

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KOLON VE MİDE KANSERİNDE 5- AMİNOLEVÜNELİK
ASİT ARACILI FOTODİNAMİK TANI**

Simge ÜNAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17006 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik. Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Simge ÜNAY tarafından hazırlanan “Kolon ve Mide kanserinde 5-aminolevünelik asit aracılı Fotodinamik Tanı” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN ADÜ

Üye : Prof. Dr. Murat PEHLİVAN EÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem BOZKURT GİRİT ADÜ

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam da; öncelikle deneylerin planlaması ve uygulanmasında bana yol gösteren tez danışmanım, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN'e;

Yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Mehmet BİLGİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Özlem BOZKURT GİRİT ile Litvanya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fizik Bölümü Matematik ve Biyofizik Anabilim Dalından Prof. Dr. Algimantas KRİSCIUKAITIS'e, araştırma görevlilerinden Rima RAMONAITE'e ve Robertas PETROLIS'e;

Deneylerimde bana yardım eden ve yüksek lisans sürem boyunca her zaman yanımda Biyofizik Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Didem BAKAY İLHAN, Ergün Cem KÖKEN, Mahmut Alp KILIÇ, Mehran AKSEL'e;

Her gün hayata bakış açımı, hayat felsefemi geliştirmem de yardımcı, her konuda yanımda olan, sonsuz sevgi, emek ve sabır için sevgili babam Prof. Dr. Aydın ÜNAY'a ve annem Öğr. Gör. Vesile ÜNAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kanser.....	3
2.2.Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	4
2.3 Kanserın Moleküler Biyolojisi.....	5
2.4.Mide Kanserı.....	5
2.4.1.Mide Kanserının Patolojisi.....	6
2.5.Kolon Kanserı.....	6
2.5.1. Kolon Kanserının Patolojisi.....	7
2.6. Elektromanyetik Dalgalar.....	7
2.7. Jablonski Diyagramı.....	9
2.8. Flüoresans.....	11
2.8.1. Flüoresans Tanı.....	12
2.8.1.1. Otofliüoresans Tanı Yöntemi.....	13
2.8.1.2.Flüoresans Tanı.....	13
2.9. Fotosensitif Ajanlar.....	14
2.9.1. 5-Aminolevünelik Asit	16
2.9.2. Hexaaminolüvenilik asit.....	18
2.10. Fotodinamik Tanıda Işık Kaynakları.....	19

2.11. Fotodinamik Tanı Klinikte Kullanımı.....	20
2.12. İmage J.....	21
2.13. Matlab.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
3.1.Gereç.....	24
3.2.Yöntem.....	25
3.2.1.Hücre Hatlarının Ekimi ve Çoğaltılması.....	25
3.2.2.Hücre Sayımı.....	26
3.2.3. 5-Aminolevünelik Asit Stok Solüsyonun Hazırlanışı.....	26
3.2.4.İn-Vitro Fotodinamik Tanı Deneyi.....	26
3.2.5.Hücre Görüntülenmesi.....	27
3.2.6.Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	28
3.2.7.Erken Apoptosis Analizi.....	28
3.2.8.Hücre Göçü.....	28
3.2.9.Hücrelerin Bulunduğu Alanları Saptamak.....	29
3.2.10. Hücre Flüoresans Yoğunlukları.....	30
3.2.11. Hücre Hareketlerinin Değerlendirilmesi.....	31
3.2.12. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1.Mikroskop Görüntüleri.....	34
4.2.Hücre Hatlarının Hareketlerinin Analizi.....	37
4.3.Hücre Canlılığının Analizi.....	38
4.4.Erken Apoptoz Analizi.....	39
4.5.5-Aminolevünelik Asit ile İndüklenmiş Hücrelerin Flüoresans Yoğunlukları.....	40
5.TARTIŞMA.....	43
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-ALA	: 5-Aminolevünelik Asit
CTCF	: Düzeltilmiş Toplam Hücre Flüoresansı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDT	: Fotodinamik Tanı
PpIX	: Protoporfirin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanserin hızlarının dağılımı.....	3
Şekil 2	Kanser hücresinin boyutundaki değişimler.....	4
Şekil 3	Erken ve ileri seviye mide kanseri.....	6
Şekil 4	EM dalga şekli.....	8
Şekil 5	Işığın doku içindeki doğrultusu.....	8
Şekil 6	Jablonski diyagramı.....	10
Şekil 7	Flüoresans görüntülemenin geometrik ve temel prensipleri.....	11
Şekil 8	Flüoresans görüntüleme tekniği.....	12
Şekil 9	Otoflüoresans görüntüleme prensibi.....	14
Şekil 10	Fotodinamik Tanı Yöntemi.....	15
Şekil 11	Fotosensitif Ajan Grupları.....	16
Şekil 12	5-ALA’nın hücre içi mekanizması.....	17
Şekil 13	5-ALA’nın stratejisi	18
Şekil 14	PpIX’ın absorbans ve flüoresans yoğunlukları.....	19
Şekil 15	Mavi ışık kaynağının spektrumu.....	20
Şekil 16	İmage J de seçilen bölgeler.....	23
Şekil 17	İmage j sonuç kutucuğu.....	23
Şekil 18	CTCF değerlerinin hesaplanması.....	24
Şekil 19	Kolon ve mide kanser hücre hatlarının karakteristik özellikleri.....	25
Şekil 20	Hücrelerin kültür kabına ekilmesi.....	26
Şekil 21	5-ALA ile 0-1-2-3-5 saat inkübe edilen kültür kaplarının deney düzeneği.....	27
Şekil 22	Hücrelerin bulunduğu alan tespiti.....	29
Şekil 23	İmage j programında analiz.....	30
Şekil 24	Hücre alanları.....	30
Şekil 25	Hücre hareketlerinin tespiti.....	31
Şekil 26	Farklı pasajlardaki hücre hareketi.....	37
Şekil 27	5-ALA uygulanmış hücrelerde canlılık testi.....	38
Şekil 28	5-ALA uygulanmış hücrelerde erken apoptoz analizi (x10).....	39
Şekil 29	1 saat inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları.....	41
Şekil 30	2 saat inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları	41
Şekil 31	3 saat inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları	42

Şekil 32	5 saat inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları42
-----------------	---



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1	Mide ve Kolon hücre hatlarının beyaz ışık altındaki görüntüleri.....	25
Resim 2	OLYMPUS IX71 ışık mikroskobu.....	27
Resim 3	AGS hücre hattının mikroskopik görüntüleri (x10).....	34
Resim 4	HCT116 hücre hattının mikroskopik görüntüleri(x10).....	35
Resim 5	MKN28 hücre hattının mikroskopik görüntüleri (x10).....	36



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1	Kanser hücrelerin hareket ettiği alanlarla hücrelerin bulunduğu alanların oranları.....	38
Tablo 2	5-ALA uygulanmış hücrelerde canlılık testi.....	38



ÖZET

KOLON VE MİDE KANSERİNDE 5-AMİNOLÜVONİLİK ASİT ARACILI FOTODİNAMİK TANI

ÜNAY S. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı
Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018

Günümüzde kolon ve mide kanserleri tüm kanser türleri içerisinde sık rastlanan kanserlerdendir. Bu kanserlerin erken tanısı için kullanılan yöntemler gerektiği kadar yeterli bilgi vermemektedir. Bu amaçla son zamanlarda fotodinamik tanı yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada; *in-vitro* olarak kolon kanseri (HCT116) ve mide kanseri (AGS ve HCT116) hücre hatlarında 5-ALA ile uyarılmış PpIX'ın oluşturduğu flüoresansın teşhisi ile gerçekleştirilen fotodinamik tanının en etkin şekilde yapılması için gerektiği koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tezde farklı dozlarda 5-ALA (0, 100, 200, 300 µg/ml) uygulanmış HCT116, AGS ve MKN28 hücre hatlarında 0, 1, 2, 3 ve 5 saat inkübasyon süresini takiben hücre canlılığı, flüoresans yoğunluk analizi, hücre göçü ve hareketliliği analizi, kaspaz 3/7 ile erken hücre ölümü analizi, mikroskop ile elde edilen flüoresans görüntülerde görüntü işleme gerçekleştirilmiştir.

200 µg/ml 5-ALA ile uyarılan ve 3 saat inkübe edilen hücrelerde uyarılmadan 3 saat sonra hücre canlılığı açısından karşılaştırıldığında AGS hücre hattının MKN28 ve HCT116 hücre hattına nazaran daha fazla hücre canlılığında azalma olduğu gözlenmiştir. MKN28, HCT116 ve AGS hücre hatlarının farklı inkübe sürelerinde ve 5-ALA konsantrasyonlarında hücreler de farklı flüoresans yoğunlukları gösterilmiştir. En belirgin flüoresans yoğunluğu MKN28 hücre hattında gözlenmiştir. En yüksek hücre hareketinin MKN-28 hücre hattında, en düşük hücre hareketinin ise HCT116 hücre hattında olduğu belirlenmiştir. 300 µg/ml 5-ALA ile uyarılmış HCT116 hücre hattında erken apoptoz bulguları diğer hücre hatları ile karşılaştırıldığında daha belirgin olarak gözlenmiştir.

Sonuç olarak, 200 µg/ml 5-ALA ile uyarılan hücrelerde 3 saat sonra gözlenen flüoresansın mide ve kolon kanserlerinin fotodinamik tanı amacıyla kullanılabilecek en uygun tanı dozu olduğu saptanmıştır. İleride yapılacak insan çalışmalarında etkinliği ve duyarlılığı gösterilecek olan fotodinamik tanı, klinikte mide ve kolon kanserleri erken tanısında umut vaat eden bir yöntem olarak uygulanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: 5-Aminolevünelik Asit, Fotodinamik Tanı, Kolon kanseri, Mide kanseri

ABSTRACT

5-AMINOLEVULINIC ACID-MEDIATED PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS IN COLON AND GASTRIC CANCER CELL LINES

UNAY S. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Biophysics Program
M.Sc. Thesis, Aydın, 2018

Today, colon and gastric cancers are common cancers in all types of cancer. The methods used for early detection of these cancers do not provide enough information as necessary. For this purpose, photodynamic diagnosis has started to be used recently. In this study; it was aimed to determine the conditions required for the most effective photodynamic recognition of the fluorescence produced by 5-ALA stimulated PpIX in colon cancer (HCT116) and gastric cancer (AGS and HCT116) in vitro.

In this thesis, HCT116, AGS and MKN28 cell lines which were administered different 5-ALA (0, 100, 200, 300 300 µg / ml) concentrations and incubations time (0, 1, 2, 3, 5 hours), were performed on fluorescence images obtained by cell viability, fluorescence intensity analysis, cell migration and mobility analysis by imaging processing, early cell apoptosis analysis with caspase3/7.

When the cells were stimulated by 200 µg / ml 5-ALA on 3 hours, the cell viability of AGS cell lines decreased more than the cell viability of MKN28 and HCT116 cell lines. Different fluorescence intensities of cancer cells were determined at various incubation times and 5-ALA concentrations of MKN28, HCT116 and AGS cell lines. The most pronounced fluorescence intensity was observed on the MKN 28 cell line. It was determined that the highest cell movement was in the MKN-28 cell line and the lowest cell movement was in the HCT116 cell line. Early detection of apoptosis in the HCT116 cell line stimulated with 300 µg / ml 5-ALA was more pronounced when compared to other cell lines.

As a result, fluorescence observed after 3 hours in cells stimulated with 200 µg / ml 5-ALA was found to be the most suitable diagnosis for photodynamic diagnosis of gastric and colon cancers. Photodynamic diagnosis, which will show efficacy and sensitivity in future human studies, can be applied as a promising method in the early diagnosis of gastric and colon cancers clinically.

Key word: 5-Aminolevulinic acid, photodynamic diagnosis, colon cancer, gastric cancer

1.GİRİŞ

Kanser, vücutta bulunan hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucuyla meydana gelen patolojik bir hastalıktır. Günümüzde kolon ve mide kanserleri, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir ve bu kanserler dünya genelinde sırasıyla üçüncü ve beşinci sıklıkta görülen en yaygın kanser türlerindendir (Campbell ve ark, 2017).

Kanser tanısı için yıllardır çalışmalar yapılmaktadır fakat etkin bir erken tanı yöntemi tespit edilememiştir. Günümüzde kullanılan yöntemle çoğu kanser dokusu ile sağlıklı doku arasındaki sınır kesin bir şekilde gösterememektedir. Kanser dokusunun vücutta net olarak yerleşimini tespit edebilmek amacıyla birçok yöntemler geliştirilmektedir. Bu tanı yöntemleri hasta ömrünü uzatmış fakat her kanser türü için gerektiği kadar erken tanı sağlayamamıştır. Günümüzde kanser hücrelerinin tanısında histopatolojik tanının yanında bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografi gibi gelişmiş görüntüleme teknikleri de kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler erken safhada kanser hücrelerinin tanısında yeterli olamamaktadır (Kitada ve ark, 2015). Bu nedenle kanser tanı yöntemleri geliştirilmeye yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu çalışmaların temel amaçları kanser hücre yerleşimini kesin olarak göstermektir. Kanser tanısında klinikte kullanılan yöntemlerden biri de flüoresans tanı yöntemidir. Flüoresans tanı yöntemi, invaziv olmayan ve diğer görüntüleme teknikleri ile karşılaştırıldığında hızlı ve ucuz olan bir yöntemdir. Flüoresans tanı yöntemleri gözlemlenen flüoresansa göre otoflüoresans ve fotodinamik tanı (FDT) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu flüoresans tanı yöntemleri; onkoloji, dermatoloji, göğüs hastalıkları, jinekoloji, gastroenteroloji gibi geniş alanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Koizumi ve ark,2016). Bu yöntemler hücrelerin kanserli olup olmadığını ve kanserli hücrelerin bulunduğu yerleşimleri belirlemek için kullanılmaktadır. Fotodinamik tanıda özellikle kanser dokusunda birikme özelliği bulunan ve özel bir dalga boyuna maruz bırakıldığında flüoresans ışık yayan fotosensitif ajanlar deneklere uygulanmaktadır. Takiben şüpheli kanser dokuları fotosensitif ajanın özelliklerine bağlı olarak mavi ışığa maruz bırakılmaktadır. Sonuçta kanserli dokuda sınırları belirgin kırmızı flüoresans emisyonu oluşturmaktadır. Böylece kanserin normal dokudan net bir biçimde ayırt edilmesini sağlanmaktadır. (Jichlinski ve Jacqmin, 2008).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay almış fotodinamik tanı ajanları 5-aminolüvonelik asit (5-ALA) ve 5-aminolüvonelik asit 'in ester türevi olan hexaaminolüvenilik asit (HAL) başta ürolojik kanserler olmak üzere birçok kanser tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu ajanların dışında da birçok fotosensitif ajan deneysel olarak fotodinamik tanıda kullanılmaktadır (Yagi ve ark, 2017; Demay ve ark, 2018).

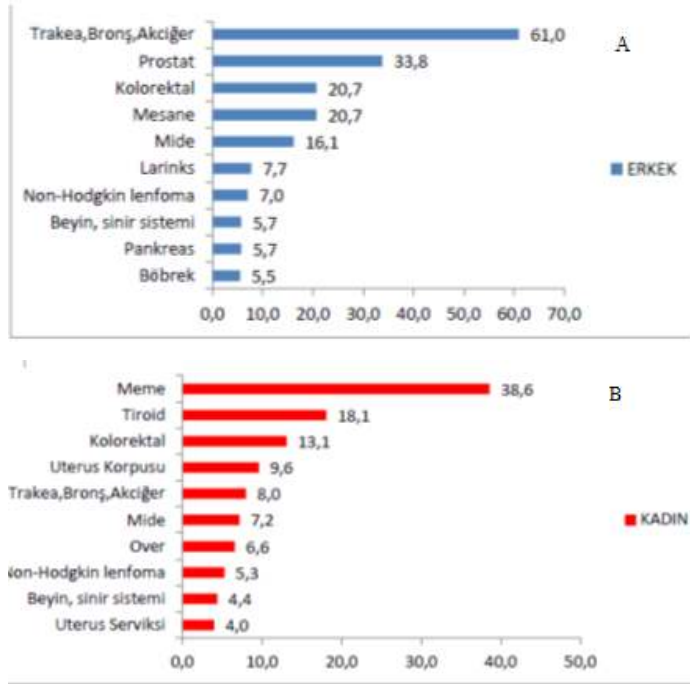
Bu çalışmanın amacı; *in vitro* olarak kolon (HCT116) ve mide (AGS ve MKN28) kanser hücre hatlarını 5-ALA ile uyarmak, hücrelerde birikmiş olan protoporfirin IX'un oluşturduğu flüoresansı teşhis ederek kolon ve mide kanseri hücre hatlarındaki ayırt edici flüoresansı göstermektir. Bununla birlikte flüoresansın belirlenen kanser hücre hatlarında flüoresans yoğunluk analizi, hücre göçü ve hareketliliği analizi ve erken hücre ölümü analizi yapılması da amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve anormal hücre yapılarının kontrolsüz olarak organizmaya yayılması ile kendini gösteren bir hastalıktır. Genetik faktörler ve/veya çevresel faktörler kanseri tetiklemekte ve kanser her yaş aralığında görülmektedir (Boyle ve Langman, 2000).

Kanser ülkemizde ve dünyada sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık gözlenen ikinci ölüm nedenidir. Dünyada 2008 yılındaki kanser raporlarına göre toplam 7,6 milyon insan kanser nedeniyle hayatı kaybetmiştir (Jemal ve ark, 2011). Kanser seyri günümüzdeki gibi devam ederse 2030 yılına gelindiğinde, yıllık 22 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıkması beklenmektedir. Günümüzde dünya genelinde her yıl yaklaşık 7,6 milyon kişi kanserden kaybedilmektedir.

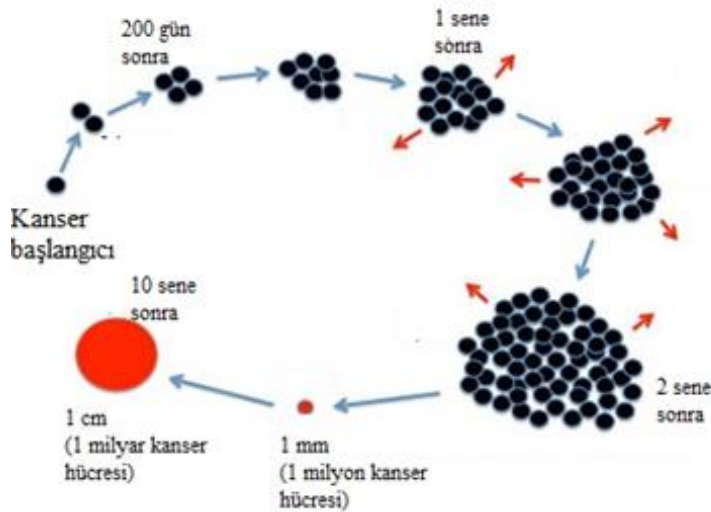


Şekil 1. Türkiye’de 2010 yılında en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa standardize edilmiş hızlarının dağılımı (A) Erkeklerde (B) Kadınlarda (Dünya standart Nüfusu, 100000 Kişide) (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2014)

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı (2014) tarafından yayınlanan kanser verilerine göre ülkemizdeki kanser insidansları değerleri göz önüne alındığında her iki cinsiyette kolorektal kanserleri üçüncü ve mide kanserleri ise beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 1).

