

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LED TABANLI FOTODİNAMİK TEDAVİDE IŞIK DOZU
ETKİSİNİN KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİ İÇİN İN
VİTRO OLARAK BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebru AKSOY

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Ayla EREN ÖZDEMİR

Ocak 2021

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LED TABANLI FOTODİNAMİK TEDAVİDE IŞIK DOZU
ETKİSİNİN KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİ İÇİN İN
VİTRO OLARAK BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebru AKSOY

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 19.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Dr. Öğr. Üyesi
Ayla EREN ÖZDEMİR
Jüri Başkanı**

**Doç. Dr.
Mustafa Zahid YILDIZ
Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi
Gökçen ÇETİNEL
Üye**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Ebru AKSOY

19.01.2021

TEŞEKKÜR

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayla EREN ÖZDEMİR'e çalışmalarına katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a, bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman teşvik eden, beni yönlendiren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI'ya ve bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım bir diğer saygı değer hocam Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreç boyunca desteklerini esirgemeyen aynı kaderi paylaştığım takım arkadaşım Büşra GÜNOĞLU'na ve maddi, manevi, dolaylı ya da doğrudan yardımlarından hep yararlandığım laboratuvar arkadaşlarım Şerife ÇELİKBAŞ, Bahar PEHLİVANÖZ ve Enes TOPRAK'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili annem Rabia AKSOY, babam Mehmet İhsan AKSOY ve çok sevgili kardeşlerim İshak ve İlayda AKSOY'a teşekkürlerimi sunarım. Son olarak her zaman manevi desteğini hissettiğim canım yengem Gülay AKSOY, amcam Mehmet Osman AKSOY ve var oluşlarının bile her zaman iyi hissettirdiği kuzenlerim manevi kardeşlerim Esra, Demet ve Servet AKSOY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY.....	xi
 BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
 BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanserin nedenleri ve tarihsel gelişimi.....	5
2.1.2. Kanserin oluşum mekanizması.....	7
2.1.3. Kanserin epidemiyolojisi	10
2.2. Kolon Kanseri	13
2.2.1. Kolon anatomi ve histolojisi	13
2.2.2. Kolon kanseri oluşumu	16
2.2.3. Kolon kanseri tedavi yöntemleri	17
2.2.3.1. Cerrahi yöntemler	18
2.2.3.2. Ablatif yöntemler	21
2.2.3.3. Embolizasyon.....	22
2.2.3.4. Radyoterapi.....	23
2.2.3.5. Kemoterapi	24

2.2.3.6. İmmünoterapi.....	24
2.3. Fotodinamik Tedavi.....	26
2.3.1. Fotodinamik tedavi tarihçesi	26
2.3.2. Fotodinamik tedavi prosedürü.....	28
2.3.3. Fotodinamik tedavi fotokimyası.....	29
2.3.4. Fotodinamik tedavide tümör imha mekanizmaları.....	31
2.3.4.1. Doğrudan hücre hasarı	32
2.3.4.2. Tümör vasküler hasarı.....	35
2.3.4.3. Enflamatuar ve immünolojik etki	35
2.4. Fotodinamik Tedavi Komponentleri.....	37
2.4.1. Fotoduyarlı maddeler	37
2.4.1.1. Birinci nesil ajanlar	38
2.4.1.2. İkinci nesil ajanlar	39
2.4.1.3. Üçüncü nesil ajanlar	40
2.4.2. 5-Aminolevulinik asid	41
2.4.3. Fotodinamik tedavide ışık.....	44
2.4.2.1. Dalgaboyu.....	44
2.4.2.2. Işık kaynakları.....	45
2.4.2.3. Işık yayan diyodlar (LED'ler)	46
2.4.2.2. Işık dozimetrisi	47
2.4.3. Oksijen	47
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları.....	49
3.1.1. Hücre hatları ve besiyerleri	49
3.1.2. Hücrelerin kültüre alınması	49
3.2. Işık Kaynağı.....	51
3.3. Fotoduyarlı Madde	52
3.4. MTT Hücre Canlılık Testi.....	52
3.5. Fotodinamik Tedavi Uygulama Protokolü.....	53
3.5.1. Optimizasyon çalışmaları.....	54

3.5.1.1. 5-ALA'nın inkübasyon süresinin ölçümü	54
3.5.1.2. 5-ALA'nın optimal konsantrasyonunun belirlenmesi..	55
3.5.1.3. Işığın optimal dozunun belirlenmesi (fototoksisite)	56
3.6. Ana Çalışma	58
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	60
4.1. Optimizasyon Çalışmasının Bulguları.....	60
4.1.1. İnkübasyon süresi bulguları	60
4.1.2. 5-ALA'nın sitotoksik etkisi	61
4.1.2. Fototoksisitenin belirlenmesi	62
4.2. Ana Çalışma Bulguları	62
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

5-ALA	: 5-Aminolevulinik Asid
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin Tri Phosphate
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cm ²	: Santimetre Kare
CO ₂	: Karbondioksit
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
CRC	: Kolorektal Kanser
DMEM	: Dulbecco's Modifed Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDT	: Fotodinamik Tedavi
FS	: Fotosenitizer
HpD	: Hematoporfirin Türevleri
LED	: Işık Yayan Diyot
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
FS	: Fotosensitizer
GI	: Gastrointestinal Kanal
HpD	: Hematoporfirin Türevleri
IARC	: Uluslar Arası Kanser Ajansı
ICD	: İmmünojenik Hücre Ölümü
J	: Joule
LED	: Işık Yayan Diyot
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar

MIRE	: Monokromatik Kızılötesi Enerji
MTT	: (3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5- Difeniltetrazolium Bromür)
MWI	: Mikrodalga Ablasyonu
NASA	: Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
PpIX	: Protoporfirin IX
rpm	: Dakikada Dönüş
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ICD	: İmmünojenik Hücre Ölümü
TACE	: Kemoembolizasyon
TAE	: Transarteriyel Embolizasyon
TEC	: Termoelektrik Soğutma
UV	: Ultraviyole
W	: Watt

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	2018’den 2040’a kadar tahmini vaka sayısı (Tüm kanserler) [7]	4
Şekil 2.2.	Siklin bağımlı kinazların (CDK) hücre döngüsünde rolü [10].....	8
Şekil 2.3.	GLOBOCAN 2018 kanser insidansı	12
Şekil 2.4.	GLOBOCAN 2018 kanser mortalitesi.....	12
Şekil 2.5.	Kolon anatomisi [10]	14
Şekil 2.6.	Kolon histolojisi [4]	15
Şekil 2.7.	Bir polipten kanser oluşumu [16]	17
Şekil 2.8.	FDT tarihçesi	28
Şekil 2.9.	FDT uygulama protokolü	29
Şekil 2.10.	FDT aksiyon mekanizması.....	30
Şekil 2.11.	Tümör imha mekanizmaları	32
Şekil 2.12.	Üç büyük hücre ölümü morfortipi ve immünolojik profilleri [55].....	33
Şekil 2.13.	Anti-tümör FDT mekanizmaları.....	36
Şekil 2.14.	Birinci nesil fotosensitizerler [79]	38
Şekil 2.15.	İkinci nesil fotosensitizerler [79].....	39
Şekil 2.16.	5-ALA moleküler yapısı [87]	41
Şekil 2.17.	Hem biyosentezinin şematik gösterimi [81]	42
Şekil 2.18.	Farklı dalgaboylarının penetrasyon derinliği [86]	45
Şekil 3.1.	LED cihazı	51
Şekil 3.2.	FDT uygulama protokolü blog diyagramı	54
Şekil 3.3.	Sitotoksisite optimizasyonu deneyi 96’lı kuyucukta plaka dizaynı ...	56
Şekil 4.1.	Hücre içi PpIX birikimi	60
Şekil 4.2.	Çalışma konsantrasyonlarında hücre canlılık yüzdeleri	62
Şekil 4.3.	Farklı ışık dozlarında hücre canlılık yüzdeleri	63
Şekil 4.4.	Uygulama 5 hücre canlılık yüzdeleri.....	64
Şekil 4.5.	Uygulama 6 hücre canlılık yüzdeleri.....	65

