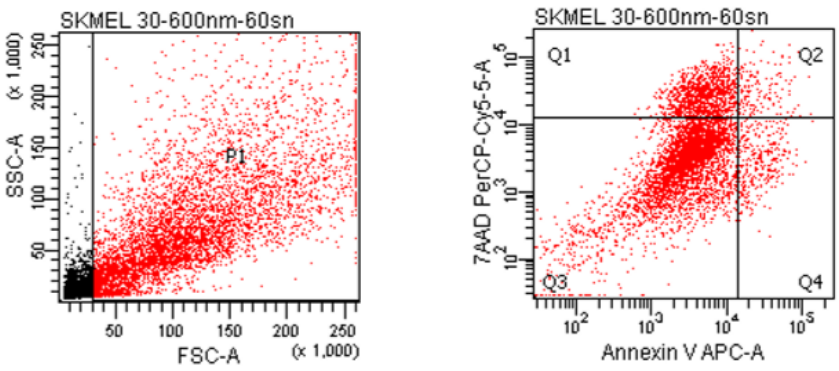
Şekil 20. SKMEL-30 hücrelerinin 400 nm, 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri



Tube: 600nm-30sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,104	61.0	61.0
Q1	853	14.0	8.5
Q2	240	3.9	2.4
Q3	4,460	73.1	44.6
Q4	551	9.0	5.5

Şekil 21. SKMEL-30 hücrelerinin 600 nm, 30 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri



Tube: 600nm-60sn

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	5,995	60.0	60.0
Q1	1,128	18.8	11.3
Q2	175	2.9	1.8
Q3	4,341	72.4	43.4
Q4	351	5.9	3.5

Şekil 22. SKMEL-30 hücrelerinin 600 nm, 60 s FDT sonrası apoptoz ve nekroz analizleri

SKMEL-30 hücrelerinde 600 nm FDT etkisinin sonuçlarını incelendiğinde 600 nm'de nekroz veya geç apoptoz yoluyla ölen hücre popülasyonun 30s uygulamada %2 iken 60s uygulamada %11 olarak bulunmuştur. SKMEL-30 hücre popülasyonu içerisinde apoptotik hücreler de mevcuttur (Q4). 30s uygulamada apoptotik hücre popülasyonu %6 iken 60s uygulamada %4 olarak bulunmuştur. Flow sitometri analiz sonuçlarına baktığımızda popülasyonun %40 kadarının parçalanmış hücreler olması nedeniyle analize dahil edilmediği gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlar P1 yani toplam sayılan hücre popülasyonun %60'ı üzerinden verilmektedir. Analize başlamadan önce de popülasyonda yaklaşık %40 civarı morfolojisi düzgün olmayan ya da parçalanmış hücre olduğunu düşünülebilir.

Apoptoz ve/veya nekroz yolu ile hücre ölümü analizi sonuçları incelendiğinde, FDT'nin etkisini en iyi UMUC-3 hücrelerinin analiz sonuçlarında görülmektedir. Projede kulanılan kansere model hücrelerin FDT sonrası ölüm mekanizması apoptoz veya nekroz yoluyla olduğu gibi bir başka ölüm mekanizması da (örneğin otofaji) devreye girmiş olabilir. FDT sonrası otofaji yoluyla ölüm mekanizmaları da araştırılmalıdır. Ayrıca flow sitometri analiz

grafiklerinden de anlaşıldığı üzere analize başlamadan önce popülasyonlarda %20-%40 arası morfolojik deformasyon olmuş ve bu hücreler analize dahil edilmemiştir. Her hücre grubunda bulunmakta olan bu popülasyon grubundaki hücreler analize başlamadan önce ölmüş olan hücreler olabilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Projede farklı kanser tiplerine model hücrelerde 5-ALA ve femtosaniye lazer kullanılarak in-vitro fotodinamik tedavinin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Femtosaniye lazer pulslar halinde lazer verdiği için sadece ışın gönderilen bölgeye etki edip ısınmaya neden olmamaktadır. Bu ultra kısa lazer atışları sayesinde kullanılan lazer enerjisi azalır böylece çevre dokularda oluşan termal ve mekanik hasar minimum düzeye iner. Femosaniye pulslu lazer sistemleriyle uygulanan fotodinamik tedavi protokolleri henüz tıbbi uygulamada kullanılmamaktadır. Çalışmada özellikle klinik kullanıma aktarılmasındaki uygulanabilirlik açısından mesane kanseri hücrelerinden elde edilen ümit vaad edici sonuçları dikkate değerdir.