2.2.Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücreleri ortamda büyüme faktörüne gerek duymadan büyümeyi ve bölünmeyi devam ettirmektedirler. Kanser hücreleri gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri yapmaktadır veya bu hücrelerde hücre döngüsü kontrol sisteminde anormalliklere görülmektedir. Kanser hücreleri yıprandıkları veya hasara uğradıklarında kendilerini yok etmemektedir. Bir kanser hücresinin normal hücreden farkı daha az sitoplazmasının olması, birden çok çekirdek içermesi, çoklu ve büyük çekirdekçiğinin bulunması ve kaba taneli kromatin içermesi olarak belirtilmektedir (Campbell ve ark, 2017). Bir kanser hücresinin zamanla çoğalarak bir toplu iğne başının büyüklüğüne ulaşması için geçen süre yaklaşık 10 yıldır (Şekil 2) (Friberg ve Mattson, 1997). Kanser hücresi genetik bir mutasyonla normal hücreden farklılaştıktan sonra hiperplaziye uğramaktadır. Hiperplazi aşamasında kanser ile normal hücre benzer fenotipte olmasına karşın kanser hücresi daha hızlı çoğalmaktadır. Takip eden displazi evresinde kanser hücrelerinin şeklinde ve oryantasyonunda anormallikler oluşmaktadır. Daha sonraki *in situ* kanser evresinde hücreleri lokal olarak yerleşmişken invaziv kanser evresinde kan damarları ile yayılmaya başlamaktadır ve yakın ile uzak metastazlar oluşmaktadır. (Campbell ve ark, 2017).



Şekil 2.Kanser hücresinin boyutundaki değişimler (Friberg ve Mattson, 1997)

2.3.Kanserin Moleküler Biyolojisi

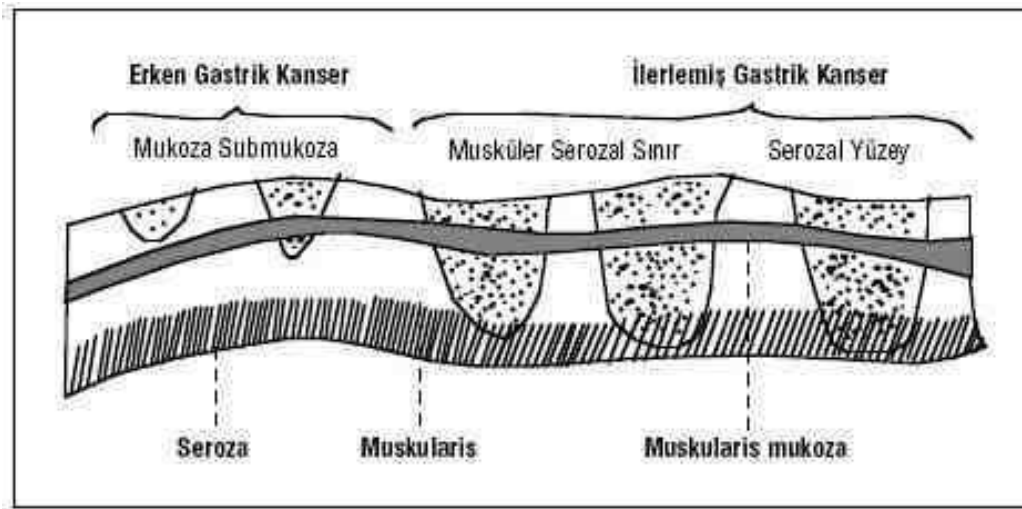
Bir kanser hücresinde, hücre döngüsünü etkileyen genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Hücre çekirdeğindeki DNA’da bulunan bazı genler hücrenin büyümesini, bölünebilmesini yani hücre döngüsünü düzenlemektedir. Eğer bu genlerde mutasyon meydana gelirse ise hücre döngüsünde aksaklıklar ya da anormallikler meydana çıkmaktadır. Mutasyonlar genetik ve/veya çevresel faktörler sebebiyle meydana gelebilmektedir (Campbell ve ark, 2017). Proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genler normal hücrelerde hücre bölünmesini ve büyümesini kontrol etmektedirler. Fakat bazı durumlarda proto-onkogenler aşırı derecede hücre çoğalmasını tetikleyerek normal hücreyi kanser hücresine dönüştürebilmektedir. Aynı şekilde tümör baskılayıcı gen normal hücrede anormal hücre büyümesini engelleyen bir protein sağlamaktadır. Eğer bu proteinin mutasyona uğraması meydana gelir ise normal hücre tümörlü hücreye dönüşebilmektedir Bu mutasyonlardan bazıları kalıtsal olabilir ve bu nedenle bazı kanser tiplerinin gelişmesinde yatkınlıklar meydana gelebilir (Campbell ve ark, 2017). Tümör hücreleri bu proto-onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri etkileyen değişimleri saklar ve savunma hücrelerinin bu anormalliklerini fark ederek kendilerini yok etmelerini önler.

2.4.Mide kanseri

Mide kaburgaların altında karnın üst bölgesinde yer alan içi boş büyük bir organdır. Mide kanserinde sadece kontrol edilemeyen hücre büyümesi değil aynı zamanda kontrolsüz hücre göçü yani metastazlar da sıklıkla görülmektedir (Boyle ve Langman 2000; Clark ve Vignjevic,2015). Mide kanseri çok hızlı bir şekilde yayılan bir kanser türü olup çevredeki organlara ve lenf bezlerine hızlı bir şekilde yayılır. Mide kanseri dünya üzerinde en sık görülen ve ölüm oranı en yüksek olan kanser türleri arasında bulunmaktadır (Herszényi, 2010). Mide kanseri ölüm oranı bakımından dünya üzerinde üçüncü ve görülme sıklığı bakımından beşinci. sırada yer almaktadır (Jemal ve ark, 2011). Mide kanseri genellikle geç evrede teşhis edilmektedir (Boyle ve Langman, 2000).

2.4.1. Mide Kanserinin Patolojisi

Mide kanserinde yaklaşık olarak %90-95 oranında adenokarsinom (kötü huylu tümör) tipi rastlanmaktadır. Ayrıca %4 oranında lenfoma ve %2 mezankimal tümörleri görülmektedir (Robbins, 2018). Mide kanserinin tedavisi ve tanı açısından sınıflandırması, invazyon derinliğine göre yapılmaktadır. Erken mide kanseri sadece mide duvarında mukoza ve submukozada sınırlı kaldığı durumdur. Şekil 3’de erken ve geç evredeki mide kanseri görülebilmektedir.



Şekil 3. Erken ve ileri seviye mide kanseri (Kapan, 2001).

2.5.Kolon Kanseri

Kolon kanseri dünyada görülme sıklığı bakımından üçüncü. ve ölüm sıklığı tarafından ise dördüncü sırada bulunmaktadır (Zora, 2012). Kolorektal kanserin yaklaşık %70’i kolon kanseri ve yaklaşık %30’nu ise rektum kanseri oluşturur. Klinikte proksimal ve distal kolorektal kanserin etkileri diğer tiplere göre daha fazladır (Wu,2006). Kolon kanseri her yaş aralığında görülebilmesine rağmen en sık 50 yaşından sonra gözlenmektedir ve kadın ile erkek arasında görüme sıklığı açısından pek bir fark bulunmamaktadır. Kolon kanser hücreleri öncelikle en yakınındaki lenf bezlerine yayılmaktadır ve takiben vücuttaki diğer bezlere ve organlara da yayılma gösterebilmektedirler (Campbell ve ark, 2017).

2.5.1.Kolon kanserinin Patolojisi

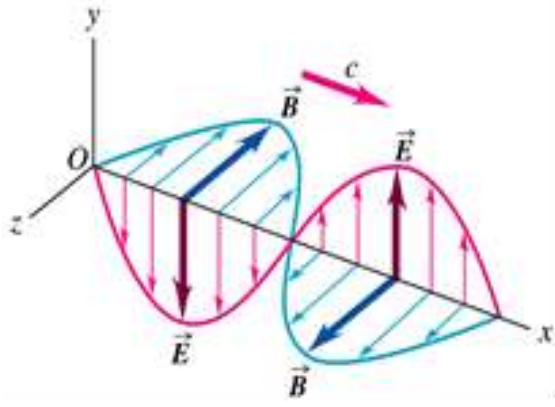
Kolon ve rektum kanserlerinin yaklaşık %95'i adenokarsinom (kötü huylu tümör) şeklindedir. Mikroskopik incelemede tümörden tümöre değişebilen oranlarda olmak üzere bez yapıları oluşturdıkları ve müsin salgısı oluşturabilmektedirler. Yassı epitel hücreleri kanserler kolonda nadiren oluşmaktadırlar. Kolon kanserleri kolon duvarı içinde büyüyerek bağırsak duvarını geçmektedirler. Duvarı geçen kanser hücreleri lenf bezlerine, bağırsak komşuluğunda bulunan organlara ve dolaşım ile uzak organlara yayılabilirler (Campbell ve ark, 2017).

2.6 Elektromanyetik Dalgalar

Elektromanyetik (EM) dalgalar elektrik yüklü parçacıkların titreşimi ile oluşurlar. Bu titreşim sonucu oluşan dalga hem elektrik alan hem de manyetik alan bileşeni bulunmaktadır. EM dalga yönü ve hız vektörü hem manyetik alan hem de elektrik alan bileşenine diktir. EM dalga hem elektrik hem de manyetik alan özellikleri taşımaktadır. Yayılması için herhangi bir destek ortama ihtiyaç duymayan EM dalgalar, uzayda (boşlukta) ışık hızı ($c = 3 \times 10^8$ m/s) ile seyahat ederler. Oluşan EM dalga enerjisi bir madde ile etkileşime geçene kadar ışık hızı ile seyahat eder. Sonuçta enine dalga olan EM dalgalar bir yerden bir yere enerji taşırlar (Şekil 4) (Bilgin ve Bozkurt-Girit, 2017).

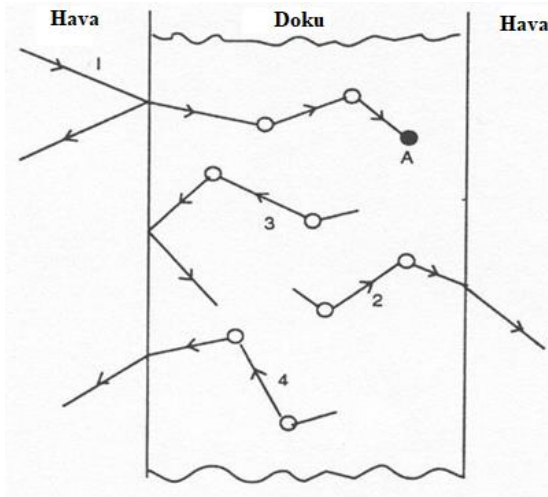
Bir fotonun enerjisi Planck sabiti ($h = 6.626 \times 10^{-34}$ Js) ile frekansın (f , saniyedeki titreşim sayısı, 1/s) çarpımıyla hesaplanmaktadır. Burada EM dalga yayılma hızının ($c = 3 \times 10^8$ m/s) dalga boyuna (λ , m) bölünmesiyle EM dalga frekansı hesaplanmaktadır.

$$E = h f = h c / \lambda \quad (J)$$



Şekil. 4 EM dalganın şekli, (Grossweiner, 2005)

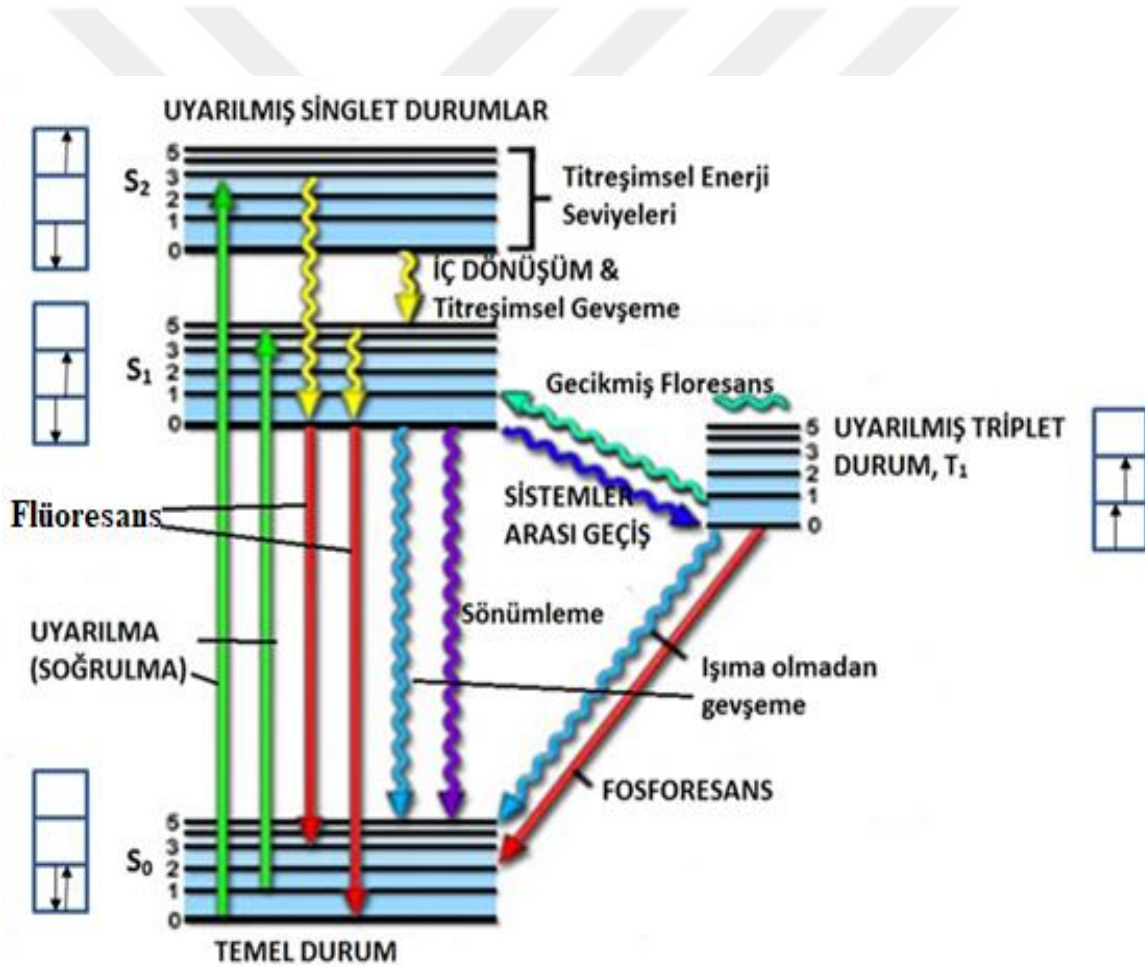
EM doku içinde ya soğurucu bir ajan tarafından soğurulur, ya da saçılıma uğrar. Birçok saçılım sonucu ortamdan geçebilmektedir (transmisyon) ya da geriye doğru saçılım sonucu difüz yansıma meydana ugramaktadır. Dokuya ışık geldiğinde, gelme açısına eşit oranda doku yüzeyinden yansıma meydana ugramaktadır (Şekil 5) (Grossweiner, 2005).



Şekil 5. (A) Işığın doku içindeki kaderi. 1) Spekular yansımayı takiben doku içine giren ışığın iki saçılmadan sonra soğrulması, 2) Birçok saçılmadan sonra ışığın dokudan geçmesi (transmisyon), 3) Işığın ön yüzeyden içeri doğru yansıması, 4) Birçok saçılımdan sonra oluşan difüz yansıma. (Grossweiner, 2005).

2.7. Jablonski diyagramı

Elektromanyetik dalgaların etki mekanizmaları, frekanslarına göre farklılık göstermektedir. EM dalganın frekansı ne kadar büyük ise enerjisi de o kadar fazladır. EM dalgalar maddenin atomlarına çarptığında, EM dalganın enerjisi soğrulur. Görünür ışık ve ultraviyole ışınının soğrulma soğurma yeteneği onun yapısındaki atomik çekirdek etrafında elektronların yerleşimine bağlıdır. Böylece molekül tarafından bir foton soğurulduğunda bir elektron daha yüksek enerji seviyeli yükselmektedir. Bir foton soğurmuş molekül uyarılmış durumdadır ve artık kararlı değildir. Uyarılmış molekülde daha yüksek enerjili seviyelere taşınmış olan elektronlar, tekrar kararlı olan temel seviyeye dönmeye çalışmaktadır. Bunun için titreşimsel hareket yaparak ortama enerjilerini vermektedirler (Şekil 6).

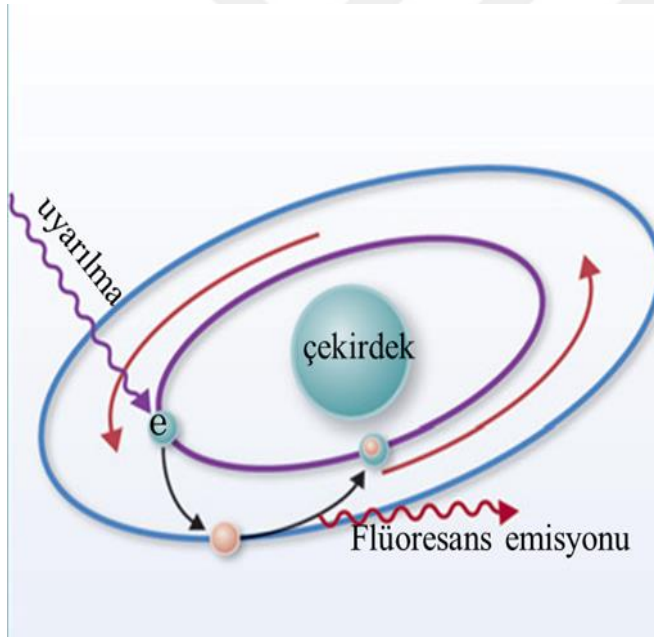


Şekil 6. Jablonski diyagramı (Grossweiner, 2005)

Flüoresans emisyonu uyarılmış atom/molekülün birinci singlet enerji düzeyinin en düşük titreşimsel seviyesinden temel enerji düzeyine dönerken ortama salınan ışıma oluşmaktadır (Şekil 6). Flüoresans ışıma daima soğurulan dalga boyundan daha uzun dalga boyunda gerçekleşir ve bu nedenle de daha düşük enerjilidir. Yani Jablonski diyagramında bir fotonun soğurulmasını takiben oluşan foto-fiziksel işlemler görülmektedir yani uyarılmış durumda bulunan atom/molekülün soğurulan enerjisinin kaderini tanımlanmaktadır (Şekil 6). Uyarılmış durumdaki atom/moleküller enerjilerini ortama ısı enerjisi olarak vermek suretiyle, flüoresans veya fosforesans emisyonu ile ya da biyokimyasal reaksiyona katılmak suretiyle temel enerji durumuna dönebilmektedirler (Bilgin ve Bozkurt-Girit, 2017).

2.8 Flüoresans

Bir cismin foton soğurmasını takiben daha uzun bir dalga boyunda diğer bir foton yayılmasını tetiklemesiyle gerçekleşen ışıma olayına flüoresans denir (Şekil 7).