Şekil 4.6. Uygulama 7 hücre canlılık yüzdeleri.....	66
Şekil 4.7. Uygulama 8 hücre canlılık yüzdeleri.....	67



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Dünya genelinde en çok rastlanan 15 kanser türünün tahmin edilen yeni vaka ve ölümleri.....	11
Tablo 2.2. Kolon kanseri evrelerine göre kullanılan tedavi yöntemleri	18
Tablo 2.3. Geleneksel tedavi yöntemlerinin yan etkileri.....	25
Tablo 2.4. Konvensiyonel fotosensitizer çeşitleri ve aktivasyon dalga boyları....	41
Tablo 3.1. Fototoksisite uygulamaları.....	57
Tablo 3.2. Fotodinamik tedavi uygulamaları.....	58
Tablo 3.3. Fotodinamik tedavi değerleri	59
Tablo 4.1. 5-ALA farklı konsantrasyonlardaki hücre canlılık yüzdeleri	61

ÖZET

Anahtar kelimeler: Fotodinamik tedavi, kolon kanseri, LED ışık kaynağı, 5-ALA

Fotodinamik tedavi (FDT) halihazırda malign hastalıkların kontrolü için alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Fotosensitizer (FS) adı verilen ışığa duyarlı ajanın belirli bir dalga boyunda ışıkla uyarıldıktan sonra oksijen ile reaksiyona giren ve hedef dokularda reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek hücre ölümüne yol açan bir tedavi prosedürüdür. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından klinik olarak onaylanmıştır.

FDT'de kullanılan ışık, belirli lazer türlerinden veya ışık yayan diyotlardan (LED'ler) sağlanır. Kullanılan ışık türü, kanserin türüne ve vücutta nerede bulunduğu bağlıdır. FDT genellikle ayaktan tedavi olarak yapılır (hastanede kalmak zorunda kalmayacağınız anlamına gelir), ancak bazen cerrahi, kemoterapi veya diğer anti-kanser ilaçları veya radyasyon tedavisi ile birleştirilir.

Bu çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak 5-Aminolevulinik asid (5-ALA) kullanılmıştır. Klinikte en sık saptanan HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde en uygun 5-ALA güdümlü fotodinamik terapi uygulaması için 5-ALA inkübasyon süresi, en uygun 5-ALA konsantrasyonu, LED enerji yoğunluğu ve dalgaboyu parametreleri araştırılmıştır. Kontrol olarak WI-38 normal akciğer hücre hattı kullanılmıştır. 5-ALA suda çözünebilen ikinci kuşak fotosensitizerdir. 650-800 nm dalga boyu aralığında maksimum emilimleri göstermektedir. 5-ALA'nın HT-29 kolon kanseri hücrelerindeki protoporfirin IX (PpIX) birikimi ölçülerek hücre içinde en fazla PpIX'in biriktiği zaman bulunmuş ve inkübasyon süresi 5 saat olarak belirlenmiştir. 5-ALA'nın HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde konsantrasyona bağımlı etkisi araştırılarak terapi sırasında kullanılacak 5-ALA'nın konsantrasyonu optimize edilmiştir. 5-ALA konsantrasyonu 0,5 mM ve 1 mM'a sabitlenmiştir. Seçilen bu konsantrasyonların hücre canlılığını tek başına inhibe ve proliferetmediği belirlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda 5 saat 5-ALA inkübasyonu ve 5 J/cm² lazer enerji yoğunluğu en iyi sonuç alınan parametre olarak belirlenmiştir. Bu parametrelerle ana çalışmaya geçilmiş 3 farklı tip dalga boyunda (405, 635 ve 405+635 nm) LED ile fotodinamik tedavi uygulanmıştır. Sonuç olarak 5-ALA güdümlü fotodinamik tedavi belirlenen parametrelerde hücreler üzerinde 405 nm'de % 17'e, 635 nm'de %35'e ve iki dalga boyunun kombine olduğu 405+635 nm'de %15'e düştüğü gösterilmiştir.

DETERMINATION OF LIGHT DOSE EFFECT IN LED-BASED PHOTODYNAMIC TREATMENT AS IN VITRO FOR COLORECTAL CANCER CELLS

SUMMARY

Keywords: Photodynamic therapy, colon cancer, LED light source, 5-ALA

Photodynamic therapy (PDT) is currently used as an alternative therapy for the control of malignant diseases. A photosensitizer (PS) called light-sensitive agent is a treatment procedure that reacts with oxygen after being stimulated with light at a certain wavelength, causing reactive oxygen species (ROS) in target tissues, leading to cell death. It is clinically approved by the American Food and Drug Administration (FDA).

The light used in PDT comes from certain types of laser or light emitting diodes (LEDs). The type of light used depends on the type of cancer and where it is found in the body. PDT is usually done as an outpatient treatment (meaning you will not have to stay in the hospital), but it is sometimes combined with surgery, chemotherapy or other anti-cancer drugs or radiation therapy.

In this study, 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) was used as the photosensitive agent. 5-ALA incubation time, optimal 5-ALA concentration, LED energy density and wavelength parameters were investigated for the most appropriate 5-ALA-guided photodynamic therapy application on the HT-29 colon cancer cell line, which was found most frequently in the clinic. WI-38 normal lung cell line was used as a control. 5-ALA is a water soluble second generation photosensitizer. It shows maximum absorption in the wavelength range of 650-800 nm. The IX (PpIX) accumulation of protoporphyrin in 5-ALA in HT-29 colon cancer cells was measured and the incubation time that was found when the most PpIX accumulated in the cell was determined as 5 hours. The concentration-dependent effect of 5-ALA on HT-29 colon cancer cells was investigated and the concentration of 5-ALA to be used during therapy was optimized. The 5-ALA concentration is fixed at 0.5 mM and 1 mM. It was determined that these selected concentrations did not inhibit and proliferate cell viability alone. As a result of the optimization study, 5-hour 5-ALA incubation and 5 J/cm² laser energy density were determined as the best result parameter. With these parameters, the main study was started and photodynamic therapy was applied with 3 different types of wavelengths (405, 635 and 405 + 635 nm) LEDs. As a result, 5-ALA-guided Photodynamic therapy has been shown to decrease to 17% at 405 nm, 35% at 635 nm and 15% at 405 + 635 nm, where two wavelengths are combined, within the specified parameters.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından üretilen GLOBOCAN 2018 kanser insidansı (görülme sıklığı) ve mortalite (ölüm oranı) tahminlerini kullanarak dünya çapında küresel kanser yükü hakkında sunduğu bir durum raporunda 2018'de tahmini 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağı ileri sürülmüştür. Bu vakalardan 1,8 milyondan fazla yeni kolorektal kanser vakası ve 881000 ölüm olacağı tahmin edilmektedir. Genel olarak, kolorektal kanser, görülmeye sıklığı bakımından üçüncü, ölüm oranı bakımından ikinci sıradadır [3].

Kolon kanserinde de diğer tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi uygun tedaviyi belirlemeden önce doğru evreleme büyük önem taşımaktadır. Hasta için hangi tedavi şeklinin en yararlı olacağına kanserin yeri, evresi ve hastanın diğer sağlık sorunları karar vermektedir. Bir kanserin tek bir tedavisi yoktur ama lokalize kolon kanseri için tek iyileştirici yöntem cerrahidir (evre I-III). Cerrahi rezeksiyon, karaciğer ve/veya akciğerde sınırlı metastatik hastalığı (evre IV hastalığı) olan hastalar için tek tedavi seçeneği sağlamaktadır ancak evre IV hastalığı olan engelsiz hastalarda seçici kolon rezeksiyonları kullanılabilmektedir. Adjuvan kemoterapi evre III hastalığı olan hastalar için standarttır ancak evre II hastalıkta kullanımı tartışmalıdır. Günümüzde radyasyon tedavisinin rolü, kemik veya beyin metastazı gibi seçilmiş metastatik bölgeler için rahatlatıcı tedaviler ile sınırlıdır. Metastatik kolorektal kanserli hastalar için cerrahi yerine kemoterapi standart yöntem olmuştur. Kanser tedavilerindeki temel zorluklar, tedavi sağlıklı dokuları veya organları etkilediğinde ciddi yan etkilere sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple biyolojik ajanlar metastatik vakaların tedavisinde önemli bir rol oynamıştır ve bu seçim tümörün genetik analizi ile giderek daha fazla yönlendirilmektedir. Tümör biyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayan ve yeni nesil hedefli ilaçların tasarımına yol açan temel

araştırmalardaki ilerlemelerle fotodinamik tedavi mevcut tedavi yöntemlerine umut verici alternatif bir tedavi yöntemidir [20, 21, 31].