Bogoeva v.d. (2016) mesane kanseri hücrelerinde 10 dakika boyunca sürekli mavi ışık lazeri ile rutenyum porfirin aracılı FDT uyguladılar. Hücre popülasyonunun yüksek bir yüzdesinin nekroz yoluyla öldüğü sonucuna vardılar. Aynı zamanda da etkinin ışık kaynağı veya foto-aktivasyondan kaynaklanmadığını, ancak asıl etkinin yalnızca fotosensitizan rutenyum porfirinin toksisitesinden kaynaklandığını bildirdiler. Bizim çalışmamızda, kısa fs lazer sürelerinin (30s, 60s) uygulanmasıyla umut verici sonuçlar bulunmuştur. 5-ALA aracılı, fs laser FDT, mesane kanseri ve meme kanseri için hedefe yönelik erken yanıtlı terapi yöntemi olarak önerilebilir. Qiao ve arkadaşları (2016) baş-boyun kanseri hücre serilerinde 635 nm sürekli lazer ışınlarıyla 125-500 saniye arası sürelerde 5-ALA uygulanarak FDT yapmışlar ve apoptozun indüklenmesi ve JAK/STAT yolağındaki değişimlerin Bcl2 (antiapoptotik) ve Bax (apoptotik) genlerinin ifadelerinde değişime neden olduğunu bulmuşlardır. Bu durum da hücre ölümüne neden olmuştur. Fotosentizan maddenin sürekli veya pulslu herhangi bir ışık kaynağı tarafından aktifleştirildiği bilinmektedir; reaktif oksijen radikalleri oksijen varlığında gelişir. Öte yandan, ışınlama süresinin kısa olması, ışığın enerjisinin kanser hücresi ölümüne neden olmada etkili olması ve koşulların komşu sağlıklı hücreler için güvenli olması tercih edilen parametelerdir. Bu çalışmada, farklı kanser kaynaklarından gelen hücrelerin fs-FDT'den sonra apoptoz ve / veya nekroz yoluyla öldükleri gösterilmiştir. FDT direnci, moleküler mekanizmalar, ilgili proteinler ve genler gelecek çalışmalarda ayrıntılı olarak araştırılmalıdır. Heme biyosentez enzimlerinin değişmiş aktivitelerinin, mitokondri elementlerinin fonksiyonlarının ve membran taşıyıcıların aktivitelerinin farklı kanser tiplerinde farklı olabileceği Yang v.d. tarafından gösterilmiştir (2015). ALA aracılı kanser tanısı, moleküler modülasyonlarla iyileştirilebilir. Barcessat v.d. oral lezyonları tedavi etmek için 660 nm dalga boyunda ve 40 mW güçte diyot lazerli ALA aracılı FDT test ettiler (2013). İki seans ALA aracılı 40 mW güç ile FDT'nin, lezyonun total klinik remisyonu için yeterli olmadığını

bulmuşlardır. Toplam iyileşmeyi güvence altına almak için daha fazla FDT seansı uygulanması gerektiğini iddia etmişlerdir. Literatüre göre, pulslu ışık potansiyel avantajlar sunar, çünkü pulslu lazerler hedef dokuda ve komşu dokuda düşük ısıtma sağlayabilir. Bazen, meme kanseri tümörlerinde olduğu gibi, daha derin dokulara ışık vermek tercih edilebilir. Böyle durumlarda yüksek enerjili, pulslu fs lazer avantaj sağlayabilir (Hashmi v.d., 2010). Bu çalışmada ışık kaynağı olarak femtosaniye lazer kullanılmıştır, ancak fs lazerin FDT'de genel olarak kullanılan diğer ışık kaynaklarının etkilerini analiz etmek için herhangi bir karşılaştırmalı çalışma yapılmamıştır.

5-ALA'nın toksik olmayan miktarlarının kanser hücreleri içerisinde floresan molekül birikiminin gözlenebilmesi ile diyagnoza yönelik uygulamalara yön verebilecek sonuçlar da ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak hücre canlılık testi ve apoptoz/nekroz analizleri sonuçlarına göre, 400-440 nm ve 600-630 nm Fs laser dalgaboyu ışıması ile yapılan 5-ALA-FDT'nin farklı kanser hücrelerine model hücrelerin üremelerinin engellenmesinde en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. 5-ALA'nın prekürsor olarak kullanılmasının hücre içerisinde floresan PpIX birikimine neden olduğu da konfokal mikroskop analiziyle görüntülenmiştir. 5-ALA ve Fs lazer ile yapılan fotodinamik tedavinin farklı kanser dokularına model hücrelerin proliferasyonunu azalttığı ve 5-ALA'nın kanser hücrelerinde PPIX'u artırıp floresan birikime neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle 5-ALA FDT ve görüntülemede aynı anda kullanılabilecek etkili bir teranostik etkendir. Bu çalışmayla lazer dalga boyunun FDT'nin etkisini belirleyen önemli bir parametre olduğu da belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