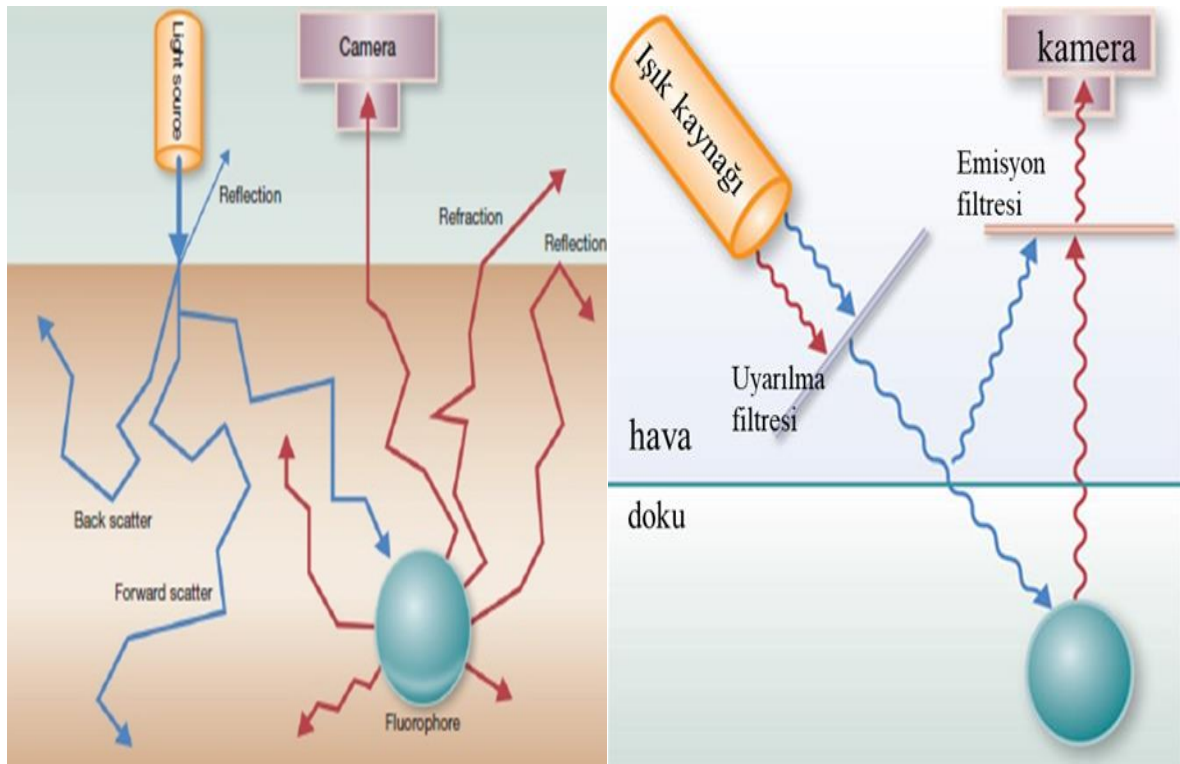


Şekil 7. Flüoresans görüntülemenin geometrik ve temel prensipleri

Ortama flüoresans emisyonu yapan ajanlara flüorofor denilmektedir. Bir flüoroforun yaşam süresi, uyarılma ve temel duruma dönme arasındaki ortalama zamandır (yaklaşık 10 ns dir). Salınan enerjinin dalga boyu ve miktarı flüorofora ve onun kimyasal çevresine bağlıdır. Flüoresans moleküllerin uyarılma bölgesinde büyük moleküler soğurma sabiti, yüksek

quantum toplamı, en uygun uyarılma dalga boyu, foto kararlılık, uyarılma-durum ömrünü içerir. Flüoresans görüntüleme; eksitasyon ve emisyon ışığı saçılma bağı olarak rastgele ortamda hareket etmektedir.

Dokudaki flüoroforaya sadece küçük bir uyarılma ışığı ulaşır ve kamerada salınan ışığın küçük bir kısmını yakalayıp flüoresans görüntüden meydana gelmektedir (Şekil 8, A). Burada kullanılacak filtreler ile flüoroforu istenilen dalga boyundaki ışınla uyarılması sağlanır ve salınan flüoresans da kamera ile kayıt edilir (Şekil 8, B).



A

B

Şekil 8. Flüoresans görüntüleme tekniği A) flüoresans görüntünün oluşumu B) Kullanılan filtreler (Bilgin ve Bozkurt-Girit, 2017).

Flüoresans görüntünün şiddetini etkileyen faktörler sırasıyla; uyarma ve emisyon dalga boyu, uyarma ışığının şiddeti, flüoroforun kuantum etkinliği (Φ = salınan foton sayısı/soğrulan foton sayısı), flüoroforun saturasyonu, rezonans enerji transfer ortağı

(flüoresan=FRET; soğrulma=Sönümlleme), ortamdaki oksitleyici ajanların indirgeyici ajanlara oranı olarak belirtilmektedir (Bilgin ve Bozkurt-Girit, 2017).

2.8.1.Flüoresans Tanı

Flüoresans tanı, kanser öncesi ve kanser dokuların görüntüleme için hızlı ve invaziv olmayan bir yöntemdir. Bu yöntem onkoloji, dermatoloji, göğüs hastalıkları, jinekoloji, üroloji, genel cerrahi, beyin cerrahisi, dâhiliye gibi birçok klinik alanda kullanılmaktadır. Bu yöntemde öncelikle beyaz ışık altında şüpheli dokular incelenmektedir ve takiben verilen fotosensitif ajanı soğuran dokular veya dokuların doğal flüoresansı incelenmektedir. Flüoresans tanı çok hassas ve özgün bir yöntemdir.

Flüoresans tanı gözlemlenen flüoresansa göre ikiye ayrılmaktadır; otoflüoresans tanı yöntemi ve fotodinamik tanı. Bu yöntemler normal ve patolojik dokuların farklı flüoresans yansıtma esasına dayanmaktadır. Porfirinler ve 5-ALA gibi fotosensitif ajanların eksojen kullanması sonucu dokular ve/veya hücreleri görünür ışığa duyarlı hale getirmektedir. Doku yüzeyi fotosensitif ajana uygun dalga boyunda bir ışına maruz bırakıldığı zaman, yoğunluğu çok düşük olan ve çıplak gözle görülemeyen doku flüoresansı oluşur ve uygun teknikler kullanılarak görülür hale getirilebilir (Bozzini ve ark, 2013).

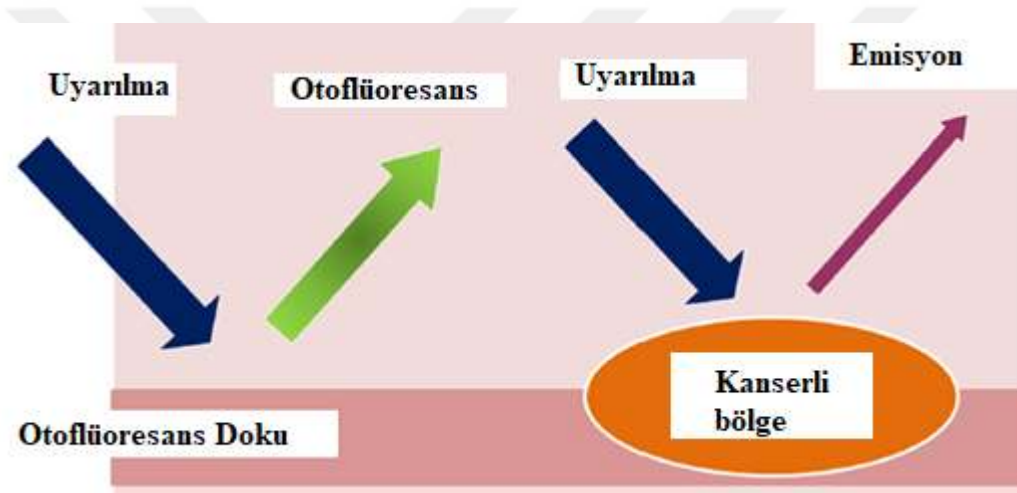
2.8.1.1.Otoflüoresans Tanı Yöntemi

Otoflüoresans aromatik aminoasitler, nükleotitler veya porfirinler gibi endojen molekülleri ile oluşturulur. Çok hassas ve özgün olan bu yöntemde beyaz ışık altında dokulardaki küçük değişiklikler görülebilmektedir. Beyaz ışık endoskopik işlemlerinde tanımlanamayan prekanseröz veya kanser dokuları genellikle normalde yeşil flüoresans veren normal dokulara göre kuvvetli kırmızı flüoresans verirler. Bu şekilde kanserli doku ile sağlıklı dokular ayırt edilebilmektedir (Laranjo ve ark, 2013).

Otoflüoresans veren ajanlar vitamin C, NAD(P)H, vitamin D, lignin, klorofil, vitamin A, Kollajen ve elastin, flavinler, FMN ve FAD, lipofüskin, riboflavin ve protoporfirin IX olarak belirtilmiştir. Hücre içi otoflüoresans sıklıkla her ikisi de hücre metabolik indikatör

olan indirgenmiş piridin nükleotitleri (NAD(P)H) ve oksitlenmiş flavinlere (FMN, FAD) bağlıdır. Mitokondriyal NADH otoflüoresans klinikte hücre solunum belirteci olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca NADH/NAD oranının artmasına neden olan hipoksi artmış mitokondriyal otoflüoresans tanınabilmektedir (Kolenc ve Quinn, 2018).

Otoflüoresans da incelenecek doku uygun dalga boyunda uyarılmaktadır; örneğin FAD için 450 nm dalga boyunda uyarılmaktadır ve 530 nm dalga boyunda oluşan flüoresans emisyonu incelenmektedir. Akciğer dokusunda mavi ışıkla uyardığımızda normal akciğer dokusu yeşil otoflüoresans gösterirken, kanserli dokularda azalmış kırmızı otoflüoresans gözlenmektedir (Şekil 9). Nümerik analiz sonucunda sayısal renk kodlarından otoflüoresans görüntüsü analiz edilmektedir (Kitada ve ark, 2015).



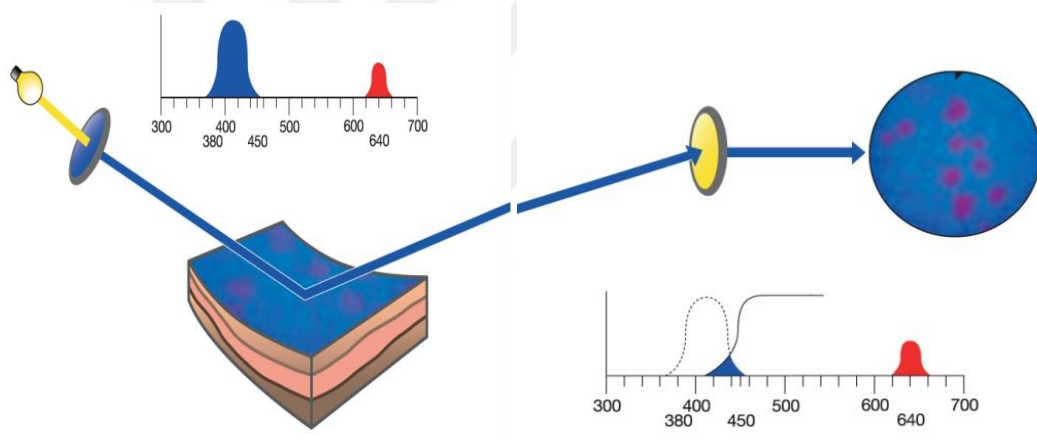
Şekil 9. Otoflüoresans görüntüleme prensibi (Kitada ve ark, 2015)

2.8.1.2. Fotodinamik Tanı

Işık ile uyarıldıklarında flüoresans ışıması yapan kimyasal bileşiklere flüorofor denilmektedir. Porfirinler, klorinler, fitalosiyeninler gibi fotosensitif ajanlar veya 5-ALA gibi protoporfirin IX ön maddesi tümörlerde seçici olarak biriken flüoroforlardır ve eksojen flüoresans tanıda kullanılmaktadırlar. Bu yöntemin en önemli avantajı otoflüoresans yöntemine göre kanserli dokulardan daha kuvvetli flüoresans sinyali alınmasıdır. Bir diğer önemli avantajı ise kullanılacak eksojen flüoroforun uyarılma ve emisyon spektrumları çok iyi bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı fotodinamik tanıda çözülmesi gereken problemler

sadece hastalarda uygulanan flüorofora bağlı görülebilecek bazı yan etkiler, flüoroforun uygulama yöntemi ve ilgilenen dokuda seçici olarak flüoroforun yerleşimine ait olmaktadır (Sieron ve ark, 2013). Ntziachristos ve ark (2005) fotodinamik tanıda tek bir noktadan gelen flüoresans verilerinden yapılan nokta ölçümleri yerine lezyon sınırındaki birçok noktadan alınan flüoresans sinyalinin analizi ile elde edilen patolojik lezyonun flüoresans haritası elde edilebildiğini belirtmişlerdir.

Hücre içine alınan bir ışığa duyarlı fotosensitif ajan verildiğinde, hücrenin mitokondri organelinde ajanın birikimi 90-120 dakika süre almaktadır. Ajan protoporfirin IX'a dönüşür. Bu pigment daha sonra bir tümörlü hücrede mavi uyarılma ışığı altında kırmızı flüoresans yayar. Bununla birlikte, bu durumda, mavi arka plana karşı kırmızı floresansın iyi bir kontrast elde edilemediğinden bu flüoresansı vurgulamak için, özel olarak PDD için tasarlanmış sarı bir filtre kullanılmaktadır (Şekil 10).

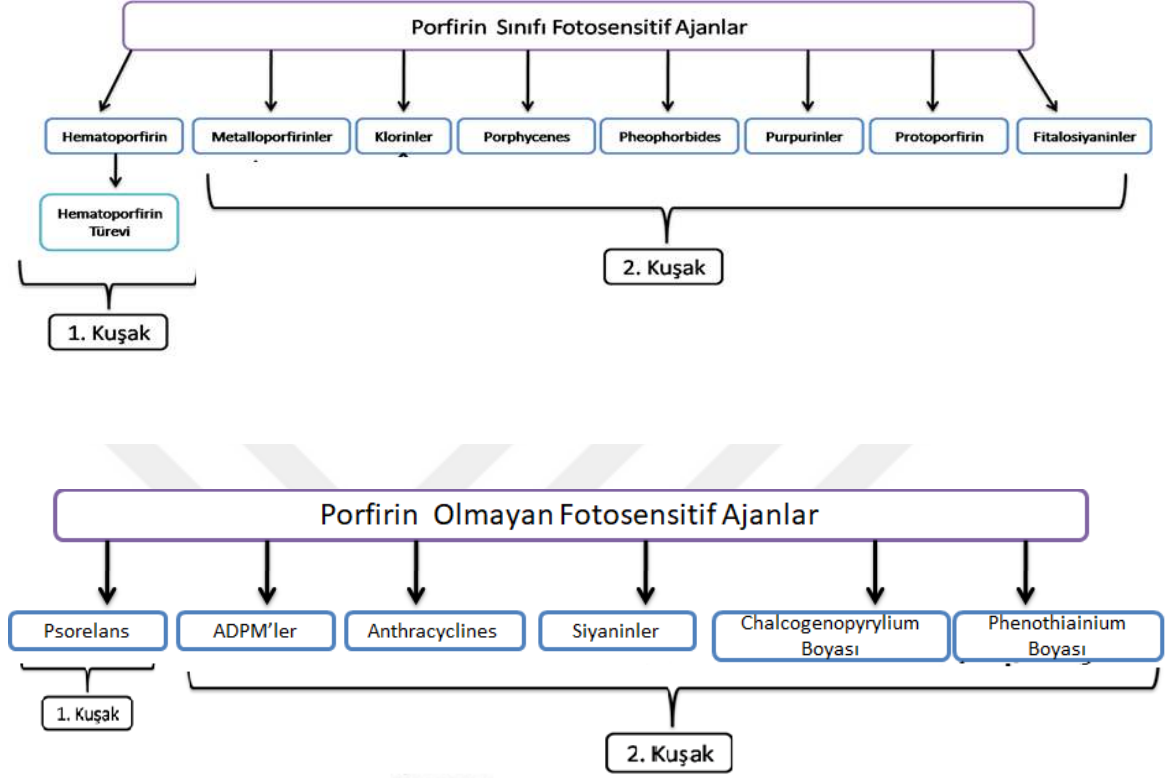


Şekil 10. Fotodinamik Tanı Yöntemi

2.9. Fotosensitif Ajanlar

Bir kanser tedavi yöntemi olan fotodinamik tanıda birçok fotosensitif ajan kullanılmaktadır. Bu fotosensitif ajanlar; porfirin olan fotosensitif ajanlar ile porfirin olmayan fotosensitif ajan olmak üzere 2 farklı grupta özetlenebilir (Şekil 11). Bu fotodinamik tedavi ajanlarından bazıları günümüzde fotodinamik tanıda da kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan fotodinamik tanı ajanı, FDA onay almış olan protoporfirin IX ön maddesi olan 5-ALA ve ALA'nın ester türevi olan hexaaminolüvenilik asittir. Her iki

ajanda hücrelerde metabolize olması sonucu hem sentezi sürecinde protoporfirin IX oluşmaktadır.



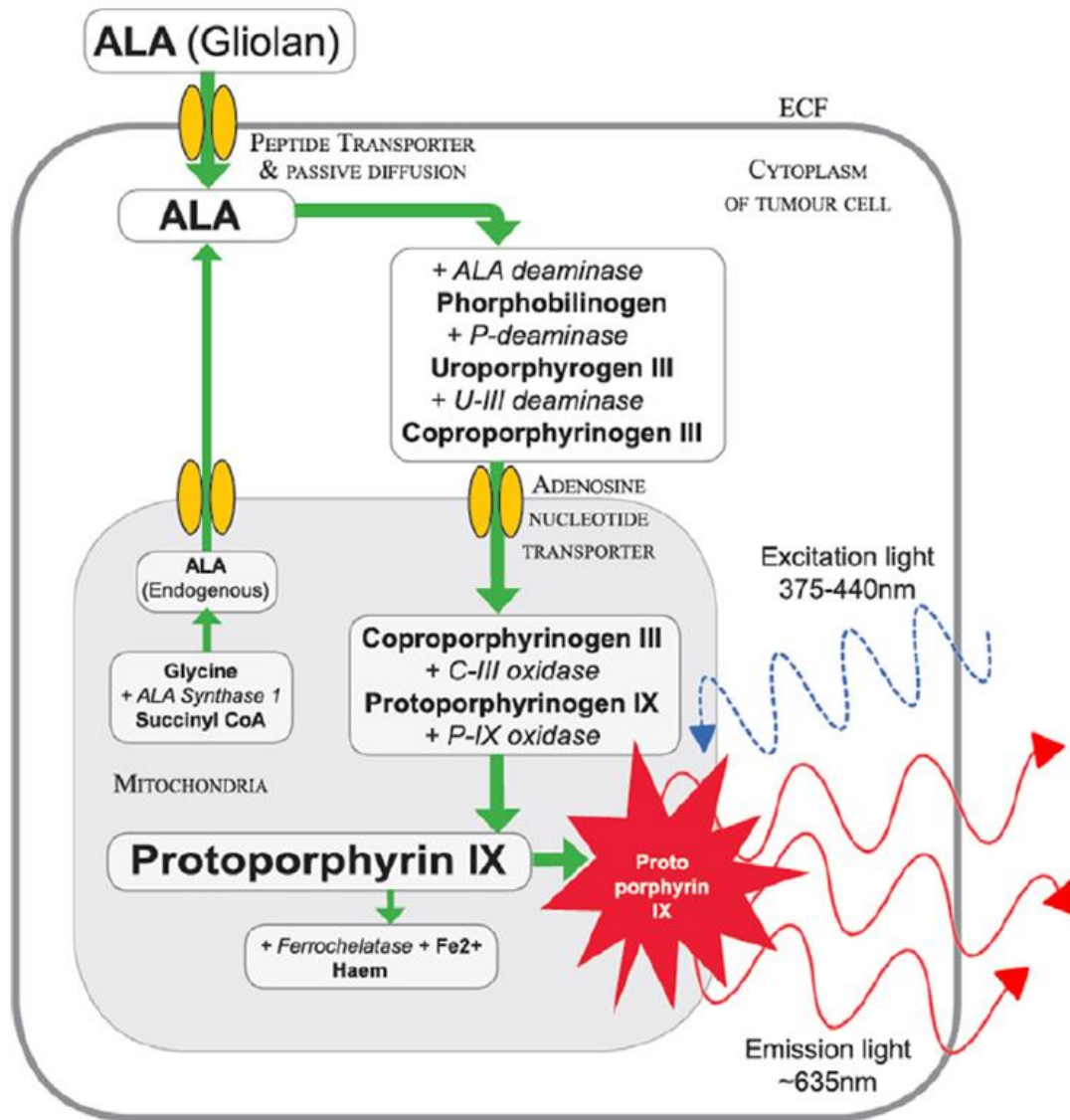
Şekil 11. Fotosensitif Ajan Grupları (Başoğlu H, 2014)

5-ALA ile uyarılmış PpIX' un birikimi ayrıca Fe^{+2} 'nın miktarına ve kullanılabilirlik durumuna bağlıdır çünkü hücrede protoporfirin hem içinde dönüşümü gerçekleşmektedir. Tedavi edilebilir olan hücre içinde, doğru fotosensitif ajan konsantrasyonu hücre membrandaki fotosensitif moleküllerin taşınmasına bağlıdır.