Fotodinamik tedavi, kanser hücrelerini öldürmek için ışıkla birlikte fotosensitizer olarak adlandırılan özel ilaçlar kullanan bir tedavidir. İlaçlar sadece belirli ışık türleri tarafından uyarıldıktan sonra çalışmaktadır. Vücudun tedavi edilen kısmına bağlı olarak fotosensitizer vücuda sistemik, lokal veya topikal olarak verilmektedir. Belli bir süre içinde ilaç kanser hücreleri tarafından emilmekte ve ardından fotosensitizerin absorbans bandına karşılık gelen bir dalga boyunda ışınlanmaktadır. Oksijen varlığında, bir dizi olay doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikrovaskülatürde hasara ve lokal bir enflamatuar reaksiyonun indüklenmesine yol açmaktadır. FDT ayrıca kanser hücrelerini besleyen kan damarlarını yok ederek ve bağışıklık sistemini kansere saldırması için uyararak da yardımcı olabilmektedir. İlacın verildiği zaman ile ışığın uygulandığı zaman arasındaki süreye inkübasyon süresi denilmektedir. Bu süre kullanılan ilaca veya hücre hattına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. FDT'de kullanılan ışık, belirli lazer türleri veya ışık yayan diyotlardır (LED'ler). Kullanılan ışık türü, kanserin türüne ve vücutta nerede bulunduğuyla bağlıdır. FDT genellikle ayakta tedavi prosedürü olarak yapılmaktadır ancak bazen cerrahi, kemoterapi veya diğer anti-kanser ilaçları veya radyasyon tedavisi ile birleştirilmektedir. FDT düzgün kullanıldığında uzun süreli yan etkisi yoktur, ameliyattan daha az invazivdir ve genellikle kısa bir zaman almaktadır. Çok hassas bir şekilde hedeflenebilmektedir. Radyasyondan farklı olarak, FDT gerekirse aynı bölgede birçok kez tekrarlanabilmektedir [53, 69, 70].

Bu çalışmanın amacı, klinikte sıklıkla karşılaşılan kolon kanser türlerinden olan HT-29 kolon epitelyal tümör üzerinde etkili olabilecek 5-ALA güdümlü Fotodinamik terapi parametrelerinin (ajanın dozu, inkübasyon süresi, ışık dozu) in vitro çalışmalar için belirlenmesini sağlamaktır. Aynı zamanda WI-38 normal akciğer fibroblastik sağlıklı hücre hattı kullanarak ilacın sağlıklı hücrelerden temizlendiği zaman aralığını bulup tedaviye öyle başlayarak klinik FDT'yi iyileştirmek amaçlanmıştır. Çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak 5-ALA kullanılmaktadır. Aynı zamanda 5-ALA için kullanılan geleneksel absorpsiyon pikleri olan 405 nm ve 635 nm dalga boylarına

dayanarak ikisinin kombinasyonunun tek dalga boyunun kullanılmasına kıyasla daha etkili olacağı düşünülmüş ve araştırılmıştır. Çalışmada hücre canlılığı MTT stotoksisite testiyle belirlenmiştir.

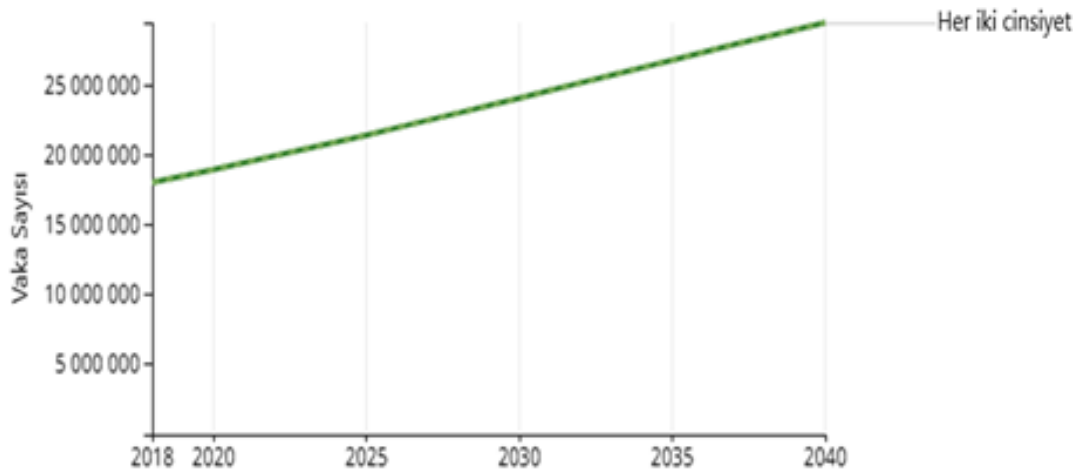


BÖLÜM 2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, latince yengeç anlamına gelen carcinos kelimesinden türemiştir. Bu kavram Hipokrat'ın 2300 yıl önce, bazı göğüs tümörlerinden yayılan uzun, şişmiş damarların bir yengeç uzuvlarına benzediğini gözlemlemesinden kaynaklanmaktadır [1].

Hücrelerin, vücudun normal büyüme kontrol mekanizmalarından kaçarak süresiz bölünme yeteneği kazanıp kontrolsüz büyüme ve çoğalmasıyla tümörler oluşur. Bu olay zaman içinde birçok genetik değişimin birikmesini gerektiren çok aşamalı bir süreçtir [2]. Tümörler iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) olabilirler. Malign olan bu tümörlere “kanser” denir. Kanser hücrelerinin vücut boyunca kan veya lenf içine dökülerek diğer organlarda yeni tümörler oluşturması muhtemeldir. Bu olaya “metastaz” denir. Benign tümörler başladıkları dokuda kalıp diğer organlara yayılmazlar [1].



Şekil 2.1. 2018'den 2040'a kadar tahmini vaka sayısı (tüm kanserler) [7]

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmalarına göre, kanser, 172 ülkenin 91'inde ilk veya ikinci ölüm nedenidir ve diğer 22 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır. GLOBOCAN 2018 kanser insidansı ve mortalite tahminlerini kullanarak dünya çapında küresel kanser yükü hakkında bir durum raporu sunmaktadır. 2018'de tahmini 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağını ileri sürülmüştür [3]. Bu sayılarla ilişkilendirilen halk sağlığı sorunu, kanserin temel nedenlerini anlama konusunda tarih boyunca çok büyük araştırma çabalarını tetiklemiştir.

2.1.1. Kanser nedenleri ve tarihsel gelişimi

Kanserin ilk tanımına M.Ö 2000'li yıllarda Mısır papürüsleri, Babil çivi yazısı tabletler ve eski Hint yazmalarında rastlanmıştır ancak bilimsel olarak ilk karşılaşma 1659 yılında Marcello Malpighi tarafından yapılan mikroskopik inceleme ile 17. yüzyıla dayanmaktadır [4]. Bir sonraki yüzyılda Bernardino Ramazzini, 1713 yılında rahibelerde yüksek oranda meme kanseri gözlemlemiş ve bunu rahibelerin bekar yaşamlarıyla ilişkilendirmiştir. Percival Pott, 1775 yılında baca temizlemelerinin, kuruma sık maruz kalmaları nedeniyle ortaya çıkardığı skrotum kanseri geliştirdiğini belgelemiştir. 19.yüzyılda, raporlar, çeşitli mesleklerin, artan kanser oranlarıyla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Richard von Volkmann, 1875 yılında Almanya'daki kömür katranı damıtıcılar arasında üç skrotal kanser vakası teşhis etmiştir. İskoç bilim adamı Joseph Bell, 1876'da petrol işçileri arasındaki iki skrotal kanser vakasını tanımlamış ve kanserin petrol işçileri arasında oldukça yaygın olduğunu belirtmiştir. Harting ve Hesse, 1879'da Almanya ve Çekoslovakya'da bulunan madencilerin akciğer kanseri nedeniyle yüksek ölüm oranlarına maruz kaldıklarını belgelemişlerdir. Ludwig Rhen 1895'te Almanya'daki uzun süreli boya işçilerinin sıklıkla mesane kanserinden öldüğünü bildirmiştir. Wilhelm Röntgen'in 1895'te olağanüstü bir keşif olarak kabul edilen x-ışınlarını keşfetmesinden on yıl sonra, dünyanın farklı birçok bölgesinden radyologların cilt kanserlerine yakalandıkları ile ilgili vaka raporları ortaya çıkmaya başlamıştır.