Barcessat, A.R., Huang, I., Rosin, F.P., dos Santos Pinto, D. Jr., Maria Zezell, D., Correa, L. 2013. “Effect of topical 5-ALA mediated photodynamic therapy on proliferation index of keratinocytes in 4-NQO-induced potentially malignant oral lesions”, J Photochem Photobiol B, 126, 33-41.

Bark, K. 2010. ‘Physicochemical Properties of Protoporphyrin IX by Metal Ions in Acetonitrile-Water Mixture Solution’, Bull. Korean Chem. Soc, 31, 1633-7.

Baumgartner, R., Huber, R., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., Leberig, A. and Roth, C. 1996. ‘Inhalation of 5-aminolevulinic Acid: A New Technique For Fluorescence Detection of Early Stage Lung Cancer’, J Photochem Photobiol B, 36, 167–74.

Beale, S.I. 2006. Biosynthesis of 5-Aminolevulinic Acid, Chlorophylls and Bacteriochlorophylls”, Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, Springer, The Netherlands, 147–58.

Birol, A., Kundakçı, N. 2000. “Fotodinamik Tedavi”, Türkiye Klinikleri Dermatol, 10, 222-8.

Bogoeva, V., Siksjø, M., Sæterbø, K.G., Melo, T.B., Bjorkoy, A., Lindgren, M., Gederaas, O.A. 2016. “Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells.” Photodiagnosis Photodyn Ther. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.012.

Brown, S.B., Mellish, K.J. 2001. “Verteporfin: A Milestone in Opthalmology and Photodynamic Therapy”, Expert Opin Pharmacother, 2, 351-61.

Calzavara, P.G. 1999. “Photodynamic therapy: The present and the future”, J Eur Acad Dermatol Venereol, 2 (Suppl 2):71.

Casas, A., Fukuda, H., Di Venosa, G., Batlle, A., 2001. “Photosensitization and Mechanism of Cytotoxicity Induced by the Use of ALA Derivatives in Photodynamic Therapy”, Br J Cancer, 85, 279-84.

Daziano, J.P., Humeau, L., Henry, M., Mannoni, P., Chanon, M., Chabannon, C., Julliard, M.1998. “Preferential Photoinactivation of Leukemia Cells by Aluminum Phthalocyanine”, J Photochem Photobiol B, 43, 128-35.

Denzinger, S., Burger, M. 2008. “Photodynamic diagnostics of bladder tumors”, Curr Urol Rep. 9(2),101-5.

Dilkes, M.G., DeJode, M.L., Rowntree-Taylor, A., McGilligan, J.A., Kenyon, G.S., McKelvie, P. 1996. “M-THPS photodynamic therapy for head and neck cancer”, Lasers Med Sci, 11, 23-9.

Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q. 1998. “Photodynamic Therapy”, J Natl Cancer Inst, 90, 889-905.

Fukuda, H., Casas, A., Chueke, F., Paredes, S. and Batlle, A. 1993. “Photodynamic Action of Endogenously Syntesized Porphyrins From Aminolevulinic Acid, Using a New Model For Assaying the Effectiveness of Tumoral Cell Killing”, Int J Biochem, 25, 1395–98.

Gibson, S.L., Nguyen, M.L., Havens, J.J., Barbarin, A., Hilf, R. 1999. “Relationship of δ-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Levels to Mitochondrial Content in Neoplastic Cells in vitro”, Biochem Biophy Res Commu, 265, 315–21.

Gold, M.H., Goldman, M.P. 2004. “5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: Where we have been and where we are going”, Dermatol surg, 30, 1077-83.

Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008. “Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-8.

Hashmi, J.T., Huang, Y.Y., Sharma, S.K., Kurup, D.B., De Taboada, L., Carroll, J.D., Hamblin, M.R. 2010. “Effect of pulsing in low-level light therapy.” Lasers Surg Med, 42,450-66.