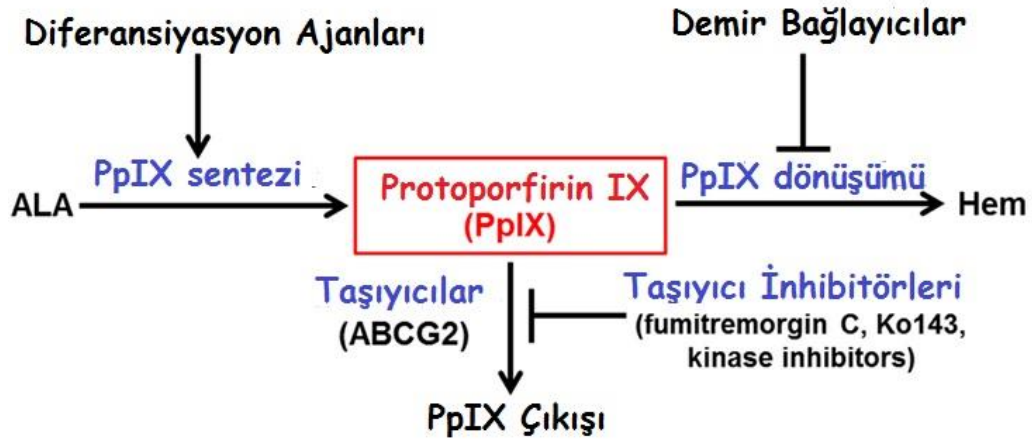
PpIX hemoglobin, sitokromlar ve diğer hemoproteinler ile ilişkili dört pirol halkası ile merkezinde demir, magnezyum gibi bir metal iyonu içeren organik bir bileşiktir. Fotodinamik tanı ve tedavide ilaç olarak kullanılan bu bileşik fizyolojik ortamlarda da bulunmaktadır. PpIX suda çözünürlüğünün az olması ve agregasyon özelliği nedeniyle çalışmalarda doğrudan deneklere uygulanamamaktadır (Rossi ve ark, 2008).

2.9.1. 5-Aminolevulinik Asit (5-ALA)

5-aminolevulinik asit (5-ALA), çeşitli epitel ve kanserli dokulardaki flüoresans porfirinlerin, özellikle protoporfirinin sentezini ve birikimini indükleyen aminoasit glisin ve süksinil-CoA'dan sentezlenen hemoglobin'in doğal bir biyokimyasal öncüsüdür (Regula ve ark, 1996). 5-ALA özellikli olarak hücre içine alınır ve hızlı bir şekilde PpIX'ın biyosentezi için kullanılır (Şekil 12) ve 5-ALA, uygulamadan 24 saat gibi kısa bir süre sonra etkisini kaybetmektedir (Brunner ve ark, 2003).

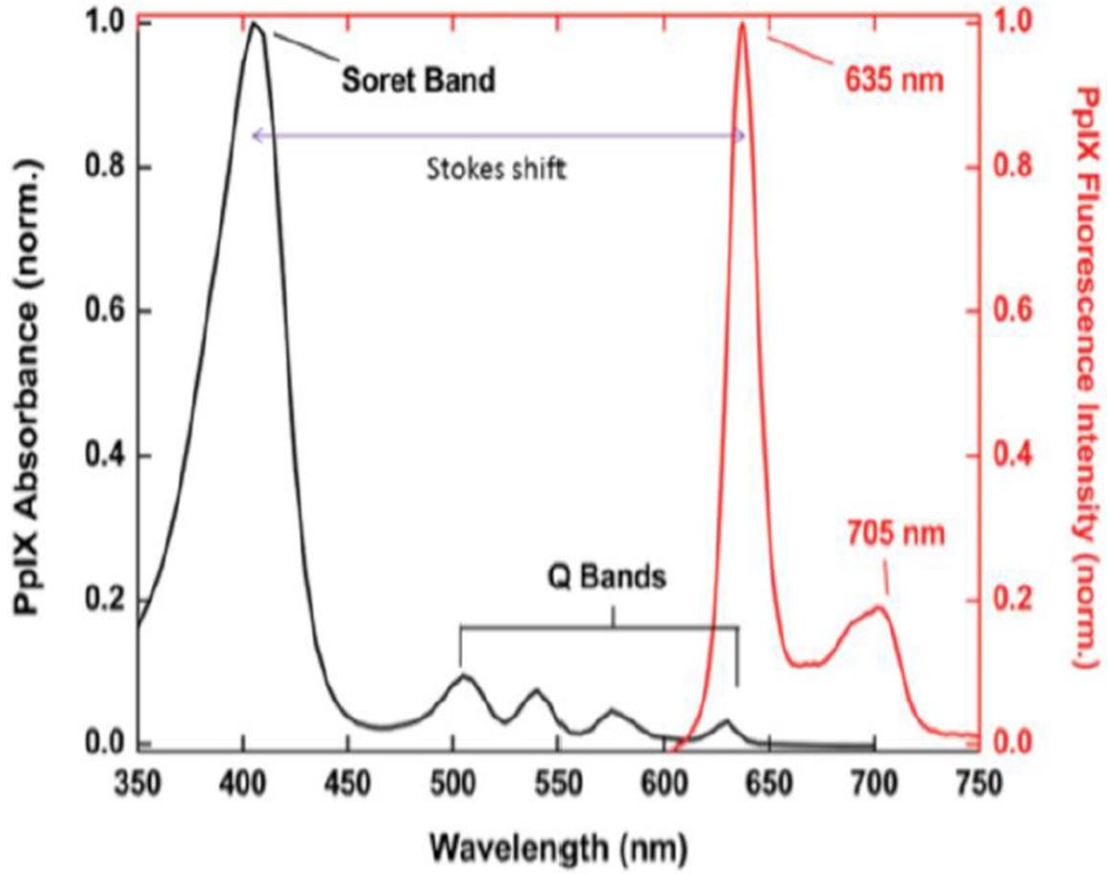


Şekil 12. 5-ALA'nın hücre içi mekanizması (Yang ve ark, 2015)



Şekil 13. 5-ALA'nın stratejisi (Yang ve ark, 2015)

5-ALA'yı uygulamanın stratejisi, PpIX sentezini arttırmak, PpIX dönüşümünü azaltmak ve PpIX çıkışını inhibe etmektir. Bu olayları sonucunda ise ortamda PpIX miktarını arttırılmış olur (Şekil 13). Hücre içinde çok fazla ve çok özel bir protoporfirin birikimi meydana gelmektedir. Şekil 8'de görüleceği üzere 5-aminolevulinik asit (5-ALA) hücrede mitokondri organelinin içine girer ve hücre sitoplazmasında 5-ALA porfobilinojene dönüşür. Porfobilinojen, porfobilinojen enzimi aracılığı ile üroporfobilinojene dönüşür ve üroporfobilinojen, ko-porfobilinojene dönüşerek hücrede mitokondri organeline girer ve burada PpIX'e dönüşür. Demir katalizi ile protoporfirin heme dönüşerek hemoglobine katılır. Protoporfirin mavi ışık ile uyarıldığında kırmızı flüoresans yaymaktadır (Sadako ve ark, 2016). Hücreye 5-aminolevulinik asit uygulamasından 3 saat sonra protoporfirin hücrenin mitokondri organelinde birikmeye başlamaktadır (Stummer ve ark, 1998). Protoporfirin uyarımı ve meydana gelen flüoresansı görebilmek için 375-440 nm arasında bir ışık kaynağı ve yayılan ışık için 440 nm uzun geçişli filtreler içeren flüoresans-ışık mikroskobu kullanılmaktadır. Bunu takiben PpIX ait flüoresans tepe değerleri 635 nm ve 705 nm olarak gözlenmektedir (Valentine ve ark, 2013) (Şekil 14).



Şekil 14. PpIX'in absorbans ve flüoresans yoğunlukları (Valentine ve ark, 2013)

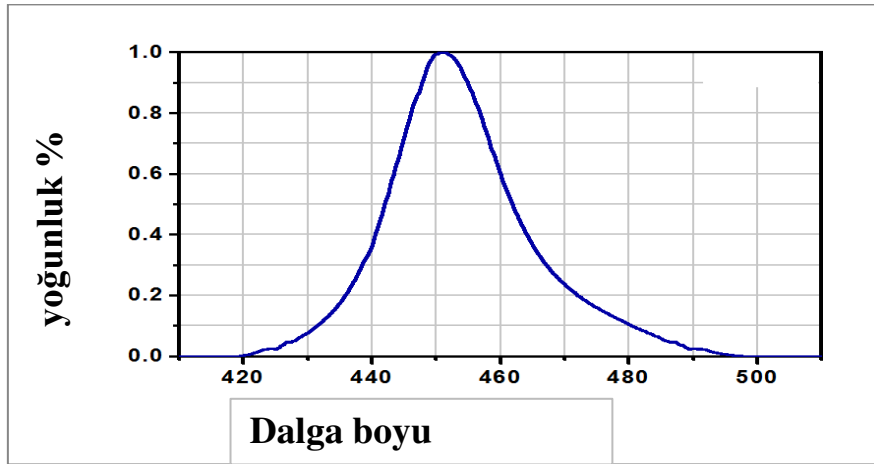
Protoporfirin ile gerçekleştirilen fotodinamik tanı ve tedavi, birçok kanser çeşidi için alternatif bir tedavi yöntemidir (Stylli ve ark,2005). Günümüzde bu yöntem; meme kanseri, overiyum kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri gibi kanser çeşitlerinin tanısında ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Jichlinski ve Jacqmin, 2008).

2.9.2. Hexaaminolüvenilik asit (HAL)

HAL'ın lokal biyo-uyumluluk, daha iyi stabilize olma, flüoresans yoğunluğunu arttırabilme ve daha homojen PpIX tutulumu ve dağılımı sağlama gibi özelliklerinin 5-ALA'den daha iyi olduğu bildirilmektedir.

2.10.Fotodinamik Tanıda Işık Kaynakları

Kullanılacak olan ışık kaynağının seçiminde 2 önemli faktör bulunmaktadır. İlki seçilen ışık kaynağı tedavi edilecek olan tabakaya ulaşmalıdır. İkincisi ise dalga boyunun PpIX'ın maksimum emilim spektrumuna göre seçilmelidir. Genel olarak bilinen, ışığın cilde nüfuz etmesi dalga boyuyla doğru orantılıdır. Örneğin, mavi ışık emilimi en yüzeysel, kırmızı ve kızılötesi derinliklerine nüfuz eder. PpIX'ın emilim eğrisinde maksimum değeri 405 nm'dir ve bu dalga boyunun ışık kaynağındaki karşılığı mavi ışık kaynağıdır (şekil 15). Bu dalga boyu PpIX'ı uyarmasına rağmen cilt içinde sadece minimal olarak nüfuz etmesi bunun en büyük dezavantajlarından biri olmaktadır. Diğer emilim pikleri olarak 510, 545, 580, 630 nm olarak bulunabilmektedir (Taub, 2004).



Şekil 15.Mavi ışık kaynağının spektrumu (Taub, 2004).

2.11.Fotodinamik Tanı Klinikte Kullanımı

Klinikte fotodinamik tanı 5 farklı amaçla kullanılmaktadır (Sieron ve ark, 2013): (1) Prekanseroz değişimleri erken dönemde tanıyarak kansere dönüşmesini önlemek; (2) Kanserli dokuları cerrahi olarak uzaklaştırmak için erken dönemde tanımak; (3) Nükseden kanserli dokuları tanımak ve kanser yayılmasını kontrol etmek; (4) Uygulanan kanser tedavisinin etkinliğini izlemek; (5) Kanser olasılığını dışlamak

Fotodinamik tanı klinikte birçok kanser tanısında kullanılmaktadır. Bunlar arasında bazal hücreli kanser, mesane kanseri, beyin kanserleri, servikal kanserler ve diğer kadın kanserleri, ve özefagus kanseri sayılabilir.

Bazal hücreli kanser: Yüzeysel bazal hücre kanserlerinin tanısında ve takibinde kullanılmaktadır. Fotodinamik tedavi öncesi bazal hücreli kanserler fotodinamik tanı yöntemi kullanarak işaretlenmektedir ve takiben tedavi edilmektedirler. Özellikle bazal hücre nevus sendromu tanısı almış olan hastaların derilerinde çok sayıdaki bazal hücreli kanserler bulunmaktadır. Prekanseröz bir hastalık olan aktinik keratöz ile bazal hücre kanserlerinin tanısında yüzeysel flüoresansın belirlenmesi tanıda prekanseröz ve kanserli hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Angell-Petersen ve ark, 2006).

Mesane Kanseri: Ürolojide en sık görülen kanser mesane kanseridir. Tanıda altın standart beyaz ışık sistoskopisi olmasına karşın son yıllarda mavi ışık altında kanser hücrelerinin kırmızı flüoresans verdikleri fotodinamik tanı yöntemi de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle hem beyaz hem de mavi ışık altında inceleme yapabilen sistoskopi sistemlerinin geliştirilmesiyle halen bazı teknik problemlere karşın giderek artan şekilde mesane kanserinde fotodinamik tanı kullanılmaktadır (Kutwin ve ark, 2017)

Beyin Kanseri: Fotodinamik tanı beyin operasyonları sırasında sağlıklı doku ile patolojik dokunun ayırımının yapılmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca metastaz yapan beyin tümörlerinin tanısında operasyon sırasında 5-ALA ile uyarılmış fotodinamik tedavi umut verici olduğu bildirilmiştir (Yagi ve ark, 2017)

Serviks kanseri ve kadın kanserleri: Servikal intraepitelyal kanserlerde, vulvar epitelyal kanserlerde, endometriosis hastalığında, meme ve over kanserlerinde fotodinamik tanının kullanılması araştırılmaktadır. Serviks kanserinde fotodinamik tanı yöntemiyle servikal yaymanın incelenmesi umut verici sonuçlar vermektedir. (Vaitkuviene ve ark, 2012).

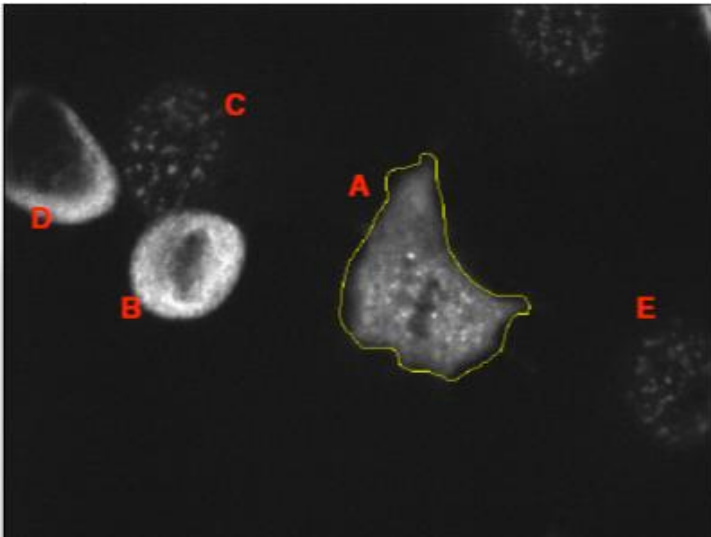
Özefagus kanseri: Barrett's özefagus hastalığının özefagus kanseri oluşturma riskine bulunmaktadır. Bu nedenle özellikle non-displastik Barrett's özefagusu low grade displazi içeren Barrett's özefagust hastalığının ayırmada fotodinamik tanı yüksek etkinliği sahiptir. Endlicher ve ark (2001) 5-ALA aracılı fotodinamik tanı ile Barrett's özefagusa ait düşük ve yüksek dereceli displazileri ayırt edebilmişlerdir.

2.12. İmage J

İmage J, Java tabanlı bir yazılımı olan bir programdır. Bu program ile 3 boyutlu canlı hücre veya doku görüntülenebilmektedir. Elde edilen görüntüler üzerinden görüntüler analiz edilebilir veya işlenebilmektedir. İmage J'nin 4 farklı özelliği bulunmaktadır. Bunlar, görüntülerdeki araştırılmak istenen 2 farklı noktaların arasındaki mesafelerin ölçülmesi, elde edilen görüntüler üzere ölçeklendirme yapılabilen, görüntü analizi-işleme-kaydetme veya yazdırma gibi fonksiyonlar kullanabilmekte, aynı anda birçok görüntüde işlem yapma olanağı sağlamaktadır (McCloy ve ark, 2014).

Elde edilen flüoresans görüntü üzerinde seçimler yapılarak hücrelerdeki veya dokulardaki flüoresans yoğunlukları analiz yapılabilmektedir (Şekil 16). Program görüntülerden seçilen alanların piksel değerleri üzerinden integrali alınmış yoğunluğu, seçilen alanın ortalama gri alan değerini ve seçilen bölgenin alanı sonucunu vermektedir (Şekil 17). Elde edilen verilerden CTCF değerleri excel programından hesaplanabilir (Şekil 18). CTCF değerleri bize seçilen bölgenin flüoresans yoğunluğunu vermektedir. CTCF değer hesaplaması:

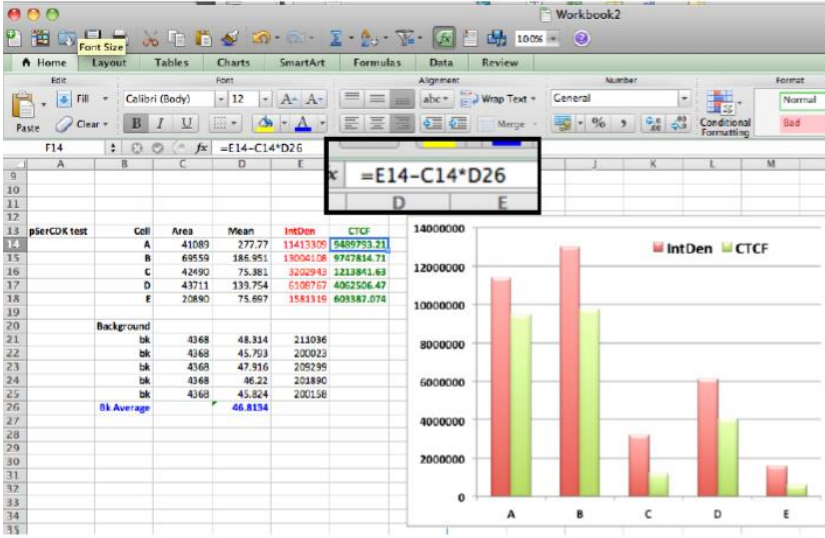
$$CTCF = \text{integrali alınmış yoğunluk} - (\text{Seçilen hücrenin ortalama alanı} \times \text{Hücre olmayan bölgenin alanı})$$



Şekil 16. İmage J de seçilen bölgeler (İmage J, 2011)

	Area	Mean	Min	Max	IntDen
1	41089	277.770	0	0	11413309
2	69559	186.951	0	0	13004108.000
3	42490	75.381	0	0	3202943.000
4	43711	139.754	0	0	6108767
5	20890	75.697	0	0	1581319
6	37515	46.251	0	0	1735109
7	4368	48.314	29	71	211036
8	4368	45.793	25	73	200023
9	4368	47.916	25	72	209299
10	4368	46.220	26	67	201890
11	4368	45.824	28	70	200158

Şekil 17. İmage j sonuç kutucuğu (İmage J, 2011)



Şekil 18. CTCF değerlerinin hesaplanması (İmage J, 2011)

2.13. Matlab

MATLAB programı, matematiksel hesaplamaların çözümü ve analizi için geliştirilmiş bir C tabanlı yazılım aracıdır. Birçok alanda kullanılabilmektedir. Özellikle mühendislik alanındaki sistemlerin analizinde kullanılan program ile veri elde etme, veri analizi inceleme, görsellik ve görüntü işleme, algoritma prototipi oluşturma ve geliştirme, modelleme ve simülasyon, programlama ve uygulama geliştirme gibi işlemler yapılabilmektedir. MATLAB

GUI geliştirme aracını kullanarak formlar veya butonlar gibi nesnelerden oluşan bir arayüz, görsel yazılımlar oluşturulabilmektedir. MATLAB görüntü işleme yapmak için sobel, hole filling, dilatation, imfill, imopen, imclose, imerode gibi birçok matematiksel fonksiyonlar içermektedir. Tüm matematiksel fonksiyonlara matlabworks'ün internet adresinden ulaşılabilir.