Tüm bu gelişmeler göz önüne alındığında 1800'lerin sonlarında, kanserin nedeni üç temel teori altında toplanmıştır. Virchow, kanserin birbirini takip eden tahrişlerin ürünü olduğunu öne sürmüştür. Lobstein ile Recamier ve daha sonra Cohnheim kanser bölgesindeki embriyonel dokunun farklılaşmasının bir sonucu olduğunu varsaymış; diğerleri, kanserin bulaşıcı bir ajandan kaynaklandığını iddia etmiştir [5].

20.yüzyıla geçildiğinde 1920-1950 döneminde, sentetik ajanların kanserin nedeni olduğuna dair ek kanıtlar ortaya çıkarılmıştır. 1950'lerde ise çok yüksek kanser oranlarına neden olan bazı kanserojenler rapor edilmiştir. Kanserojenler, DNA'da değişiklik yaparak kansere neden olmaktadır. Bu dönemlerde ek kanser nedenlerini tespit etmek ve istatistiksel analizi için sofistike yöntemler geliştirilmiştir. 1940'ların ortalarına gelindiğinde, akciğer kanseri oranının arttığı açıkça görülmüştür, ancak sebebi belirlenememiştir. Analizler sonucunda sigara içmenin akciğer kanseri insidansı ile bağıntılı olduğu gösterilmiştir. 1960'lı yılların sonunda başlayan ilaçlar sıklıkla kanserojen olarak tanımlanmaya başlanmıştır. Tıbbi radyoizotopların da yüksek kanser oranlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ardından 1980'lerde laboratuvar yöntemlerinin gelişmesiyle yapılan araştırmalar, virüsleri başka önemli bir kanser nedeni olarak tespit etmiştir [5].

Günümüzde kalıcı virüs enfeksiyonlarının, dünyadaki kanserlerin %20'sine neden olduğu tahmin edilmektedir. Tüm bu dış etkenlerin yanı sıra kanserin kalıtsal sendromları araştırılmıştır. Eğer kanser oranları zaman ve mekan içinde değişmez ise, kanser nedenlerinin muhtemelen içsel olduğu; eğer oranlar değişirse, nedenlerin dışsal olduğu düşünülmüştür [6]. Günümüzde kalıtsal sendromlar kanserlerin %5-10'undan azını açıklamasına karşın en büyük risk faktörünü yine bu aile öyküsü oluşturmaktadır. Kalıtsal kanser sendromlarındaki kanserler daha agresif olabilmekte erken yayılabilmekte ve kötü prognoz ile ilişkili olabilmektedir. Bunlar ayrıca kalıtsal olmayan kanserlerden ayırt edilemeyen standart tedaviye daha duyarlı olabilmektedirler. Bu gözlemler, kanserin, tek bir hücre içindeki bir dizi olayın sonucu olduğu önerisini ortaya koymaktadır.

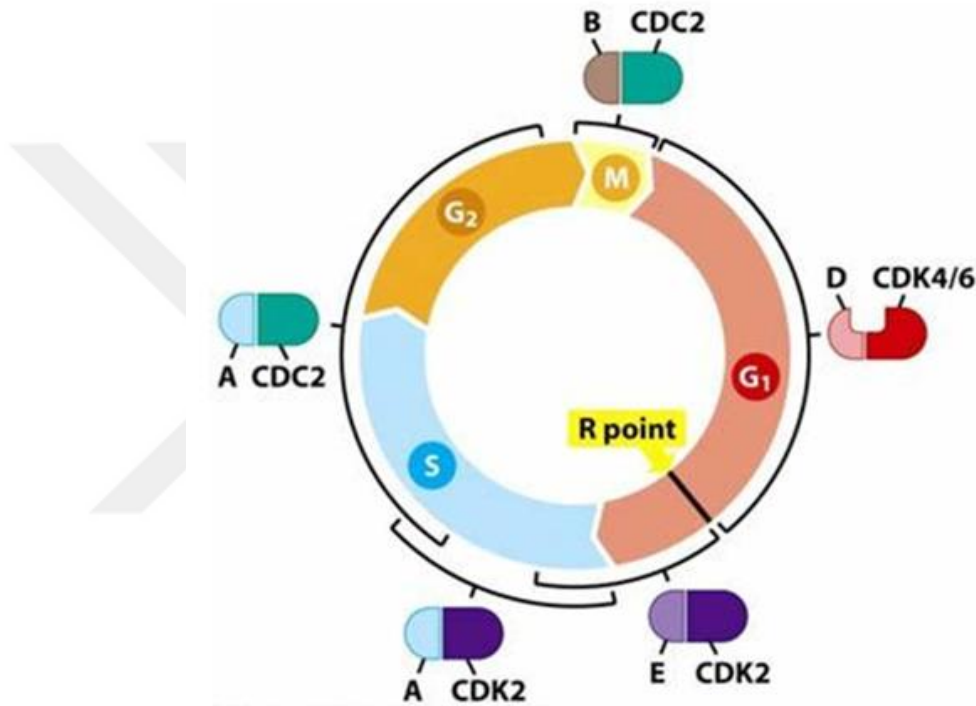
Günümüzde, bilim adamları kanserin arkasındaki kimya ve biyolojinin karmaşık sorunlarını çözmeye başlamışlardır. Genlerin nasıl çalıştığını ve mutasyonlar tarafından nasıl zarar görebileceklerini göstermişlerdir. Bilim adamları, kanserin kimyasallardan (kanserojenler), radyasyondan, virüslerden ve ayrıca atalardan miras alınmasının neden olabileceğini tanımlamaktadırlar.

1846'da anestezinin icadından sonra, cerrahlar Bilroth, Handley ve Halsted, tüm tümörün lenf bezleriyle birlikte alınmasıyla kanser operasyonlarına öncülük etmiştir. Daha sonra Paget, kanser hücrelerinin birincil tümörden diğer yerlere kan akımı (metastaz) yoluyla yayıldığını bildirmiştir. Kanser yayılma mekanizmalarını anlamak, kanser ameliyatının sınırlarını tanımada anahtar bir unsur haline gelmiştir. 1970'lerin başında, ultrason, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi alanındaki gelişmeler keşif işlemlerinin çoğunun yerini almıştır. 20.yüzyılda, cerrahlar kemoterapi ve/veya radyasyon ile cerrahiye birleştirerek kanser tedavisi için yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Yıllar geçtikçe, birçok kemoterapi ilacının kullanılması birçok kanser türünün başarılı bir şekilde tedavi edilmesiyle sonuçlanmıştır [8].