Hönigsmann, H., Szeimies, R.M., Knobler, R. 2008. “Photochemotherapy and Photodynamic Therapy”, Fitzpatrick’s Dermatology in General Medicine. Ed. Wolf K, Goldsmith L, Gilchrest B, Paller A, Leffell D. 7. Baskı. New York: Mc Graw Hill, 2249-62.

Jeffes, E.W., McCullough, J.L., Weinstein, G.D., Fergin, P.E., Nelson, J.S. 1997. “Photodynamic therapy of actinic keratosis with topical 5-aminolevulinic acid.”, Arch Dermatol, 133, 727-32.

Kars, G., Kars, M.D., Aplarslan, Ü. 2013. “Biyorafineri Anlayışı ile Melasdan 5-Aminolevülinik Asit (5-ALA) ve Biyohidrojen Üretimi”, Proje No: 111T523.

Kars, M.D., Kara, R., Gündoğdu, Y., Kepçeoğlu, A., Kılıç, HŞ. 2014. "Femtosecond laser induced photodynamic therapy on 5-ALA treated SKMEL-30 cells: an efficient theranostic strategy to combat melanoma", Biomed and Pharmacother, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.04.001, 68, 657–62.

Kennedy, J., Pottier, R. and Pross, G. 1990. "Photodynamic Therapy With Endogenous Protoporphyrin IX: Basic Principles and Present Clinical Experience", J Photochem Photobiol, 6, 143–8.

Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuechel, R., Stepp, H., Hofstädter, F., Hofstetter, A. 1996. "Detection of Early Bladder Cancer by 5-aminolevulinic Acid Induced Porphyrin Fluorescence"., J Urology, 155, 105–10.

Linuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B. 1994. "A Mechanistic Study of Cellular Photodestruction with 5-Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrin", Br J Cancer, 79, 21-8.

Lui, H. and Anderson, R. 1992. " Photodynamic Therapy For the Treatment of Basal Cell Carcinoma, Arch Dermatol", 128, 1597–601.

Lydaki, E., Dimitriou, H., Papazoglou, T., Liu, W.Q., Kalmanti, M. 1997. "Merocyanine 540 Mediated Photolysis of Normal Bone Marrow, Committed Hemopoietic Progenitors and Neoplastic Cells. Implications For Bone Marrow Purging", Leuk Res., 21, 641-50.

Malik, Z., Lugaci, H.1987. "Destruction of Erythroleukaemic Cells by Photoactivation of Endogenous Porphyrins", Br J Cancer, 56, 589-95.

Qiao, L., Mei, Z., Yang, Z., Li, X., Cai, H., Liu, W. 2016. "ALA-PDT inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCC cells through STAT3 Signal Pathway", Photodiagnosis Photodyn Ther, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.008.

Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Tanaka, T. 2002. " Biosynthesis, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic Acid", Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 23–9.

Stummer, W., Stocker, S., Wagner, S., Stepp, H., Fritsch, C., Goetz, C., Goetz, A., Kiefmann, R. and Reulen, H. 1998. "Intraoperative Detection of Malignant Glioma By 5-ALA-Induced Porphyrin Fluorescence", Neurosurgery, 42, 518–25.

Szeimies, R.M., Calzavara-Pinton, P.G., Karrer, S., Ortel, B. 1996. "Topical Photodynamic Therapy In Dermatology", J Photochem Photobiol B, 36, 213-9.

Tangprasittipap, A., Prasertsan, P., Choorit, W., Sasaki, K. 2007. "Biosynthesis of Intracellular 5-Aminolevulinic Acid by a Newly Identified Halotolerant *Rhodobacter sphaeroides*", Biotechnology Letters, 29, 773–8.

Tope, W.D., Shaffer, J.J. 2003. "Photodynamic Therapy", Dermatology. Ed. Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. 2. Baskı. Philadelphia: Elsevier, 2127-41.

Varma, S., Wilson, H., Kurwa, H.A., Gambles, B., Charman, C., Pearse, A.D. 2001. "Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent light source", Br J Dermatol., 144(3), 567-74.

Wang, J.B., Liu, L.X. 2007. "Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach, bile duct, pancreas, colon and rectum", Hepatogastroenterology, 54, 718-24.

Wyss, P., Fehr, M., van den bergh H. and Haller, U. 1998. "Feasibility of Photodynamic Endometrial Ablation Without Anesthesia", Int J Gynec Obstet, 60, 287–8.

Yang, X., Palasuberniam, P., Kraus, D., Chen, B. 2015. "Aminolevulinic Acid-Based Tumor Detection and Therapy: Molecular Mechanisms and Strategies for Enhancement." Int J Mol Sci, 16, 25865-80.