3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmamızda fotosensitif ajan olarak kullanılan 5-Aminolevünelik Asit (5-ALA) ve 5-ALA ile fotodinamik tanı uygulanan hücrelerin canlılığı tespit etmek için kullanılan, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) ticari yollardan Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. CellEvent caspase-3/7 yeşil ReadyProbes reaktifi, erken apoptoz analizinde kullanılmış ve Thermo Fisher Scientific firması tarafından tahsis edilmiştir

	Kolon kanseri hücre hattı	Mide kanseri hücre Hatları	
	HCT-116*	AGS*	MKN28**
Hastanın yaşı	48	54	70
Hastanın cinsiyeti	Erkek	Kadın	Erkek
Hastanın ırkı	Kafkasyalı	Kafkasyalı	Asyalı
İkiye katlanma Süresi (saat)	21	20	21
Morfoloji	Epitel	Epitel	Epitel
Kültür Özelliği	Yapışkan	Yapışkan	Yapışkan
Organ	Kolon	Mide	Mide
Hastalık	Kolon kanseri	Mide kanseri	Mide kanseri
Evre	Dukes'D	-	-
Elde edilmesi	Primer tümör	Primer tümör	Lenf nodülleri
Farklılaşması	Zayıf	Güçlü	Güçlü

* – bilgiler ATCC'den alındı.

Şekil 19. Kolon ve mide kanser hücre hatlarının karakteristik özellikleri

Yapılan çalışma da, kolon kanser hattı (HCT116), mide kanser hattı (MKN-28, AGS) kullanılmıştır. Kullanılan kanser hücre hatları Litvanya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sinir Bilimleri Enstitüsü Biyofizik ve Biyoinformatik Laboratuvarından temin edilmiştir. Hücrelerin karakteristik özellikleri Şekil 19 da gösterilmiştir. Kanser hücre hatlarının beyaz ışık altındaki mikroskop görüntüleri Resim 1'de görülebilmektedir



AGS hücre hattı

HCT116 hücre hattı

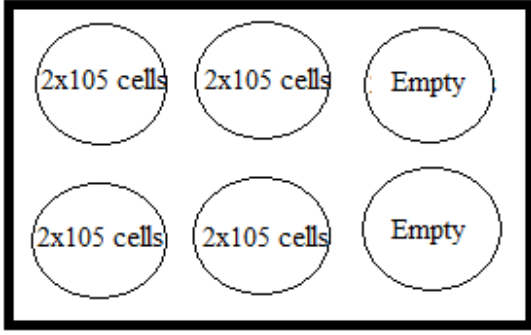
MKN28 hücre hattı

Resim 1. Mide ve Kolon hücre hatlarının beyaz ışık altındaki görüntüleri (x10)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Ekimi ve Çoğaltılması

Hücreler RPMI 1640 da çoğaltılmıştır. Bu ortam +4°C’de saklanmıştır. Ortam kullanılmadan yarım saat önce 37°C’deki su banyosuna alınmış ve daha sonra üzerine %10 oranına karşılık gelecek miktarda yani 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) eklenerek, toplam hacim 550 ml’ye tamamlanmıştır. Ortam içerisine %1 Glutamin (5,5 ml) ve kontaminasyonu önlemek amacıyla %1 Streptomisin-Penisilin (5,5 ml) antibiyotik karışımı eklenmiştir. Dondurulmuş olarak -80°C’de bulunan kanser hücre hatları (MKN-28, AGS, HCT-116), çalışmada kullanılmak üzere 37°C’lik su banyosunda 1-2 dakikada yavaşça çalkalanarak hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Tüp içeriği 15 ml’lik bir falkon tüpüne aktarılıp üzerine 4 ml ılık su banyosunda ısıtılmış kültür ortamı ilave edilmiştir ve 800 rpm’de oda sıcaklığında 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet yeni ılık kültür ortamında resüspanse edilip hücreler kültür 25 ve/veya 75 cm²’lik kültür kabına aktarılmıştır. Bu hücreler 37°C’de %5 CO₂ ve %96 nem içeren atmosferde çoğaltılmıştır. Kültür kabına hücreler 2. Pasajlamadan sonra hücre dizini 1 ml’de 200.000 (1 x 10⁵) hücre olacak şekilde 5 farklı 6 kuyucuklu kültür kabına aktarılıp çoğaltılmıştır (Şekil 20).



Şekil 20.Hücrelerin kültür kabına ekilmesi

3.2.2. Hücre sayımı

Platelerde bulunan hücrelerin üzerindeki besi yerleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Her bir plate 2 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler 4 dakika 37°C’de bekletildi. Daha sonra, platelerin içindeki içerikler 15 ml’lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 1 ml %10’luk PBS eklenerek tripsinin etkisi nötralize edilmiştir. Hücre süspansiyonları 800 rpm’de, 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atılarak her bir falkon tüpüne 1 ml besi yeri eklenmiştir. Hücreler tekrar süspanse edilmiştir. Her bir uygulama grubunda sayımlar 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde Thoma lamı ile gerçekleştirmiştir.

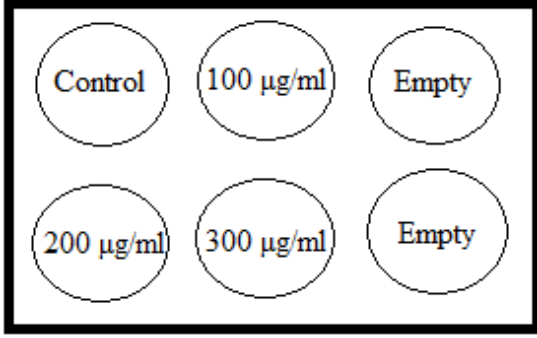
3.2.3. 5-ALA stok solüsyonun hazırlanışı

Öncelikle ajandan 2 ml’lik bir ependorfa 100 mM’lık stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti -20 derecede saklanmıştır. Stok solüsyon 5 gün içinde kullanılmıştır.

3.2.4. İn vitro Fotodinamik Tanı deneyi

Hazırlanmış olan 5-ALA stok solüsyonundan konsantrasyonu 0-300 µM (0,100; 200; 300 µM) olacak şekilde seyreltmeler yapılarak 3 farklı solüsyon karanlık bir ortamda 50 ml’lik falkonlara hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon falkonları ışık ile doğrudan temas etmemesi için alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Kolon (HCT-116) ve mide (MKN-28 ve AGS) kanser hücre hatları çoğaltıldıktan sonra 5-ALA hücre kültürüne eklenmiştir. Daha sonra kültür kapları alüminyum folyo ile sarılıp 0, 1, 2, 3 ve 5 saat olmak üzere 37°C’de

karanlıkta inkübe edilmiştir (Şekil 21). İnkübe edilen hücre grupları flüoresans mikroskobunda incelenmiştir.



Şekil 21. 5-ALA ile 0-1-2-3-5 saat inkübe edilen kültür kaplarının deney düzeneği

3.2.5.Hücre Görüntüleme

Hücrelerin faz kontrastlı görüntüleri 1392x1040 piksel çözünürlükte Q IMAGING EXI aqua kamerasıyla donatılmış ve OLYMPUS IX71 ışık mikroskobu kullanılarak alınmıştır (Resim 2).



Resim 2: OLYMPUS IX71 ışık mikroskobu

Görüntüler DAPI filtresi kullanılarak elde edilmiştir. Her pikselin 0,6 µm x 0,6 µm gerçek alanı temsil ettiği için x10 büyütme oranı kullanılmıştır. 5-ALA ile indüklenen hücre flüoresanının değerlendirilmesi için görüntüler rasgele seçilen alanlardan iki kez alındı. İlk görüntü, hücrelerin kapladığı alanı tespit etmek için parlak alan görüntüsü için ikinci görüntü ise uyarı lambası için 352-402 nm dalga boyu bant geçiren filtre kullanan flüoresans görüntüsü ve hücre görüntüleri için 410 nm 'den daha fazla dalga boyu için düşük geçiş görüntüsü içindir. Hücrelerin flüoresan yoğunluğu hücrelerin bulunduğu alanın ortalama piksel değerleri ile hücrelerin olmadığı alanın ortalama piksel değerleri arasındaki fark olarak hesaplanmıştır. İki alan MATLAB yazılım programı tarafından tespit edilmiştir.

3.2.6. Hücre canlılığının Değerlendirilmesi

5-ALA ile fotodinamik tanı uygulamasından 24 saat sonra hücre canlılığı analiz edilmiştir. Çözeltiye (5 mg / ml) 20 µl MTT ilave edildikten sonra hücreler, 37 ° C'de 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübe edilmesinin akabinde süpernatantlar ortamdan uzaklaştırılmış ve 100 µl olacak şekilde DMSO, formazan kristallerinin ekstraksiyonu için eklenmiştir. 15 dakika daha hücreler inkübe edildikten sonra hücre canlılığı ölçümleri yapılmıştır. Hücre canlılığı oranı, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Hücre canlılığı oranı (%) = muamele edilmiş hücrelerin değerleri x100 / kontrol hücrelerinin değerleri.

3.2.7. Erken Apoptoz analizi

Kaspaz 3/7, efektör kaspaz olarak rol oynamaktadır. Hücrelerdeki erken apoptoz sinyal yolağında ekspresi olmaktadır. Hücrelerdeki erken apoptoz, 5-ALA uygulamasında 5 saat inkübe edilen gruba uygulanarak mikroskopta analiz edilmiştir. Kaspaz 3/7 aktivitesi, üreticinin talimatlarına göre flüoresans mikroskobu (absorbsiyon / emisyon - 502/530 nm) ile belirlenmiştir.

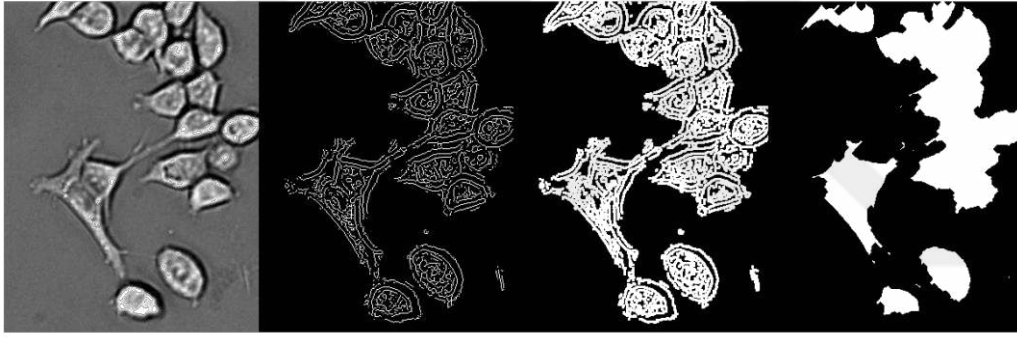
3.2.8. Hücre göçü

Hücre göçünün değerlendirilmesi için 50 µl olacak şekilde hücre ve medyum karışımına tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek 75 cm² kültür kaplarına aktarılmıştır. 24 ve 48 saat sonra

hücreler görüntülenmiştir. Time-lapse mikroskopunda incelenmeden önce örneklerden ölü hücreleri ayırmak için medyum ile yıkanmıştır. Kanser hücrelerin hareketleri 2-3 ve 13-14 pasajlamadan sonra incelenmiştir.

3.2.9. Hücrelerin bulunduğu alanları saptamak

Hücrelerin bulunduğu alanları, MathWork tarafından önerilen “modified image segmentation” algoritması kullanılarak tespit edilmiştir. Alanları belirlemek, gri tonlamalı görüntünün 2-yönlü türevinin hesaplanma fonksiyonu olan "Sobel" ile başlamıştır. Akabinde maske olarak kullanılan ikili görüntüyü sağlayan matematiksel morfoloji işlemleri "dilation", "hole filling" ve "eroding" fonksiyon işlemleri yapıldı (Şekil 22).



A

B

C

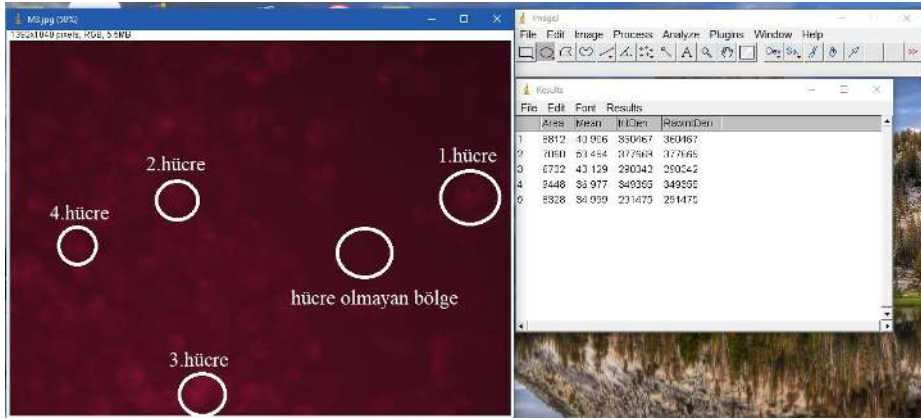
D

Şekil 22. Hücrelerin bulunduğu alan tespiti: "Sobel" operatörü kullanılarak hesaplanan, parlak alan görüntüsünün (A) iki yönlü türevi (B), "dilation" (C), "hole filling" ve "eroding" matematiksel morfoloji işlemleri kullanılarak işlenir. İşlem binary bir görüntü verir (D). Bu resimdeki beyaz alanlar hücreler tarafından kapsanan alanı ve siyah alanlar hücrelerin bulunmadığı alanları temsil eder.

3.2.10. Hücrelerin flüoresans yoğunlukları

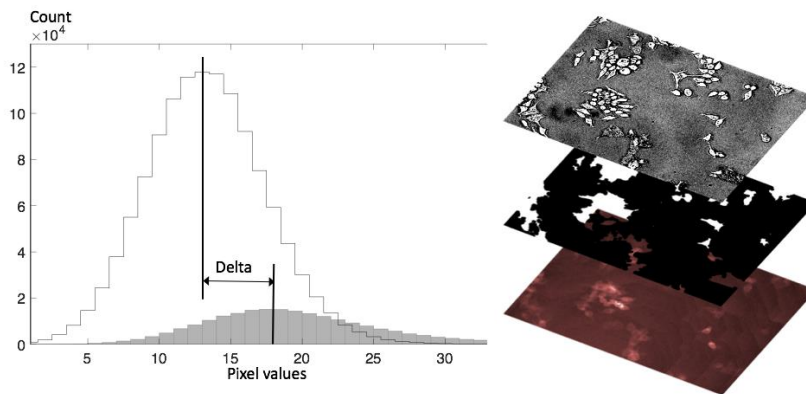
Hücrelerin flüoresans yoğunlukları İmage J programında analiz edilmiştir. İmage j programından integrali alınmış yoğunluk, seçilen hücrenin ortalama alanı ve hücre olmayan bölgenin alan değerleri elde edilmiştir (Şekil 23). Sonrasında CTCF değerleri hesaplanmıştır

(Gavet ve Pines, 2010). Tüm hücre hatları için elde edilen CTCF değerleri excel de karşılaştırma yapılmıştır



Şekil 23. Image j programında analiz

Aynı zamanda Matlab programında yazılan kod sayesinde hücrelerden elde edilen görüntülerin hücre olmayan ve hücre bulunan bölgelerdeki piksel hesaplamaları yapılarak karşılaştırılma yapılmıştır. Binary görüntüler, görüntüleri hücrelerin bulunduğu alanlar ve olmayan alanlar olmak üzere 2'ye ayırmak için kullanılmıştır. Hücreler tarafından kaplanan alanı ve hücrelerin olmayan alanlara ait piksel değerleri Şekil 24'de gösterilmektedir.

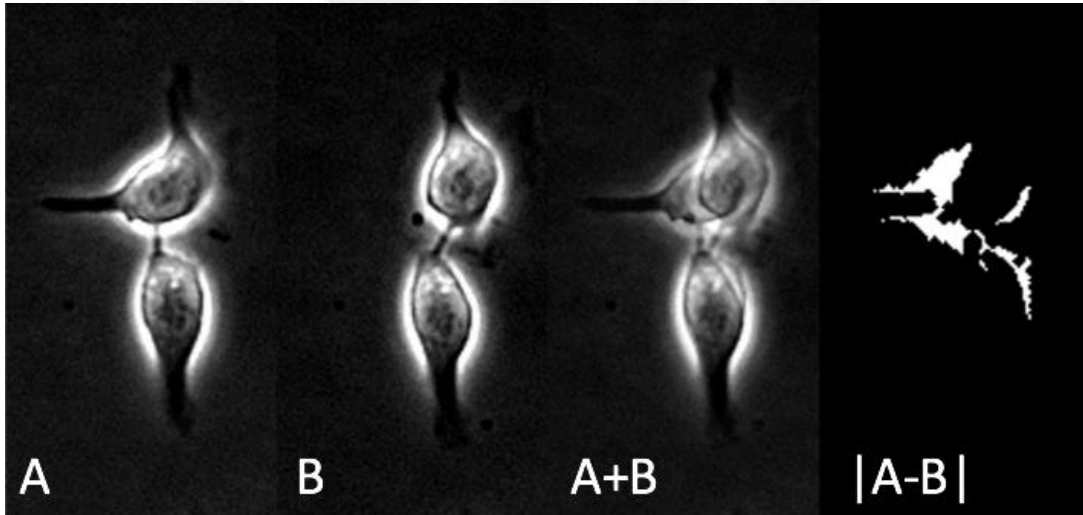


Şekil 24. Sol: Hücrelerin bulunduğu alanlara (gri alan) ve hücrelerin bulunmadığı alanlara ait piksel değerlerinin histogramları (açık renkli). Sağ: Görüntü ayırma ilkesi. Flüoresans görüntüsünün pikselleri (altta), matematiksel morfoloji işlemleri vasıtasıyla parlak alan

görüntüsünden (üstte) elde edilen binary görüntüye (orta) göre hücreler tarafından kaplanan alana ve arka plana göre sınıflandırılır.

3.2.11. Hücre hareketlerinin değerlendirilmesi

Çalışılan hücrelerin time-lapse hareketlerin görsel olarak incelenmesi ne amoeboide benzer göçler ile ne de toplum hücre hareketleriyle saptanabilir. Bu yüzden tekli hücre hareketlerini saptamak için MATLAB 'da yazılan bir kod yazılmıştır. Bir dizi gibi 3 saat boyunca her 30 saniyede 1 görüntüler alındı. Hücre hareketlerini farklı zamanlar içerisinde 2 farklı görüntü arasındaki mutlak değerler tarafından tespit edildi. Görüntülere filtre, threshold ve matematiksel morfoloji fonksiyonları olan "imopen" ve görüntüyü binary yapan ve sonucunda hücrenin olduğu yerleri 1, olmayan yerleri 0 yapan "imerode" kullanıldı. Şekil 25'de yapılan görüntü işlemler görülmektedir.



Şekil 25. Hücre hareketlerinin tespiti: Görüntü A'dan 4 dakika sonra elde edilen Görüntü B. A+B olan görüntü 2 ayrı görüntü arasındaki farkları ortaya koyar. 2 ayrı görüntü arasındaki mutlak fark olan $|A-B|$, filtreler ve matematiksel morfoloji fonksiyonları ile hücrelerinin hareketi görüldü.