2.1.2. Kanser in oluşum mekanizması

Kanser bir hücrede veya küçük bir hücre grubundaki değişikliklerle başlamaktadır. Vücudumuzdaki normal hücrelerin çoğu, mitoz bölünmeyle düzenli bir şekilde çoğalmaktadır. Bir hücre bölünmesinden diğerine kadar geçen evreye “hücre döngüsü” denir. Döngü sırasında hücre büyümekte ve DNA’sını kopyalamaktadır. G1 fazı DNA kopyalaması için gerekli enzim ve molekülleri biriktirmektedir. S fazında hücrenin kromozal DNA’sı kopyalanmaktadır. G2 fazında hücre büyümeye devam etmekte ve bölünmeye hazırlanmaktadır. M mitoz evresidir. Hücrelerin hücre döngüsüne yeniden girmesine, kısıtlama noktasında (R noktası) karar verilmektedir. Normal hücrelerde, hücrelerin hızlı bir şekilde hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalması, birbirleriyle etkileşime giren protein grupları tarafından belirli bir olay dizisinde düzenlenmektedir. Kontrol noktaları, hücre döngüsünün bireysel aşamalarının doğru bir şekilde tamamlanmasının denetlemesini yapmaktadır. Bunlar

G₁/S, G₂/M ve M noktalarıdır. Bu kontrol sisteminin temeli siklin bağımlı kinazlardır (CDK'lar). CDK'lar, diğer kinazları aktive ederek hücre döngüsünün farklı fazlarına ilerlemeyi sağlamaktadır. CDK aktivitesi, hücre döngüsüne bağlı bir şekilde sentezlenen ve indirgenen siklinler (A, B, D ve E) adı verilen aktifleştirici alt birimlerin varlığına bağlıdır. Hücre döngüsü içinde gerçekleşen yaşamsal olaylar genlerin kontrolü altındadır [9, 10].



Şekil 2.2. Siklin bağımlı kinazların (CDK) hücre döngüsünde rolü [10]

Her hücrenin içinde çok sıkı bir şekilde sarılmış 2 metreden fazla DNA zinciri bulunmaktadır. İnsanların DNA'sında yaklaşık 25000 geni vardır. Genler hücrelerimize ne tür bir hücre olacaklarını, nasıl davranacaklarını, ne zaman büyüüp üreyeceklerini ve ne zaman öleceklerini söylemektedir.

Hücreler bölündüğünde genler oluşan hataları toplamaktadır. Bu hatalara mutasyon denir. Normal hücrelerde meydana gelen mutasyonların sayısı çok yüksek değildir. Mutasyonlar yaşamlarımız boyunca, hücrelerimizdeki doğal süreçler sırasında yukarıda belirtildiği gibi sigara dumanı, x-ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyon,

güneşten gelen ultraviyole, gıdalardaki bazı kanserojen maddeler ve çevremizdeki kimyasallarla oluşmaktadır. Bazen de insanlar bazı hatalı genleri ebeveynlerinden miras alırlar. Genellikle hücreler genlerindeki hataları onarabilmektedir. Hasar çok kötü olduğunda, hücre bunun yerine kendini yok edebilmekte veya bağışıklık sistemi onları anormal olarak tanıyıp öldürmektedir [11]. Ancak hücre döngüsünde G1/S ya da G2/M kontrol noktalarını denetleyen genler kusurluysa hücre DNA hasarını onaramamakta ve döngüye devam etmektedir [10]. Hücre kontrolden çıkıp çoğalmaya, kendini düzgün tamir edememeye ve gerektiğinde ölmemeye başlamaktadır. Bu noktaları kontrol eden genler;

Onkogenler; Normal şartlar altında, hücrelerin çoğalmasını ve bölünmesini söyleyen genlerdir. Hücrenin geninde hasar meydana gelince o hücreye ve ondan büyüyen tüm hücrelere kalıcı olarak bölünmeleri söylenir. Böylece bir tümör gelişir.

Tümör baskılayıcı genler; Gerektiğinde hücrenin büyümesini ve bölünmesini durduran genlerdir. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, bir hücrenin artık büyümeyi durdurma talimatını anlamadığı anlamına gelir. Hücre daha sonra kontrolden çıkıp çoğalmaya başlayabilmektedir. Bu tümörün gelişmesine yol açabilmektedir. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin çoğu kanserde hasar gördüğü veya eksik olduğu görülmektedir.

DNA onarım genleri; Vücudumuzdaki her hücredeki DNA sürekli hasar görme tehlikesi altındadır. Ancak hücreler, görevi hasarlı DNA'yı onarmak olan birçok farklı protein içerir. Bu proteinler sayesinde çoğu DNA hasarı, hiçbir olumsuz etkisi olmadan hemen onarılır. Ancak DNA hasarı, bir DNA onarım proteini yapan bir gende meydana gelirse, bu hücrenin kendini onarma yeteneği daha azdır. Böylece zamanla diğer genlerde hatalar oluşacak ve kanserin oluşmasına izin verilecektir.

Kendini yok eden genler; Bazı genler normalde bir hücreye çok eski veya hasarlıysa kendini yok etmesini söyler. Buna apoptoz veya programlanmış hücre ölümü denir. Oldukça karmaşık ve çok önemli bir süreçtir. Hücreler genellikle bir şey yanlış gittiğinde kanser oluşumunu önlemek için ölür. Apoptozda yer alan birçok farklı gen

ve protein vardır. Bu genler hasar görürse, hatalı bir hücre ölmek yerine hayatta kalabilir ve kanserli hale gelir [11].

Bu genlerden herhangi birindeki hasar sonucu anormal hücrelerin bir araya gelmesiyle neoplazmalar oluşur. Neoplastik hücrelerin bir bütün olarak kaldığı ve çevre dokulara sıçramadığı sürece iyi huylu oldukları kabul edilir. Ancak, hücrelerin kromozomlarının delesyona uğradığı koşullar altında, hücreler sapma ve komşu hücreleri istila etme eğilimindedir. Bu istilacı ve mutasyona uğramış hücreler bir araya gelerek bir tümör oluşturur.

Kanser hücreleri hızlı çoğalır, genetik anormallik sergiler, hücresel kontrol noktalarından kaçır, hücre ölümüne direnç geliştirir ve çok miktarda hücre besin tüketir. Çoğu kanserde meydana gelen başka bir durumda, istilacı kanser hücreleri parçalanır, kan dolaşımına veya lenf sistemine girer ve uzaktaki organlara dağılır. Bu kanser hücrelerinin birincil bölgeden ayrılma yeteneğine “tümör metastazi” denir. Metastatik hücreler tamamen farklı mutasyonlara sahip olabilir ve bu nedenle primer tümörlerden çok farklı şekilde tedaviye cevap verebilir [9].

2.1.3. Kanser in epidemiyolojisi

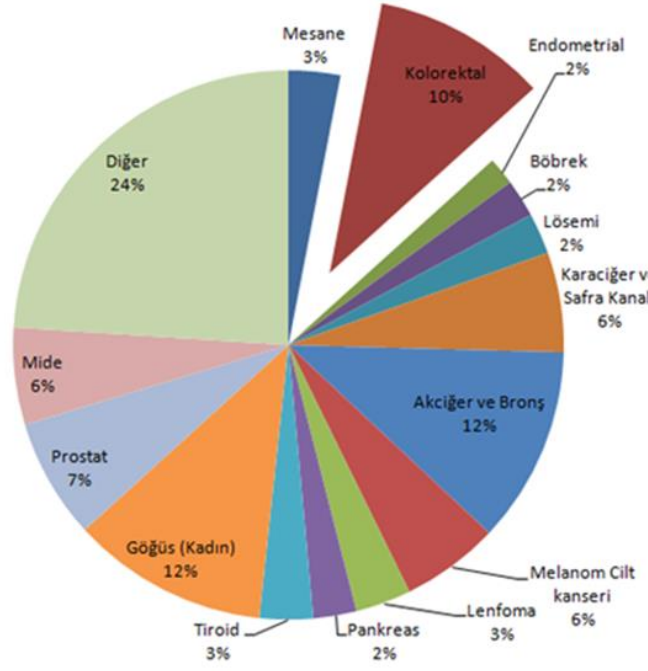
Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından üretilen GLOBOCAN 2018 kanser insidansı (görülme sıklığı) ve mortalite (ölüm oranı) tahminlerine dayanarak, 2018'de kanser yüküne ilişkin bir durum raporunda dünya genelinde 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağını tahmin edilmektedir (Tablo 2.1.). Vakaların yaklaşık yarısının ve dünyadaki kanser ölümlerinin yarısından fazlasının 2018 yılında Asya'da meydana geleceği, Avrupa'nın ise toplam kanser vakalarının %23,4'ünü ve kanser ölümlerinin %20,3'ünü oluşturacağı, bunun Amerika'da görülme sıklığının %21'i ve dünya çapında ölüm oranının %14,4'ünü oluşturması beklenmektedir.