Zelickson, B.D., Goldman, M.P. 2005. "Mechanism of action topical aminolevulinic acid", Photodynamic therapy, Philadelphia; Elsevier Saunders, 1, 1-11.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. MELTEM DEMİREL KARS
Proje No:	115Z002
Proje Başlığı:	5-Ala Uygulamış Farklı Kanser Dokularına Model Hücrelerde Femtosaniye Lazer ile Fotodinamik Tedavinin Teranostik Etkilerinin Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	HAMDİ ŞÜKÜR KILIÇ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	SELÇUK Ü. İLERİ TEKNOLOJİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/05/2015 - 15/11/2017
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29672.0
Öz:	5-Aminolevulinik asit (5-ALA, ALA) canlılarda porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde prekürsör madde olarak kullanılan bir moleküldür. Normal Heme metabolizmasında ALA hücre içinde floresan özellikteki bir madde olan protoporfirin IX?a (PpIX) dönüşmektedir. PpIX ışık altında serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin hücre içinde birikmesi hücre üzerine sitotoksik bir etki meydana getirmektedir. Fotodiinamik tedavi (FDT) fotosentizan maddenin uygulanması ve tedavi edilecek bölgenin lazer kaynağı ile ışınlanması temeline dayanan bir fotokemoterapidir. Bu projede MCF-7 (meme kanseri), SKMEL-30 (metastaik melanoma), UMUC3 (ileri evre mesane kanseri), MCF-10A (normal meme dokusu) hücre hatlarına uygulanan fotodinamik tedavide prekürsor olarak ALA kullanılmıştır. Söz konusu hücrelere ilk etapta ALA ve daha sonrasında femtosaniye lazer ile UV bölgesinden başlayıp NIR (Near Infra Red) bölgesine kadar farklı dalga boylarında (230 nm-800 nm), 30 saniye ve 60 saniye femtosaniye lazer uygulanarak SKMEL-30, MCF-7, UMUC3, MCF-10A hücrelerinin üremelerine etkisi araştırılmıştır. Bu yöntemle hücre proliferasyonunu azaltan uygun lazer dalga boyu ve ALA miktarlarında fotodinamik tedavi tekrar edilip flow sitometri ile hücrelerde apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır. Bu çalışmada diğer bir amaç, floresan özellikte bir madde olan protoporfirin IX?a dönüşebilen ALA?nın farklı kanser dokularına model hücrelere (MCF-7,SKMEL-30 ve UMUC3) uygulanarak konfokal mikroskop vasıtasıyla hücre içi görüntüleme yapabilmektir. Sonuç olarak hücre canlılık testi ve apoptoz/nekroz analizleri sonuçlarına göre 400-440 nm ve 600-630 nm Fs laser dalgaboyu ışıması ile yapılan 5-ALA-FDT?nin farklı kanser hücrelerine model hücrelerin üremelerinin engellenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında, 630 nm'de Fs indüklemesiyle, 30 sn ve 60 sn uygulama sürelerinden sonra apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümünün belirgin olduğu gözlendi. 5-ALA?nın prekürsor olarak kullanılmasının hücre içerisinde floresan PpIX birikimine neden olduğu da konfokal mikroskop analiziyle görüntülenmiştir. 5-ALA ve Fs lazer ile yapılan fotodinamik tedavinin farklı kanser dokularına model hücrelerin proliferasyonunu azalttığı ve 5-ALA?nın kanser hücrelerinde PPIX?u artırıp floresan birikime neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle 5-ALA FDT ve görüntülemede aynı anda kullanılabilecek etkili bir teranostik etkendir. Bu çalışmayla lazer dalga boyunun FDT?nin etkisini belirleyen önemli bir parametre olduğu da belirlenmiştir. Ayrıca literatürle karşılaştırıldığında kısa süreli Fs lazer uygulamasının, sürekli lazer uygulamalarına göre FDT için etkili bir kaynak olabileceği sonucu da ortaya çıkmıştır.
Anahtar Kelimeler:	Fotodinamik tedavi, 5-ALA (Aminolevulinik Asit), MCF-7, UMUC3, SKMEL-30, Femtosaniye Lazer
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- 5-ALA Uygulamış Farklı Kanser Dokularına Model Hücrelerde Femtosaniye Lazer ile Fotodinamik Tedavinin Teranostik Etkilerinin Araştırılması (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),

TÜBİTAK