Bir hücrenin hareketini tespit etmek için 3 saat boyunca görüntüler kaydedilerek saklanmıştır. Hücre hareketlerinin tahmini, tüm hücrelerin en az 3 saat boyunca ve aksi yönde hareket etmesi halinde bu durum 1'e yakın, eğer bu süre boyunca hiçbir hücre hareket etmez ise bu durumda sıfır olabileceği tahmin edilmiştir. Bu tahmin ise bize hücrelerin

hareketlerinin sayısını değil en az 1 kez hareket eden hücrelerin yüzdesini hakkında fikir vermiştir.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

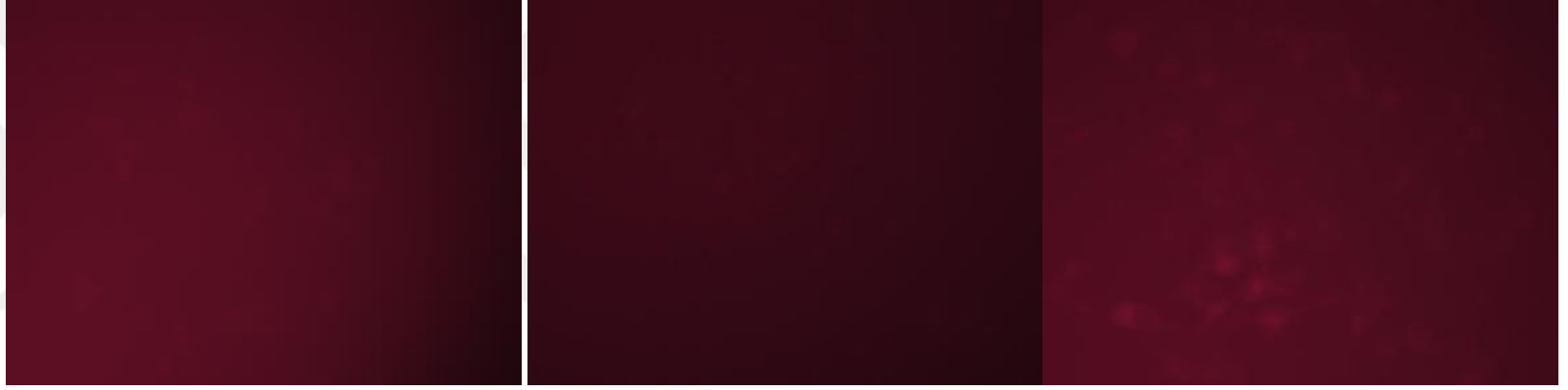
Bu yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen verilerin değerleri $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Tüm bulunan bulgulardaki değişimler karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan bu değişimlerin anlamlı olup olmadığını açıklayabilmek için istatistiksel olarak test edilmiştir. Bu değişimler SPSS versiyon 22 ile analiz edilmiştir. Bu kullanılan programda ANOVA 2 yönlü analiz ($p < 0.01$) ile tespit edildi. Kanser hücre hatlarının canlılık analizi karşılaştırmalarında istatistiksel analiz kullanılmıştır.

4.BULGULAR

Kolon ve mide kanser hücre hatlarına 3 farklı konsantrasyona 5-ALA ve 5 farklı inkübasyona maruz bırakıldı. Bu çalışma için hücreler 4 gruba ayrıldı. Bunlar; hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu, 100 µg/ml 5-ALA uygulanan grup, 200 µg/ml 5-ALA uygulanan grup ve 300 µg/ml 5-ALA uygulanan grup. Hazırlanan her hücre kültür kabı inkübasyon sürelerine göre 5 farklı gruba ayrıldı. Bunlar; hiç inkübasyona maruz kalmayan kontrol grubu, 1 saat inkübe edilen hücre grubu, 2 saat inkübe edilen hücre grubu, 3 saat inkübe edilen hücre grubu ve 5 saat inkübe edilen hücre grubudur.

4.1.Mikroskop Görüntüleri

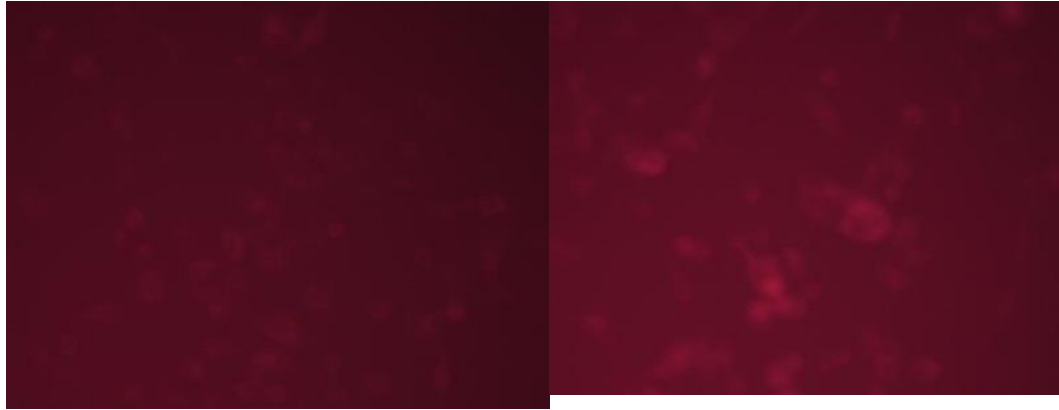
Hücre görüntüleri 1392x1040 piksel çözünürlükte Q IMAGING EXI aqua kamerasıyla donatılmış OLYMPUS IX71 ışık mikroskopunda DAPI filtresi kullanılarak elde edilmiştir. Her hücre hattının görüntüleri elde edilmiş ve saklanmıştır. Resim 3’de AGS hücre hattına 200 µg/ml 5-ALA uygulamasında 0, 1, 2, 3, 5 saat inkübe edildikten sonraki görüntüleri, Resim 4’de HCT116 hücre hattına 200 µg/ml 5-ALA uygulamasında 0, 1, 2, 3, 5 saat inkübe edildikten sonraki görüntüleri ve Resim 5’de MKN28 hücre hattına 200 µg/ml 5-ALA uygulamasında 0, 1, 2, 3, 5 saat inkübe edildikten sonraki görüntüleri görülmektedir. Hiç 5-ALA uygulanmayan grupta hiçbir flüoresans yoğunluğu bulunamamıştır. 100 µg/ml 5-ALA uygulamasında gözle görülür bir şekilde flüoresans yoğunluğu görülememiştir. 300 µg/ml 5-ALA uygulamasında ise hücrelerde gereğinden fazla flüoresans yoğunluğu görülmüştür. 5-ALA uygulamasından 5 saat sonra AGS, MKN28 ve HCT116 hücre hatlarında flüoresans yoğunluğu saptanmamıştır.



200 µg/ml 5-ALA uygulanmış inkübe edilmemiş görüntü

200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 1 saat inkübe edilmiş görüntü

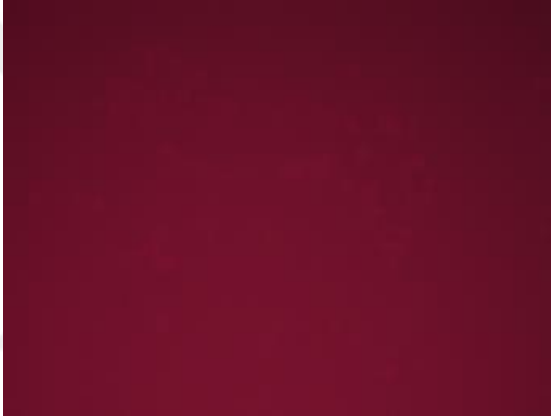
200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 2 saat inkübe edilmiş görüntü



200µg/ml 5-ALA uygulanmış 3 saat inkübe edilmiş görüntü

200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 5 saat inkübe edilmiş görüntü

Resim 3. 5-ALA uygulanmış ve mavi ışık altında bakılmış AGS hücre hattının mikroskopik görüntüleri (x10)



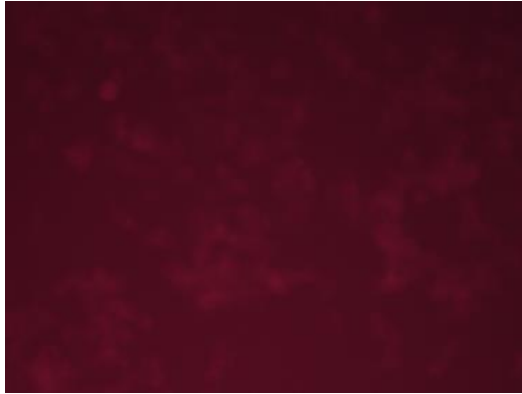
200 µg/ml 5-ALA uygulanmış inkübe edilmemiş görüntü



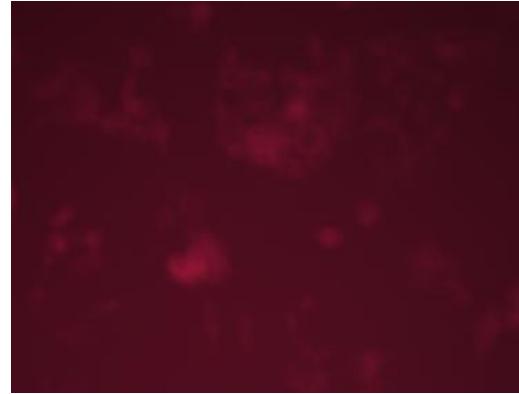
200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 1 saat inkübe edilmiş görüntü



200µg/ml 5-ALA uygulanmış 2 saat inkübe edilmiş görüntü



200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 3 saat inkübe edilmiş görüntü



200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 5 saat inkübe edilmiş görüntü

Resim 4. 5-ALA uygulanmış ve mavi ışık altında bakılmış HCT116 hücre hattının mikroskopik görüntüleri(x10)



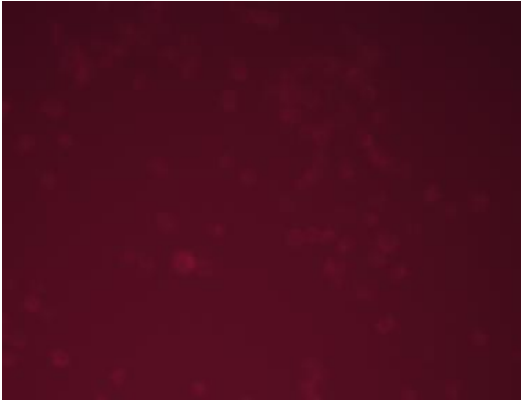
200 µg/ml 5-ALA uygulanmış inkübe edilmemiş



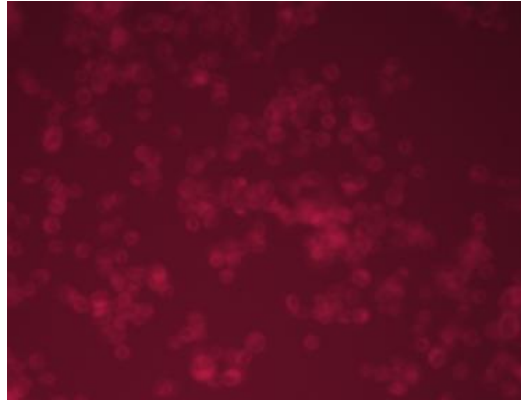
200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 1 saat inkübe edilmiş



200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 2 saat inkübe edilmiş



200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 3 saat inkübe edilmiş

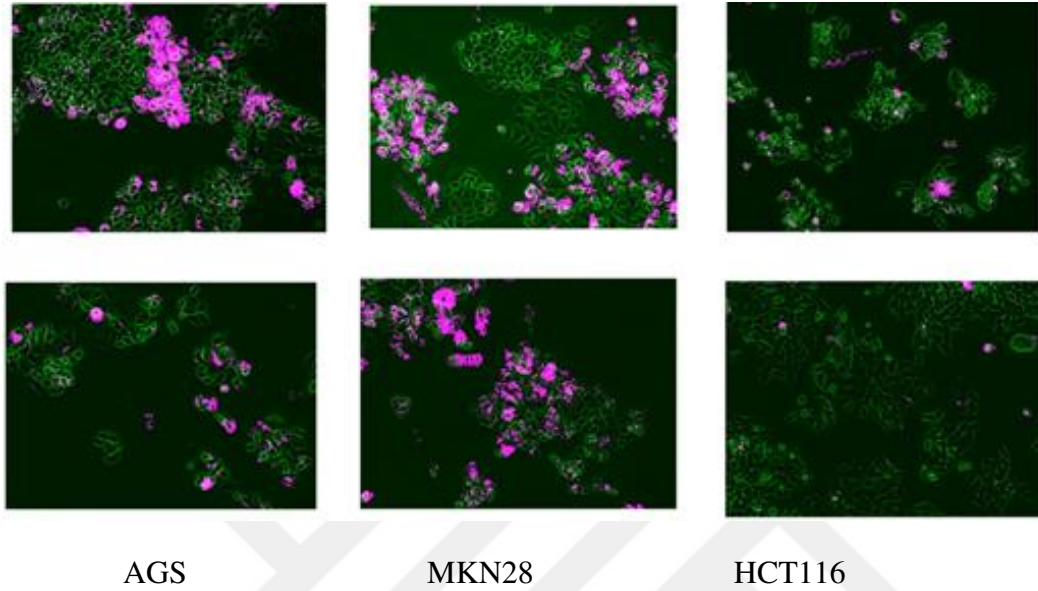


200 µg/ml 5-ALA uygulanmış 5 saat inkübe edilmiş

Resim 5. 5-ALA uygulanmış ve mavi ışık altında bakılmış MKN28 hücre hattının mikroskopik görüntüleri (x10)

4.2. Hücre Hatlarının Hareketlerinin Analizi

Hücre hareketlerinin analizi için MATLAB R2016a yazılım programı kullanılmıştır. Çalışılan her hücre hatları farklı yoğunluk ve farklı dağılımlar göstermiştir. Hücrelerin tipik dağılımları şekil 26’de görülmektedir.



Şekil 26. Farklı pasajlardaki hücre hareketleri: (AGS-sol, MKN-28 orta, HCT-116 sağ) üst satırdakiler 3.pasajlanma, alt satırdakiler 13.pasajlanma. Pembe renkliler hareketleri tespit edilmiş hücrelerdir.

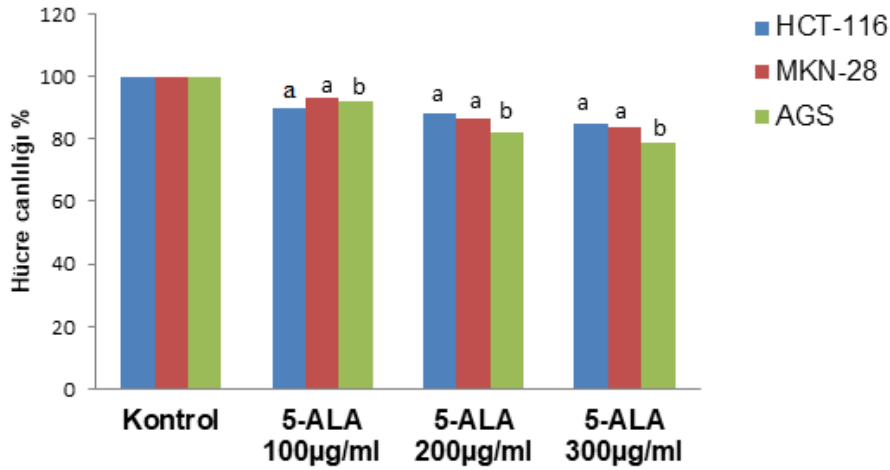
MKN-28 hücre hattı diğer hücrelere nazaran daha yüksek bir hücre hareketliliği göstermiştir. İlginç bir şekilde en çok hücre hareketleri gevşek bir şekilde dağılım göstermiş olan hücrelerde görülmüştür (Şekil 13 orta hat). Benzer bir durum aynı zamanda AGS hücre hatlarında da gözlemlenmiştir. Sadece HCT-116 hücre hatlarında çok seyrek bir hücre hareketi gözlemlenmiştir. 2. veya 3. Pasajlamalarda genel olarak hücrelerin hareket ettiği alanlarla hücrelerin bulunduğu alanların oranı MKN-28 hücre hattı için 0.35 (0.005 illa 0.80 arasında değişebilir.) AGS hücre hatları için 0.29 (0.07 illa 1.26 arasında değişebilir.) HCT-116 hücre hatları için ise 0.10 (0.008 illa 0.31 arasında değişir.) olduğu görülmüştür. 13. veya 14. Pasajlamalarda genel olarak ise hücre hareketlerinde daha az bir azalma görülmüştür. MKN-28 hücre hattı için 0.32 (0.01 illa 1.19 arasında değişir). AGS hücre hatları için 0.14 (0.01 illa 0.78 arasında değişir) ve HCT-116 hücre hattı için ise 0.01 (0.01 illa 0.05 arasında değişir) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Kanser hücrelerin hareket ettiği alanlarla hücrelerin bulunduğu alanların oranları

Hücre Pasajlama sayısı/ Hücre hatları	AGS	MKN28	HCT116
3. Pasajlama	0.29	0.35	0.10
13.pasajlama	0.14	0.32	0.01

4.3.Hücre Canlılığı Analizleri

5-ALA uygulaması, kanser hücre hatlarında farklı şekilde hücre canlılığına etki etmiştir. HCT-116 ve MKN-28 hücre hatları karşılaştırıldığı zaman AGS hücre hattında canlılığın büyük ölçüde düştüğünü gözlemlenmiştir. Elde edilen değerler Şekil 27’de görülmektedir. Farklı 5-ALA konsantrasyonunda farklı hücre hatlarındaki canlılığı ANOVA 2 yönlü analiz ($p<0.01$) ile tespit edildi. Post-hoc Tukey HSD testi AGS ve MKN-28 hücre hatlarının hücre canlılığı arasındaki farkın ($p=0.003$) ve AGS ve HCT-116 hücre hatlarının hücre canlılığı arasındaki farkın ($p=0.014$) önemli olduğunu göstermiştir. Ancak MKN-28 ve HCT-116 hücre hatlarının hücre canlılığı arasındaki farkın ($p=0.952$) önemli olmadığını da göstermiştir

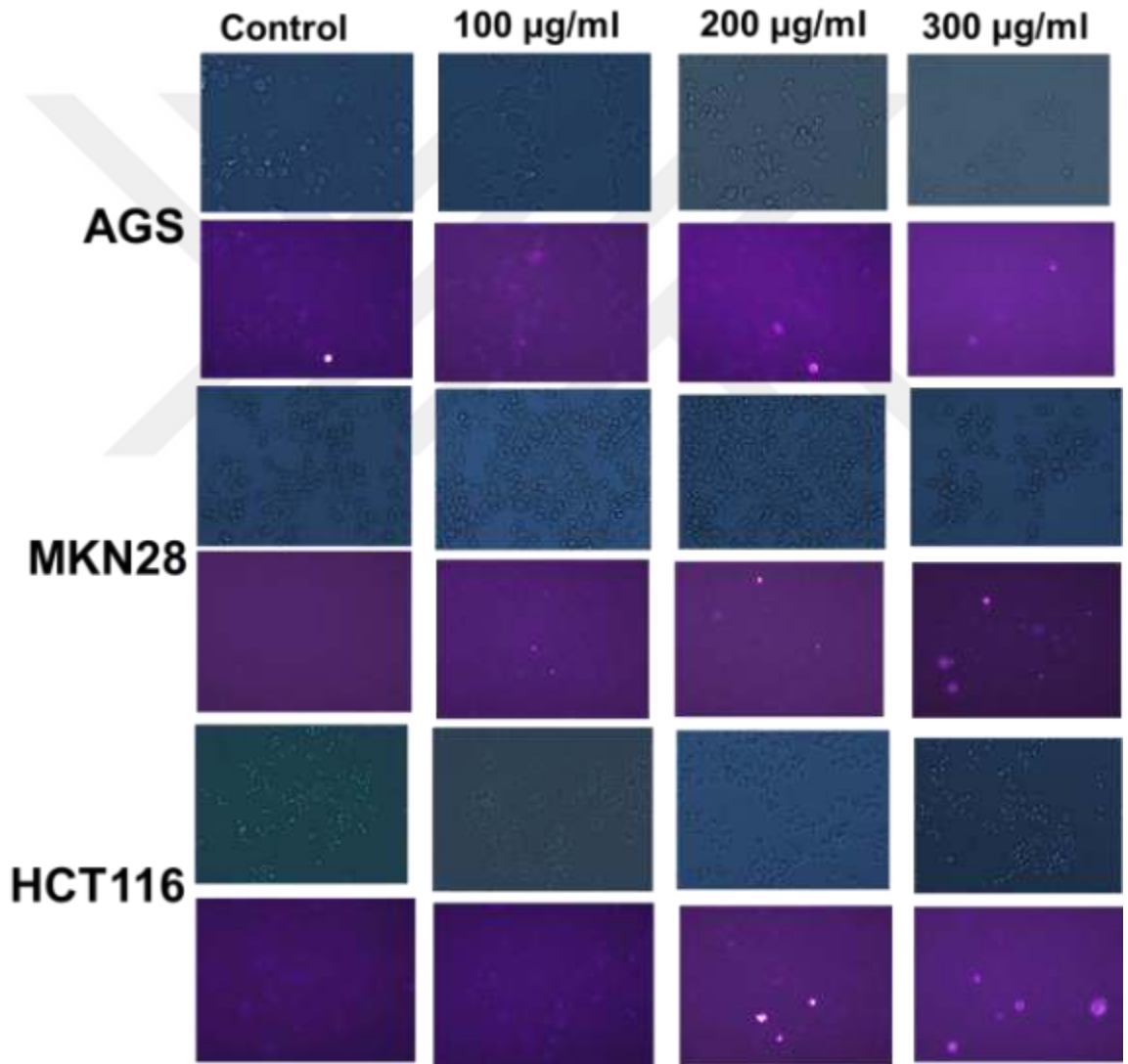


*; Farklı harfi taşıyan 5-ALA konsantrasyonları arasında istatistiksel anlamda fark vardır. Aynı harfi taşıyanlar arasında önemli bir farkın ($p=0.952$) olmadığı, farklı harfi taşıyanlar arasında ise önemli bir fark olduğunu göstermiştir.