Tablo 2.1. Dünya genelinde en çok rastlanan 15 kanser türünün tahmin edilen yeni vaka ve ölümleri

Kanser Tipi	Tahmini Yeni Veriler	Tahmini Ölümler
Mesane	549.393	199.922
Kolon ve Rektal (Kombine)	1.849.518	880.797
Endometrial	295.414	184.799
Böbrek (Renal Hücre ve Renal Pelvis) Kanseri	403.262	175.098
Lösemi (Her Türlü)	437.033	309.006
Karaciğer ve İntrahepatik Safra Kanalı	1.060.500	946.718
Akciğer ve Bronş (Solunum Sistemi)	2.093.876	1.761.007
Melanom Cilt kanseri	1.042.056	65.155
Lenfoma (Hodgkin ve Non-Hodgkin Lenfoma)	589.580	274.891
Pankreas	458.918	432.242
Tiroid	567.233	41.071
Göğüs (Kadın)	2.088.849	626.679
Prostat Kanseri	1.276.106	358.989
Mide	1.033.701	782.685
Diğer(ağız,beyin,tükürük bezleri....)	4.333.518	2.515.968
TOPLAM	18.078.957	9.555.027

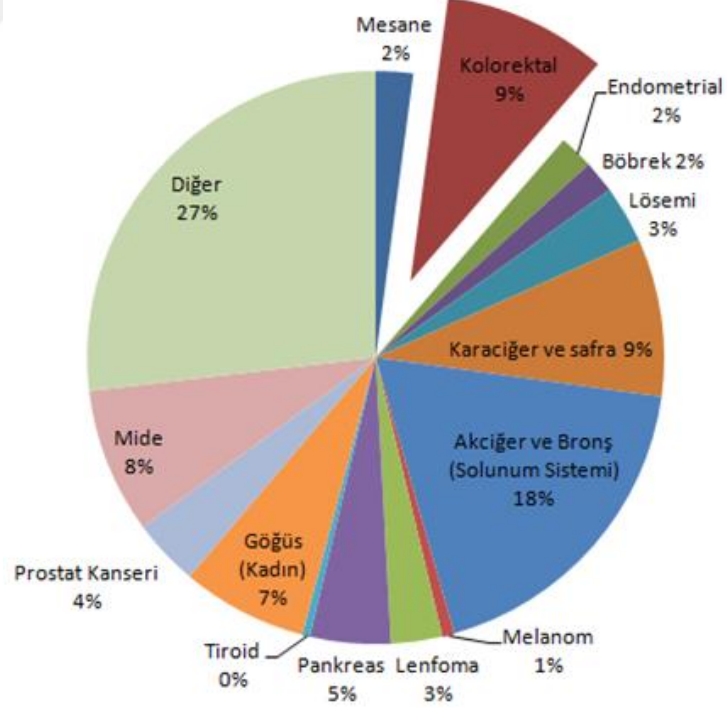
Her iki cinsiyette de akciğer kanseri en sık tanı alan kanserdir (toplam vakaların %12'si), bunu kadın meme kanseri (%12), kolorektal kanser (%10), erkeklerde prostat kanseri (%7), karaciğer kanseri (%6) ve mide kanseri (%6) takip etmektedir. Mortalite için yine akciğer kanseri (%18) ilk sırayı almaktadır bunu kolorektal kanser (%9), karaciğer kanseri (%9), mide kanseri (%8) ve kadın meme kanseri (%7) izlemektedir.

İNSİDANS



Şekil 2.3. GLOBOCAN 2018 Kanser insidansı

MORTALİTE



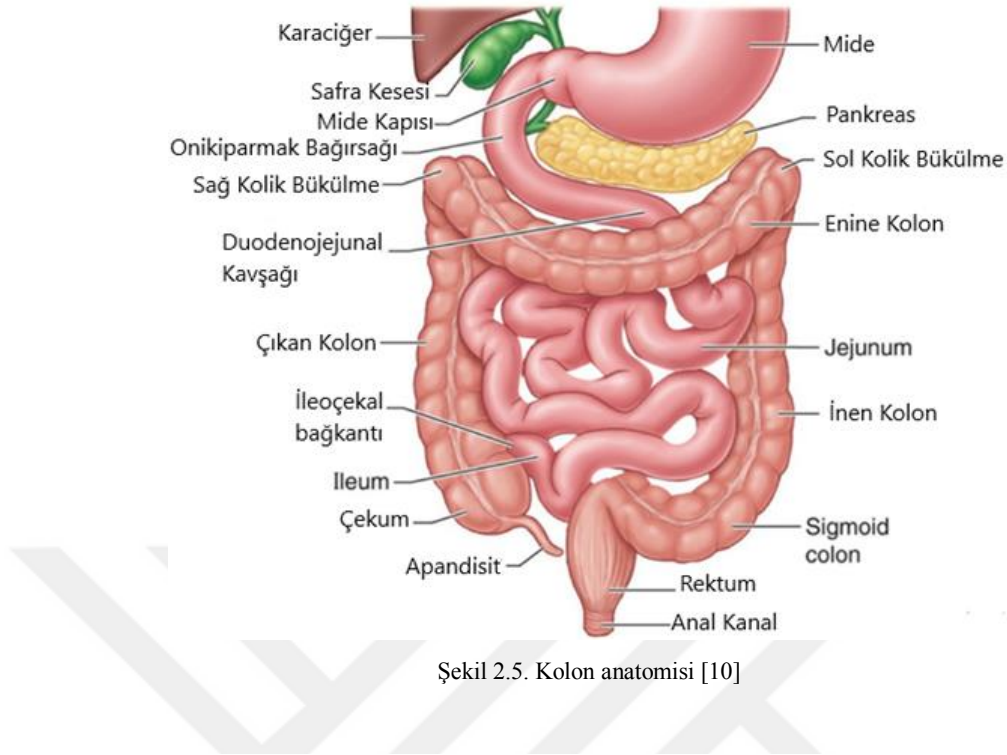
Şekil 2.4. GLOBOCAN 2018 Kanser mortalitesi

201 milyon insanda 1,8 milyondan fazla yeni kolorektal kanser vakası ve 881.000 ölüm olacağı tahmin edilmektedir (Tablo 2.1.). Genel olarak, kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından üçüncü (Şekil 2.3.), ölüm oranı bakımından ikinci sıradadır (Şekil 2.4.).

2.2. Kolon Kanseri

2.2.1.Kolon anatomi ve histolojisi

Kalın bağırsak, kolon olarak da bilinen, sindirim sisteminin bir parçasıdır. Yaklaşık 1,5 metre uzunluğundadır ve gastrointestinal (GI) kanalın beşte birini oluşturmaktadır. Çoğu besin maddesinin ince bağırsakta emilmesinden sonra sindirilemeyen gıdanın işlenmesinden sorumludur. Kalın bağırsak çekum (kör bağırsak), çıkan kolon, enine kolon, inen kolon ve sigmoid kolon olmak üzere 5 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.5.). Çekum, ince bağırsağın sonu ile kalın bağırsağın başlangıcı arasındaki kapakçığın bileşke seviyesinde çıkan kolonun proksimal kör kesesidir. Çekum kalın bağırsağın ikinci kısmı olan çıkan kolon ile devam eder. Çıkan kolon, sağ kalça çukurundan karaciğerin sağ lobuna kadar karının sağ tarafında mükemmel bir şekilde ilerler. Bu noktada, sağ kolik bükülmede (hepatik fleksura) sola dönüş yapar. Artan kolon karın zarının arkasında bulunan bir organdır ve her iki tarafında parakolik oluklar vardır. Enine kolon kalın bağırsağın üçüncü, en hareketli ve en uzun kısmıdır. Sağ ve sol kolik fleksiyonlar arasında bulunur. Sol kolik bükülme (splenik fleksura) sağdan daha az hareketlidir. Enine kolon, kökü pankreasın alt sınırı boyunca olan enine mezokolonun bir mezenterine bağlanır. Enine kolon inen kolon olarak devam eder. İnen kolon karın zarı arkasında bulunan bir organdır ve kalın bağırsağın beşinci kısmı olan sigmoid kolon içine girer. Sigmoid kolon inen kolonu rektuma bağlar. Sigmoid kolon, değişen uzunlukta S şeklinde bir halkadır [12, 13].

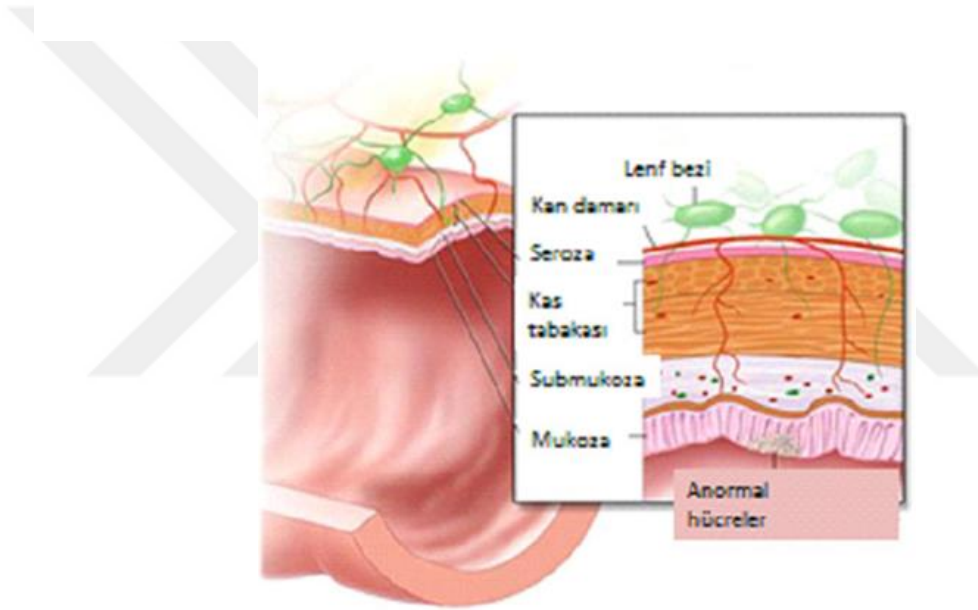


Kolonun temel işlevleri;

- Su ve elektrolitlerin emilmesi,
- Vitaminlerin üretilmesi ve emilmesi,
- Dışkı sıkıştırma,
- Potasyum ve klorür salgısı,
- Atık malzemeyi rektuma doğru taşımalarını içermektedir.

Sindirilemeyen materyaller kolona ulaştığında, çoğu besin maddesi ve suyun %90 kadarı ince bağırsak tarafından emilmektedir. Çıkan kolonun rolü, kalan suyu ve diğer temel besin maddelerini sindirilemez materyalden emerek dışkı oluşturacak şekilde katılaşmasını sağlamaktır. Suyun emilmesi ozmoz ile gerçekleşir. Su, elektrolitlerin emilmesi ile oluşturulan ozmotik bir eğime yanıt olarak dağılır. Sodyum, kolonda sodyum kanalları tarafından aktif olarak emilir. Potasyum lümen içindeki konsantrasyona bağlı olarak emilir veya salgılanır. Sodyumun aktif emilimi ile oluşturulan elektrokimyasal gradyan buna izin vermektedir. Klorür iyonları, elektrokimyasal bir gradyan boyunca bikarbonat iyonları ile değiştirilmektedir. Kolon ayrıca bakteriyel yetiştirme için elverişli bir ortamda

gerekli vitaminlerin sağlanmasında rol oynamaktadır. Kolon bağırsaklarımızı koruyan ve vitamin üreten trilyonlarca bakteri barındırmaktadır. Kolondaki bakteriler, fermentasyon yoluyla önemli miktarda vitamin üretmektedir. Biotin de dahil olmak üzere K vitamini ve B vitaminleri, kolon bakterileri tarafından üretilmektedir. Bu vitaminler daha sonra kana emilir. Bir kişide bu vitaminlerin alımı düşük olduğunda, kolon vitamin eşitsizliğini en aza indirmede önemli bir rol oynamaktadır. İnen kolon, sonunda rektuma boşaltılacak dışkı depolamaktadır. Sigmoid kolon, kolonun içindeki basıncı arttırıp ve dışkının rektuma girmesine neden olmaktadır. Rektum dışkılamaya ile ayrılmayı bekleyen dışkıyı tutmaktadır [12, 13].



Şekil 2.6. Kolon histolojisi [4]

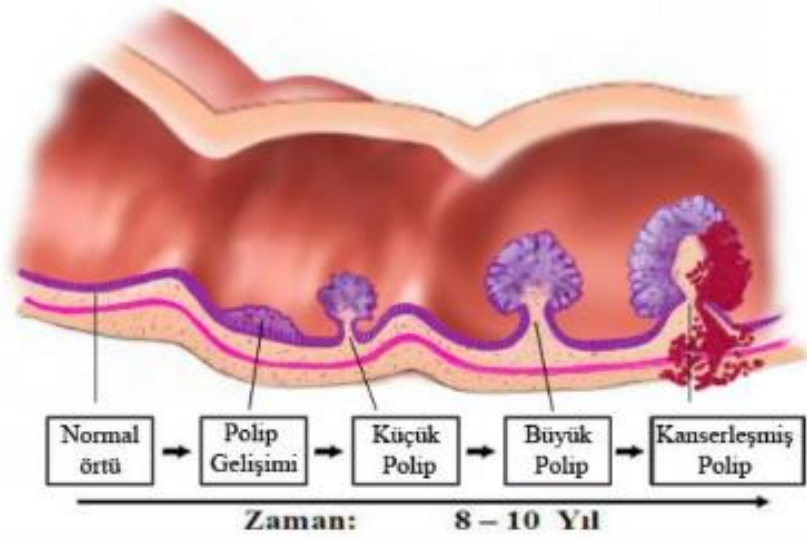
Bağırsak duvarı birden fazla katmandan oluşmaktadır. Lümen dışına doğru kalın bağırsağın 4 tabakası mukoza, submukoza, kas tabakası ve serozadır. Kas tabakası kalın bağırsağın hareketliliğine katkıda bulunmaktadır. Kolonda haustral kasılması ve kitle hareketi olmak üzere 2 tip hareketlilik vardır. Haustra, kolondaki parçalı görünümünü veren kolondaki keseciklerdir. Haustral kasılması, özellikle çekum ve çıkan kolonda oluşmakta ve sıvı emiliminin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Kimusun transvers kolona kadar iletilmesi bu hareketlerle sağlanmaktadır. Sonuç olarak kimus fekal maddeye dönüşmüş olur. Transvers kolondan sigmoid kolona kadar ilerleme ise

kitle hareketleri ile gerçekleştirilir. Kitle hareketleri daha güçlüdür ve fekal maddeyi hızlı bir şekilde rektuma taşımaya yararmaktadır [12-19].

2.2.2. Kolon kanseri oluşumu

En sık görülen gastrointestinal sistem kanseri olan kolorektal kanser gelişimi kötü bağırsak iltihabı hastalığı, polipler, genetik faktörler ve yaşlanma ile ilişkilidir. Kolorektal kanser tanısı konan hastaların %90'ı 50 yaşından büyüktür; bununla birlikte, bu patoloji, beslenme alışkanlıkları (yüksek yağ ve protein oranı yüksek), obezite, hareketsizlik, sigara içme gibi risk faktörleri nedeniyle genç hastalarda da teşhis edilmektedir. Genç yaşlarda teşhis edilen hastalarda hastalık daha agresifdir. Tümörler genellikle rektumda (%37) lokalizedir. Sigmoidal (%31), artan kolon (%9), çekum (%8), inen kolon (%5) ve transvers kolonda (%4) daha az görülür [17].

Kolorektal kanser (CRC) oluşumu genel olarak normal bir kolorektal epitelin spesifik onkogenlerde ve/veya tümör baskılayıcı genlerde sıralı genetik birikimiyle iyi huylu bir polip oluşumuyla başlamakta ve daha sonra invazif ve metastatik tümörlere yol açan çok sayıda genetik ve epigenetik anormalliklerin kademeli olarak birikmesiyle ilerlemektedir. Bir polipten kanser oluşumu ortalama 8-10 yıl kadar sürmektedir. Kolorektal kanserli hastalarda klinik tablo, polipin bulunduğu yer veya büyüklüğünün yanı sıra metastazların varlığına veya yokluğuna bağlıdır.