Şekil 27. 5-ALA uygulanmış hücrelerde canlılık testi

4.4. Erken Apoptoz analizi

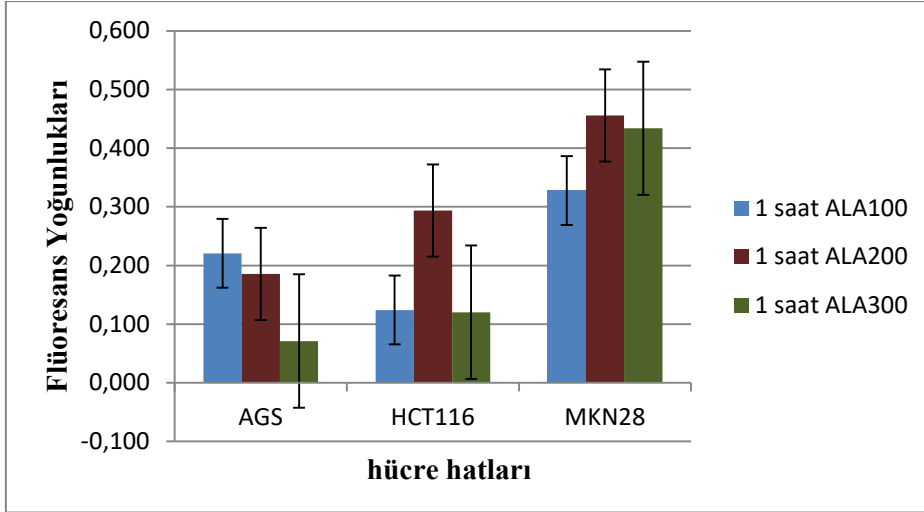
Mide ve kolon kanser hücre hatlarında, 300 µg/ml 5-ALA uygulanmasına takiben hücrelerin erken apoptoza gittiği belirlenmiştir (Şekil 28). Kanser hücre hatları karşılaştırıldığında 300 µg/ml 5-ALA uygulanan HCT116 kanser hücre hattının AGS ve MKN28 kanser hücre hatlarına göre erken apoptoza gittiği görülmüştür. Diğer 5-ALA konsantrasyonları olan 0, 100, 200 µg/ml dozlarının kanser hücre hatlarında belirgin erken apoptoz görülmediği saptanmıştır.



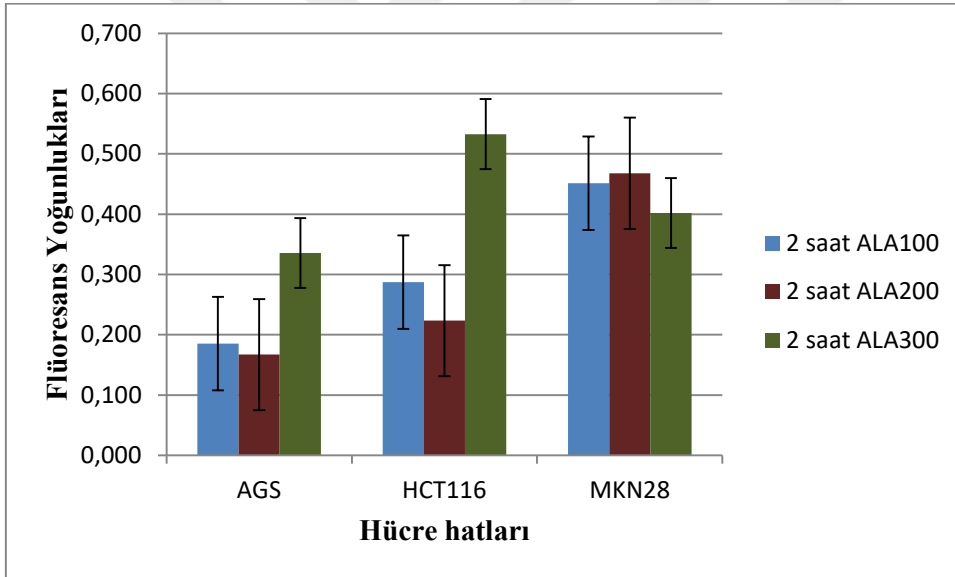
Şekil 28. 5-ALA uygulanmış hücrelerde erken apoptoz analizi (x10)

4.5. 5-ALA ile indüklenmiş hücre flüoresanları

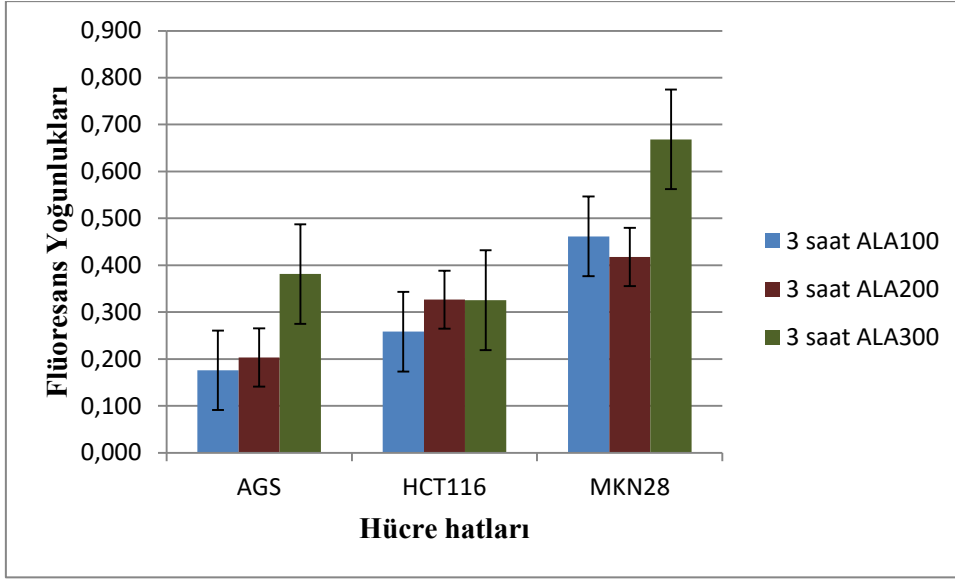
Farklı konsantrasyonlarda 5-ALA ile indüklenmiş hücrelerin flüoresanları uygulama zamanı ve süresi göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Tüm inkübasyon gruplarında bulunan kontrol grupları yani 5-ALA uygulanmayan gruplar 0 (sıfır) olarak kabul edilmiştir. 1 saat 5-ALA ile inkübe edilen kanser hücre hatları karşılaştırıldığında MKN28 (mide kanser hücre hattı) hücre hattında en fazla flüoresans yoğunluğu olduğu görülmüştür. En az flüoresans yoğunluğunun ise AGS (mide kanser hücre hattı) de olduğu saptanmıştır (Şekil 29). 2 saat 5-ALA inkübe edilen gruptaki hücre hatları ise en fazla flüoresans yoğunluğunun HCT116 (kolon kanseri hücre hattı) hücre dizini ve en az flüoresans yoğunluğunun AGS (mide kanser hücre hattı) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 30). 3 saat 5-ALA ile inkübe edilen hücreler de en fazla flüoresans yoğunluğunun MKN28 (mide kanser hücre hattı), en az flüoresans yoğunluğunun ise AGS (mide kanser hücre hattı) olduğu görülmüştür (Şekil 31). 5 saat 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin flüoresansları karşılaştırıldığında en fazla yoğunluk MKN28 (mide kanser hücre hattı) ve en az yoğunluk ise AGS (mide kanseri hücre hattı) olduğu belirlenmiştir (Şekil 32). Fakat tüm hücre hatlarında artan 5-ALA flüoresans yoğunlukları göz önüne alındığında 2 ve 3 saatlik inkübasyonlardaki hücrelerin flüoresanslarında daha fazla bir artış olduğu saptanmıştır. Farklı hücre tiplerinin flüoresansının mutlak değerleri ile arasındaki fark, 5-ALA uygulaması ile artmaktadır ve 5 saat sonra daha belirgin bir hale gelmiştir. Tüm hücre hatları arasında AGS hücre hattının flüoresansı 1 saat inkübeden sonra artma görülmüştür ancak 5 saat inkübeden sonra ise flüoresans da azalma görülmüştür. HCT116 hücre hattının flüoresansı 1 saat inkübeden sonra hızlı bir şekilde arttığını ancak 5 saat inkübeden sonra ise daha yoğun bir flüoresans yoğunluğu olduğu tespit edildi.



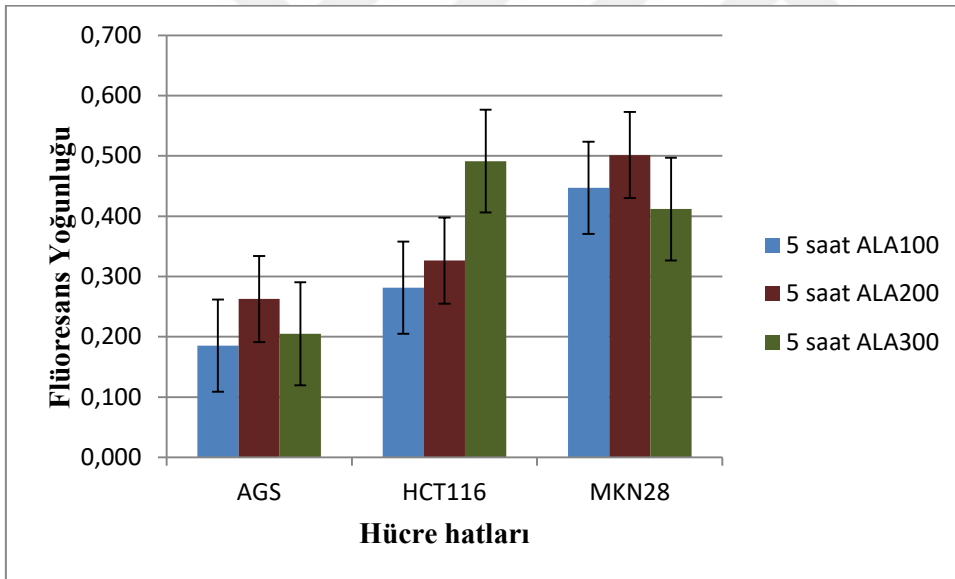
Şekil 29. 1 saat 100, 200 ve 300 μ M 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları



Şekil 30. 2 saat 100, 200 ve 300 μ M 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları



Şekil 31. 3 saat 100, 200 ve 300 μ M 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları



Şekil 32. 5 saat 100, 200 ve 300 μ M 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin flüoresans yoğunlukları

5.TARTIŞMA

Fotodinamik tanı neoplastik dokuları teşhis etmek amacıyla kullanılan çok duyarlı bir yöntemdir. 5-ALA ile uyarılmasıyla oluşan PPIX kanserli dokuda yoğun olarak depolanmaktadır. Fakat PpIX aynı zamanda hücre bölünmesinin fazla olduğu benign durumlarda da örneğin skar dokusu, inflamatuvar dokular, vb. birikmektedir. Bunun sonucu olarak yanlış pozitif görülme sıklığı artmaktadır. Bununla birlikte lezyon çevresindeki normal dokularda çok zayıf flüoresans bulunmaktadır. Bu bazal flüoresans ile kanserli dokularda oluşan patolojik flüoresans fotodinamik tanı ile kesin flüoresans hatları ile ayrılabilir.

Bu çalışmada; 5-ALA ile uyarılmış PpIX'un oluşturduğu flüoresans teşhisiyle mide ve kolon kanser hücrelerinin lokalizasyonu belirlenmiştir. Ayrıca FDT ile hücre göçü ve hücre hareketlerindeki değişiklikler gösterilmiştir.

Mide ve kanser çalışmalarında kullanılan kolon kanser hücre hatları sırasıyla HT29, HCT116, CCD18, SW948, SW620, SW480, SW1116, SW403, SW48, Caco2, iken mide kanser hücre hatları ise AGS, KATO3, MCIN87, SNU16, MKN28, SNU1 ve SNU5 olarak belirtilmiştir. Kanser hücre hatlarının listesi ATCC'nin internet sitesinden bulunabilmektedir.

Nemes ve ark (2016) çalışmasında hipofiz adenom hücre hatlarına 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µg/ml dozlarında 5-ALA uygulamışlar ve 6 saat sonra 200 µg/ml 5-ALA dozunun kanser hücrelerinde maksimum flüoresans gösterdiğini bildirmişlerdir. Hagiya ve ark (2013) 5-ALA'ya bağlı fotositotoksitenin insan mide kanser hücre hatlarında hücre canlılığına etkisini araştırıldığı çalışmada, MKN28 hücre hattında ALA için %50 inhibe edici konsantrasyonun (IC50) 400 µM olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada kanser hücre hatlarında fotositotoksiste göstermeyen fakat ayırt edici flüoresans gösteren 200µM 5-ALA dozu kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler de 5-ALA uygulanan ve ışık mikroskopunun mavi ışığına maruz kalan hücre hatları arasında en yüksek flüoresans yoğunluğunun 200 µM olan 5-ALA konsantrasyonunda 3 saat inkübasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Brunner ve ark.(2003) çalışmalarında, SW480, HT29, CaCo2 ve CCD18 hücre hatlarında fotodinamik tanı ve tedavi için düşük 5-ALA konsantrasyonu ve kısa inkübasyon süresinin (3 saat) yeterli olduğunu belirtmişlerdir ve ayrıca yüksek 5-ALA konsantrasyonunda hücreler için toksik etki gösterebileceğini bildirmişlerdir. Literatürdeki birçok çalışmalarda 3 saat 5-ALA inkübasyon süresinin optimum PpIX flüoresansı oluşması için uygun olduğu belirtilmiştir (Kushibiki,

2017; Hamad, 2010;) Bununla birlikte Nishimura ve ark (2016) insan ve fare çalışmalarında ağız yoluyla 5-ALA alımından 4 saat sonra, hepatosellüler kanser hücrelerinde PpIX'e ait kırmızı flüoresansı mikroskopik olarak gözlemişlerdir. Sonuçta farklı yollardan 5-ALA uygulaması 5-ALA'nın PpIX dönüşmesi için geçerli olan süreyi etkilemektedir. Bununla birlikte topikal ya da sistemik 5-ALA uygulaması sonucu kanserli hücrelerde çevresindeki normal hücrelere göre çok belirgin ve büyük PpIX flüoresansı gözlenmektedir (Regula, 1996).

Bu tezde HCT116, MKN28, AGS kanser hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda 5-ALA uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılığı testleri yapılmıştır. Hücre canlılığı testlerine göre 5-ALA uygulamasından AGS hücre hattının hücre canlılığı HCT116 ve MKN28 hücre hatlarına göre daha fazla düştüğü görülmüştür. Kawczyk-Krupka ve ark. (2016) SW480 ve SW620 olan kolon kanser hücre hatlarına 5-ALA uygulamasından sonra, flüoresans mikroskopundaki FITC, TRITC ve DAPI filtrelerini kullanarak hücrelerdeki flüoresans yoğunluklarını karşılaştırmışlardır; 5-ALA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca 5-ALA uygulamasına ek olarak hücrelere uygulanan artan ışık dozu yani uygulanan fotodinamik tedavi sonucu SW620 hücre hattının canlılığının SW480 hücre hattının canlılığına nazaran daha çok etkilendiğini belirtmişlerdir (Kawczyk-Krupka, 2016). Kontrol gruplarında (0 μ M ALA) hücre canlılığında değişiklik olmamıştır. Tezde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada 300 μ M 5-ALA konsantrasyonu uygulamasını 5 saat inkübasyon süresine takiben HCT116 hücre hattında erken apoptoz bulguları saptanırken, MKN28 hücre hattında daha az belirgin olarak erken apoptoz bulgular gözlenmiştir. Buna karşılık AGS hücre hattında erken apoptoz bulguları saptanmamıştır.

Miyata ve ark (2011), yaptıkları çalışmada cilt kanseri hücre hatlarında NEU3 ekspresyonunu ve kanser fenotiplerindeki rollerinin analiz etmişlerdir. Kantitatif RT-PCR, yüksek seviyelerde NEU3 geninin ifade edildiğini ortaya koymuşlardır. NEU3'ün aşırı ekspresyonunun etkilerini incelemek için, NEU3-CDNA transfeksiyon hücreleri, bir melanoma hücre hatları olan SK-MEL-28 ve bu hücre hatlarının mutantı olan N1 kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda NEU3'ün malign melanomalarda apoptozu yüksek oranda artırdığını göstermişlerdir.

HCT116, MKN28 ve AGS hücre hatlarına 5-ALA uygulamasından 1 saat sonra DAPI filtresi altında ışık mikroskopunda mavi ışık altında incelenen hücrelerde PpIX'e ait flüoresans gözlenmedi. Hücrelere 5-ALA uygulamasından 2 saat sonra mavi ışık altında

kırmızı flüoresans gözlenmeye başlandı. Bütün hücre hatlarında en belirgin flüoresans hücrelere 5-ALA uygulamasından 3 saat sonra gözlemlendi. Işık mikroskopunda mavi ışık altında 5-ALA uygulanmış hücre hatlarında farklı kırmızı flüoresans yoğunlukların olduğu saptandı. En fazla PpIX birikiminin MKN28 hücre hattında olduğu görülmüştür. Matsusaka ve ark (2014) yaptıkları çalışmalarda farklı kanser hücre hatlarında farklı flüoresans yoğunluklarının olduğunu bildirilmektedir ve bunun hücre içi PpIX konsantrasyonu farklılığından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Hagiya ve ark (2013) mide kanser hücrelerinde ALA-bağlı fotositotoksitenin hücre içi PpIX düzeyi ile ilişkili olduğunu bildirmişler ve 1 mM 5-ALA uygulanan MKN28 hücre hattında 4 saat sonra orta düzeyde hücre içi PpIX yerleşimi olduğunu göstermiştir. Bu gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları ile bu tez çalışmasının da gözlenen flüoresans düzeyleri arasında paralellik göstermiştir.

Khalil Ali ve ark (2011) 4 saat süreyle 5-ALA ile inkübe eden akciğer kanser hücre hatları (A549, Ma44-3, FT821) ve mezotelyum hücre hatlarının (MSTO-211H, NCI-H290, Y-MESO-14) flüoresans mikroskobu incelemesi sonucunda; akciğer kanser hücre hatları arasında A549 ve FT821 hücre hatlarının flüoresanslarının Ma44-3 hücre hattının flüoresansına nazaran daha güçlü ve yüksek olduğu ile mezotelyum hücre hatları arasında ise MSTO-211H ve NCI-H290 hücre hatlarından Y-MESO-14 hücre hattına göre daha yüksek bir flüoresansının olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada hücre hatlarının flüoresanslarının ortam koşullarına, hücre boyutuna ve şekline, ferroşelataz aktivitesine bağlı olduklarını iddia etmektedirler (Khalil Ali, 2011). Tez çalışması sonuçlarında, Kahalil Ali ve ark çalışma sonuçlarına benzerlik gösteren bulgular belirlenmiştir ve farklı hücre hatlarının farklı flüoresans yoğunluklarının olduğu görülmüştür.

Kondo ve ark (2009) insan kolorektal kanser tanısında 5-ALA uygulanan hastalarda PpIX birikimini mavi ışık altında kırmızı flüoresans olarak belirlemişlerdir ve beyaz ışık uygulamasının kanserli hücrelerde herhangi bir flüoresans vermediğini gözlemişlerdir. Benzer şekilde yapılan çalışmada da mavi ışığa maruz bırakılan 5-ALA ile uyarılmış kanser hücre hatlarında kırmızı flüoresans gözlenmiştir. Beyaz ışık altında 5-ALA uygulanmış kanser hücre hatlarında herhangi bir flüoresans yoğunluğu tespit edilememiştir.

Nakanishi ve ark (2015) kolon kanser hatları (LS180 ve CACO-2), mesane kanser hattı (T24), meme kanser hattı (MCF-7), prostat kanser hatları (DU145 ve LNCaP), yumurtalık kanser hattı (A2780), pankreas kanser hattı (AsPC1) ve lösemi hatlarına (K562 ve U937) gerçekleştirdikleri çalışmada mavi ışık altında PpIX birikiminin uygulanan 5-ALA

konsantrasyonuna ve hücre hattına göre değiştiğini belirtmişlerdir. Bu hücre içi PpIX birikimi ALA'nın PpIX'e çevirimi, ferroşelataz aktivitesi ve aktif olarak hücre dışına PpIX sızıntısı arasındaki dengeye bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tez çalışmasında da konsantrasyon ve inkübasyon değişimleri ile hücre hattı farklılıklarına bağlı PpIX birikimlerinin farklı olduğu gözlenmiştir.

Hücre göçü, hücrenin fizyolojik fonksiyonları için gerekli bir özelliktir. Bu özellik kanser hücrelerinin stromaya yayılımı ve metastazında da rol oynamaktadır (Friedl ve Gilmour, 2009). Clark ve Vignjevic (2015) her bir farklı kanser hücre hatlarının farklı hücre göçü hızları olduğu bildirmiştir. Tezde AGS, MKN28 ve HCT116 hücre hatlarının her birinin pasajlamaya bağlı olarak farklı hücre hareketlerine ve hücre göç hızına sahip oldukları görülmüştür. Pasajlama sayılarına göre hücreler karşılaştırıldığında 13. ve 14. pasajlamalardaki hücre hareketlilikleri 2. ve 3. pasajlamalardaki hücre hareketliliklerine nazaran daha az olduğu belirlenmiştir. Hücre kültürü süresince hücrelerin hareketliliklerinin sabit olmadığı gözlenmiştir. MKN28 hücrelerinde en yüksek hareketlilik, AGS hücrelerinde orta düzeyde hareketlilik ve HCT116 hücrelerinde ise en düşük hareketlilik gözlenmiştir. Clark ve Vignjevic (2015) tümör mikro çevresinin, özellikle stromadaki yerleşiminin, tümör göçünün biçimini ve dinamiğini etkilediği belirtmişlerdir ve farklı tümör hücrelerinin farklı yollardan ve hızlarda hareket edebileceğini bildirmişlerdir. Kanser hücrelerinin dokulardaki göçünde adezyon, proteaz ve sitokin sistemleri rol aldığını ve hücre hatlarına spesifik çeşitli onkojenik faktörlerin de hücre göçüne etkili olduğunu göstermişlerdir (Friedl ve Alexander, 2011).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

5-ALA ile aracılı fotodinamik tanı klinikte birçok kanserin erken teşhisinde giderek artan duyarlılıkta kullanılmaya başlanmıştır. Gastrointestinal kanserlerden mide ve kolon kanserlerinin mortalitesi günümüzde giderek artmaktadır ve bu kanserlerin erken tanısında fotodinamik tanı alternatif bir yöntem olabilecektir.

Bu çalışma ile, gastrointestinal kanserlerin tanısında kullanılmak üzere yapılması planlanan fotodinamik tanı cihazı için optimum 5-ALA konsantrasyonun 200 µg/ml ve ALA ile uyarılmış PpIX için gözlenebilir flüoresans için gereken optimum inkübasyon süresinin ise 3 saat olduğu saptanmıştır.

Farklı kanser hücre hatlarında 5-ALA ile uyarılmış PpIX birikiminin hücre canlılığını aynı etkilemediği gösterilmiştir. Hücrelerde PpIX birikmesi HCT-116 ve MKN-28 kanser hücre hatlarında hücre canlılığını fazla etkilemezken; AGS hücre hattında canlılığın büyük ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

HCT116, MKN28 ve AGS kanser hücre hatlarında, hücre pasajlamasının kanser hücre hatlarının hareketliliği üzerinde etki ettiği ilk kez gösterilmiştir. 2. ve 3. pasajlamalardaki kanser hücrelerinde daha yüksek bir hücre hareketliliği gözlemlenirken 13. ve 14. pasajlamalardaki kanser hücrelerinde daha düşük bir hücre hareketliliği gözlenmiştir. En yüksek hücre hareketlerinin MKN-28 hücre hattında, en düşük hücre hareketinin ise HCT116 hücre hattında olduğu belirlenmiştir.

5-ALA uygulamasından sonra erken apoptoz analizi yapılan kanser hücre hatları karşılaştırıldığında HCT116 kanser hücre hatlarının AGS ve MKN28 kanser hücre hatlarına nazaran daha belirgin erken apoptoza gittiği belirlenmiştir.

HCT116, MKN28 ve AGS kanser hücre hatlarında 0, 100, 200 ve 300 µM konsantrasyonlarda 5-ALA uygulamasını takiben 1 saat sonra mavi ışık altında yapılan flüoresans mikroskopik incelemede belirgin bir flüoresans gözlenmemiştir. Fakat 2 veya 3 saatlik 5-ALA inkübasyonunu takiben tüm hücre hatlarında 5-ALA konsantrasyonuna bağlı olarak artan flüoresans yoğunlukları saptanmıştır. Bununla birlikte 5 saatlik 5-ALA inkübasyondan sonra, hücrelerinin flüoresanslarında azalma olduğu ve PpIX'in hücrelerdeki etkisinin azaldığı saptanmıştır.

Çalışmanın sınırlılıklarından biri 5-ALA ile indüklenen flüoresans ve hücre hareketliliğini aynı anda kaydetme imkânı bulunamamış olmasıdır. 5-ALA ile uyarılmış PpIX'ın hücrelerde mitokondride biriktiği literatürde bildirilmesine karşın, bu çalışmada PpIX'ın HCT116, MKN28 ve AGS kanser hücre hatlarında hangi hücre organelinde biriktiği gösterilmemiş olması ikinci bir sınırlılıktır.

Bu çalışma gastrointestinal tümörlerin flüoresans farklılıklarına bağlı olarak saptanması için fotosensitif ajan konsantrasyonu ve hücrelerin maruz kalacağı inkübasyon süresi gibi bazı temel parametreleri açıklamıştır. Bu parametreler kullanılarak kanser hücresi ile çevresindeki normal doku ayırımına gidebilecek flüoresans tanı problemleri geliştirilmesi gelecek çalışmaların konusu olabilecektir. Ayrıca gelecek araştırmalarda *in vitro* ortamda gerçekleşen bu çalışmaların deney hayvanları ve/veya insanlarda uygulanmasıyla klinikte hastalara uygulanacak 5-ALA aracılı fotodinamik tanı parametreleri belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

- Almerie M Q, Gossedge G, Wright K, Jayne D,** Photodynamic diagnosis for detection of peritoneal carcinomatosis, *J Surg Res.*, 2015; 195(1):175-87
- Angell-Petersen E, Sorensen E, Warloe T, Soler M, Moan J, Peng Q, Giercksky K,** Porphyrin Formation in Actinic Keratosis and Basal Cell Carcinoma after Topical Application of Methyl 5-Aminolevulinate, *Journal of Investigative Dermatology*, 2006, 126, 265–271.
- Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM,** Photodynamic therapy in dermatology, *European Journal of Dermatology*, 2006, 340–348,
- Baumgarner R, Huber R.M, Schulz H, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth C,** Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996,
- Başoğlu H,** Protoporfirin Yüklü Manyetolipozomların Biyofiziksel Karakterizasyonu, ADÜ SBE Doktora Tezi, 2014
- Beeharry MK, Liu WT, Yan M, Zhu ZG.** New blood markers detection technology: A leap in the diagnosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(3):1202-12
- Bilgin MD, Elçin AE, Elçin YM.** Topical use of liposomal copper palmitate formulation blocks porphyrin-induced photosensitivity in rats, *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2005;80:291-296.
- Bilgin MD, Bozkurt-Girit Ö,** Elektromanyetik Dalgalar, Biyofizik Ders Notları, Aydın, 2017, 1- 73
- Boyle P, Langman JS.** ABC of colorectal cancer: Epidemiology, *BMJ*, 2000;321(7264):805-8.
- Bozzini G, Colin P, Betrouni S, Maurage C.A, Leroy X, Simonin S, Martin-Schmitt C, Villers A, Mordon S.** Efficiency of 5-ALA mediated photodynamic therapy on hypoxic prostate cancer: A preclinical study on the Dunning R3327-AT2 rat tumor model, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013.
- Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM.** The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 214(3):248-57
- Brunner H, Hausmann F, Knuechel R,** New 5-Aminolevulinic Acid Esters—Efficient Protoporphyrin Precursors for Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 78(5): 481–486

Campbell N, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Reece J, Biology (11.baskı), Palme yayıncılık, 2017,Ankara

Chang-Liu CM, Woloschak GE. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett.* 1997, 26;113(1-2):77-86.

Clark AG, Vignjevic DM, Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.*, 2015.

Demay SDJ, Sharma K, Sapra S, Sapra P, Daylight-Mediated Photodynamic Therapy With Methyl Aminolevulinate in Actinic Keratosis Treatment, *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2018.

Endlicher E1, Knuechel R, Hauser T, Szeimies RM, Schölmerich J, Messmann H. Endoscopic fluorescence detection of low and high grade dysplasia in Barrett's oesophagus using systemic or local 5-aminolaevulinic acid sensitisation, *Gut*, 2001, 48(3):314-9.

Friedl P, Alexander S, *Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity*, Elsevier, 2011,

Friedl P, Gilmour D, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer, *Nat Rev Mol Cell Bio.*, 2009, 10:445-457.

Friberg S, Mattson S. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *J Surg Oncol* 1997; 65:284–97.

Gaál M, *Photodynamic Therapy And Fluorescence Diagnosis Of Nonmelanoma Skin Cancer*, 2012.

Gavet O & Pines J, Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*, 2010, 18: 533-543

Grossweiner L, Light dosimetry model for photodynamic therapy treatment planning, *lasers in surgery and medicine*, 2005, 165:173.

Hagiya Y, Hirano T, Fukuhara H, Inoue K, Shuin T, Matsumoto K, Inoue K, Tanaka T, Okura I, Ogura S, Improvement of aminolevulinic acid (ALA)-mediated photodynamic diagnosis using n-propyl gallate, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013,

Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Inoue K, Nakajima K, Otsuji E, Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells, *Oncology Reports*, 2013,29: 911-916

Hersényi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010;14(4):249-58.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*,2011;61(2):69–90.

Jichlinski P, Jacqmin D, Photodynamic Diagnosis in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer, *European Urology Supplements*, 2008, 529–535,

Jocham D, Stepp H, Waidelich R, Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art, *European Urology* 53, 2008, 1138–1150

Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S, Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications, *Clinical and Translational Oncology*, 2008, 10, 148–154

Kapan M, Mide kanseri. Tanı ve cerrahi tedavi. Gastrointestinal sistem hastalıkları sempozyumu. 11 -12 Ocak 2001, İstanbul, sayfa 253-269.

Kawczyk-Krupka A, Latos W, Latos M, Czubac ZP, Siero A, ALA-induced photodynamic effect on viability, apoptosis and secretion of S100 protein, secreted by colon cancer cells in vitro, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 15 ,2016, 218–227

Khalil Ali H.A, Takizawa H, Kondob K, Matsuoka H, Tobac H, Nakagawa Y, Kenzaki K, Sakiyama S, Kakiuchi S, Sekido Y, Soned S, Tangoku A, 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor, *Lung Cancer*, Volume 74, Issue 1,2011.

Kim S, Cho D, Kim J, Kim M, Youn S, Jang J, Je M, Lee D, Lee B, Farkas D, Hwang Y, Smartphone-based multispectral imaging: system development and potential for mobile skin diagnosis, *Biomedical Optics Express*, 2016, 10,1364.

Kitada M, Ohsaki Y, Matsuda Y, Hayashi S, Ishibashi K, Photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and intrinsic fluorescence observation systems, *BMC Cancer*, 2015, 15:174

Koizumi N, Harada Y, Minamikawa T, Tanaka H, Otsuji E, Takamatsu T, Recent advances in photodynamic diagnosis of gastric cancer using 5-aminolevulinic acid, *World J Gastroenterol*, 2016; 22(3): 1289-1296

Kolenc OI, Quinn KP, Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD, *Antioxid Redox Signal*, 2018,

Kondo K, Takizawa H, Toba H, Kenzaki K, Sakiyama S, Tangoku A, Fluorescence diagnosis of lymph node metastasis of lung cancer in mouse model. *Oncol Rep*, 2009;22:17–21.

Kulyka O, Ibbotson S, Moseley H, Valentine R, Development of a handheld fluorescence imaging device to investigate the characteristics of protoporphyrin IX fluorescence in healthy and diseased skin, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 12, 2015, 630–639

Kutwin P, Konecki T, Cichocki M, Falkowski P, Jablonowski Z, Photodynamic Diagnosis and Narrow-Band Imaging in the Management of Bladder Cancer: A Review, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2017, 35(9): 459-464

Laranjo M, Serrac A.C, Abrantesa M, Piñeiro M, Gonçalves A.C, Casalta-Lopesa J, Carvalhob L, Sarmento-Ribeirob A, Rocha-Gonsalves A, Botelho F, 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013, 10, 51—61

Löning M, Diddens H, Küpker W, Diedrich K, Hüttmann G, Laparoscopic Fluorescence Detection of Ovarian Carcinoma Metastases Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX, *American Cancer Society*, 2004, 10, 1002/cncr.20155.

Matsusaka S, Kozuka M, Takagi H, Ito H, Minowa S, Hirai M, Hatake K. A novel detection strategy for living circulating tumor cells using 5-aminolevulinic acid. *Cancer Lett.* 2014, 1;355(1):113-20

Kumar V, Abbas A, Aster J, Robbins basic, *Pathology* (10.bask1), Elsevier, 2018

MatlabWorks, <https://www.mathworks.com/help>(2017).

Mereiter S, Balmaña M, Gomes J, Magalhães A, Reis CA. Glycomic Approaches for the Discovery of Targets in Gastrointestinal Cancer. *Front Oncol.* 2016;6:55.

Michael J. Colditz, Karin V.L., Rosalind L. Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: Theoretical, biochemical and practical aspects, *Journal of Clinical Neuroscience*, 2012

Miyata M, Kambe M, Tajima O, Moriya S, Sawaki H, Hotta H, Kondo Y, Narimatsu H, Miyagi T, Furukawa K, Furukawa K, Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides, *Japanese Cancer Association*, 2011

Moraes M, Vasconcelos R, Figueiró Longo J, Muehlmann LA, Azevedo R, Moura Lemos T, Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015

Nakanishi T, Ogawa T, Yanagihara C, Tamai I, Kinetic Evaluation of Determinant Factors for Cellular Accumulation of Protoporphyrin IX Induced by External 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Cancer Therapy, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism, 2015.

Nemes A, Fortmann T, Poeschke S, Greve B, Prevedello D, 5-ALA Fluorescence in Native Pituitary Adenoma Cell Lines: Resection Control and Basis for Photodynamic Therapy (PDT), Plos one, 2016

Nokes B, Apel M, Jones C, Brown G, Lang J, FACS Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications, World J Gastroenterol. 2015; 21(29): 8769-8775

Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. Nature Biotechnol. 2005;23:313–320.

Oruba Z, Łabuz P, Macyk W, Chomyszyn-Gajewska M, Antimicrobial photodynamic therapy A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2015,

Parihar A, Dube A, Gupta P, Photodynamic treatment of oral squamous cell carcinoma in hamster cheek pouch model using chlorin P6-histamine conjugate, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013,

Regula J, Ravi B, Buonaccorsi GA, Sensitization and photodynamic therapy of normal pancreas, duodenum and bile ducts in the hamster using 5-aminolaevulinic acid. Lasers Med Sci 1996; 11:11-21

Rossi R, Buggiani G, Troiano M, Lotti T., Photodynamic therapy: off-label and alternative use in dermatological practice, Photodiagnosis Photodyn Ther. 2008.

Siegel R, DeSantis C, Jemal A, Colorectal Cancer Statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 10,3322/caac.21220

Spikes JD, The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences. In Primary Photoprocesses in Biology and Medicine, 1985, 209–227.

Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kieffmann R, Reulen HJ. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. Neurosurgery. 1998, 42(3):518–526.

Stylli S, Kaye H, MacGregor L, Howes M, Rajendra P, Photodynamic therapy of high grade glioma – long term survival, Journal of Clinical Neuroscience, 2005, 12(4), 389–398

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014 birim faaliyetl raporu, Bulaşıcı olmayan hastalıklar-programlar ve kanser Daire başkanlığı, 2015, Ankara

- Taub AF.** Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J Drugs Dermatol.* 2004 , S8-25 Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2000:487-489.
- Vaitkuvienė A1, Gegzna V, Kurtinaitienė R, Vaitkus JV. Cervical smear photodiagnosis by fluorescence Photomed Laser Surg., 2012, 30(5):268-74..
- Valentine R, Ibbotson S, Wood K, Brown C, Moseley H,** Modelling fluorescence in clinical PDT, *Photochem Photobiol Sci*, 2013 ,12, 203-213.
- Wang X, Wang P, Tong W, Liu Q,** Comparison of pharmacokinetics, intracellular localizations and sonodynamic efficacy of endogenous and exogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells, *Ultrasonics*, 2010,
- Wu C,** Associations of subsite-specific colorectal cancer incidence rates and stage of disease at diagnosis with county-level poverty, by race and sex. *Cancer*, 2006, 1121-7.
- Xia J, Guo X, Yan J, Deng K.** The role of miR-148a in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(9):1451-6.
- Yagi R, Kawabata S, Ikeda N, Nonoguchi N, Furuse M, Katayama Y, Kajimoto Y, Kuroiwa Y,** Intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic diagnosis of metastatic brain tumors with histopathological analysis, *World Journal of Surgical Oncology*, 2017, 15:179
- Yang X, Palasuberniam P, Kraus D, Chen B,** Aminolevulinic Acid-Based Tumor Detection and Therapy: Molecular Mechanisms and Strategies for Enhancement, *Int. J. Mol. Sci.* , 2015, 16(10), 25865-25880
- Yokozaki H,** Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int.*, 2000, 50(10), 767–777
- Zora V,** The Application of Current Diagnostic Protocols of Patients with Colon Cancer in Preparation for Therapy. *Acta Inform Med*, 2012.

ÖZGEÇMİŞ

Soyad, Adı : ÜNAY Simge
Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum yeri ve tarihi : Antalya- 15/03/1992
Telefon : 05365515600
E-mail : simge1503@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce ve İspanyolca

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Y.Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi	2018
Lisans	Başkent Üniversitesi	2015
Lise	Çine Mehmet Tuncer Anadolu Lisesi	2010
İlkokul	Aydın Cumhuriyet İlköğretim Okulu	2009

AKADEMİK YAYINLAR

1.PROJELER

ADÜ-BAP, Proje No: 17006, Kolon ve Mide kanserinde 5-Aminolüvelünelik Asit Aracılı Fotodinamik Tanı-Araştırmacı

2.BİLDİRİMLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Ünay S, Ramonaitė R, Petrolis R, Bilgin M D, Kriščiukaitis A. 5-aminolevulinic acid-mediated fluorescence in colon cancer cell line, Virtual Instruments in Biomedicine-2017, 19 Mayıs 2017, Klapedia/Litvanya.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Ünay S, Ramonaitė R, Petrolis R, Bilgin M D, Kriščiukaitis A.5-aminolevulinic acid-mediated fluorescence in colon and gastric cancer cell line, 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi, 6-9 Eylül 2017, İstanbul/Türkiye.