Şekil 2.7. Bir polipten kanser oluşumu [16]

CRC vakalarının yaklaşık %65'i aile öyküsü veya belirgin genetik yatkınlık olmadan oluşur. Kalan %35'lik kısım bir aile veya kişisel kolorektal neoplazi öyküsü veya ilişkili tıbbi durumlar (örneğin, enflamatuvar barsak hastalığı) nedeniyle kalıtsal yatkınlıktan kaynaklanmaktadır. Bunun ancak %5-7 kadarı tamamen kalıtsaldır. 60 yaşından önce kolorektal kanser veya kolon polipleri ile teşhis konulmuşsa veya ayrıca iki veya daha fazla birinci dereceden akrabalarına kanser veya polip teşhisi konulmuşsa hastanın pozitif ailesel öyküsü olduğu kabul edilir [15-18].

2.2.3. Kolon kanseri tedavi yöntemleri

Kolon kanserinde de diğer tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi uygun tedaviyi belirlemeden önce doğru evreleme büyük önem taşımaktadır. Hasta için hangi tedavi şeklinin en yararlı olacağına kanserin yeri, evresi ve hastanın diğer sağlık sorunları karar vermektedir. Herhangi bir kanser için tek bir tedavi yoktur. Kolon kanseri için en yaygın seçenekler geleneksel kanser tedavi yöntemleri olan cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisidir. Tedavinin amacı kanseri çıkarmak, yayılmasını önlemek ve rahatsız edici semptomları azaltmaktır [22, 23].

Tablo 2.2. Kolon kanseri evrelerine göre kullanılan tedavi yöntemleri

EVRE	TEDAVİ YÖNTEMİ
Evre 0	Polipektomi Lokal eksüzyon Laparoskopik kolektomi
Evre 1	Lokal eksüzyon Laparoskopik veya kısmi kolektomi Ameliyat
Evre 2	Kısmi kolektomi Ameliyat Ameliyat ve sonrasında kemoterapi
Evre 3	Kısmi kolektomi Ameliyat Ameliyat ve sonrasında kemoterapi Radyoterapi Kemoradyoterapi
Evre 4	Kemoterapi ile küçültüp sonrasında ameliyat ve tekrar kemoterapi Ablasyon veya embolizasyon Kolektomi İmmünoterapi
Lokal Nüks	Kemoterapi Ameliyat Kemoterapi ile küçültüp sonrasında ameliyat
Uzak Rekürans	Ameliyat Kemoterapi ile küçültüp sonrasında ameliyat Ablasyon veya embolizasyon İmmünoterapi

2.2.3.1. Cerrahi yöntemler

Cerrahi çok fazla yayılmamış, metastaz belirtisi görülmemiş kolorektal kanser için en yaygın tedavidir [22]. Cerrahi tedavi primer lezyona ek olarak çevredeki drenaj lenf nodlarının çıkarılmasını sağlayabilen tek yöntemdir, lenf nodlarının çıkarılması tedavinin iyileştirici olması için önem taşımaktadır [23]. Bazı erken evre kolon kanserleri ve poliplerin çoğu minimal invaziv yöntemlerle çıkarılabilmektedir. Minimal invaziv cerrahi yöntemler;

Polipektomi; Kanser küçük, lokalize, tamamen bir polip içinde ve çok erken bir aşamada ise polipi bir elektrokoter kullanarak elektrik akımıyla kolon duvarından kesmek için kolonoskoptan bir tel halka geçirilerek yapılmaktadır [24]. Erken evredeki çoğu polip küçüktür ve malign değildir. Bu nedenle tüm kolonoskopistler

tarafından polipektomiye uygundur. 20 mm den küçük polipler için bu tedavi yöntemi uygulanabilmektedir [23].

Polipektominin hedefleri, tam ve güvenli polip rezeksiyonu sağlamak ve çıkarılan polipin histolojik analiz için alınmasıdır [25]. Her ne kadar genellikle güvenli bir prosedür olarak görülse de, risksiz değildir. Özellikle perforasyon veya kanama en sık polipektomi yapılan hastalarda görülmektedir. Kanama prosedür sırasında veya prosedürün tamamlanmasından bir süre sonra (1-2 hafta içinde) meydana gelebilmektedir. Prosedür sırasında meydana gelen kanamaların polipektomi sırasında polip damarlarının yetersiz koterizasyonundan kaynaklandığı, gecikmeli kanamanın ise polip alındıktan sonra yaranın altında kalan bir damarın koter kaynaklı zarar görmesi sonucu olduğu düşünülmektedir [24].

Lokal Eksizyon; Polipektomiden biraz daha karmaşık bir işlemdir. Kolonoskopta, kolonun iç astarındaki küçük kanserleri ve kolon duvarındaki polipin çevresindeki sağlıklı dokuyu çıkarmak için anüsten içeri bir tüp göndererek ve bu tüp içinden kanserli bölgeye girilen cerrahi aletlerle bölgedeki kanseri almayı hedefleyen minimal invaziv bir yöntemdir. Anüsten en fazla 15 cm uzaklıktaki tümörlere erişilebilmektedir [28]. Lokal eksizyon, bağırsak çevresinin %30'undan fazlasını işgal etmeyen, 3 cm'den daha büyük olmayan ve hareketli olan tümörler için uygulanabilmektedir [29].

Genel olarak, submukoza (T1) izole edilmiş, düşük riskli histopatolojik özelliklerle orta derecede farklılaşmış tümörler için kullanılmaktadır. 1989-2003 yılları arasında T2 rektal kanseri tedavisinde lokal eksizyon kullanımında ABD'de neredeyse %50 artış olmuştur. Lokal eksizyon artık T1 tümörlerinin genel olarak kabul edilebilir bir tedavisi olmakla birlikte, uygulanması T2'ye genişletilmiştir. Ancak T2 tümörlerinin transanal eksizyonu, T1 lezyonlarına kıyasla neredeyse iki kat lokal nüks oranı taşımaktadır [25, 27]. Bu oran tümörün tam olarak alınamamasından kaynaklanmaktadır.

Laparoskopik Kolektomi; Erken evre kanserler, kolektomi sırasında kolonun sadece küçük bir bölümünün çıkarılmasıyla tedavi edilebilmektedir. Minimal invaziv kolektomi olarak da adlandırılan laparoskopik kolektomi, karında birkaç küçük kesi içermektedir. Cerrahın, bir insizyondan küçük bir video kamera ve diğer insizyonlardan özel cerrahi aletler geçirerek kolonu bir kesiden dışarı çıkarıp vücudun dışındaki kolonda tedaviyi gerçekleştirildiği bir prosedürdür. Kolon üzerinde onarım yapıldıktan sonra, cerrah kesi yoluyla kolonu tekrar yerleştirir. Bu işlemten sonra bildirilen nüks düşüktür [30-32].

Yayılım göstermiş daha ileri evre metastaz belirtisi olmayan, derin invazyonlu polipler için yukarıdaki minimal invaziv yöntemler yeterli olmamaktadır ve ameliyat veya açık kolektomi gibi diğer lokal tedaviler gerekmektedir. İnvaziv cerrahi yöntemler;

Açık kolektomi; Daha ileri bir aşamadaki kanserler, kolonun daha fazlasının çıkarılmasını gerektirebilmektedir. Bu noktada laparoskopik kolektomi pek faydalı sonuçlar vermemektedir. Açık kolektomi laparoskopik kolektomiye kıyasla invaziv bir yöntemdir ve açık cerrahi gerektirir. Kolona erişmek için karında daha uzun bir kesi yaparak cerrahın kanserden kurtulmak için kolonun bir kısmını veya tüm kolonu keserek gerçekleştirdiği bir prosedürdür [32, 33]. Çeşitli açık kolektomi operasyonları vardır:

- Total kolektomi, tüm kolonun çıkarılmasını içerir.
- Kısmi kolektomi (subtotal kolektomi), kolonun bir kısmının çıkarılmasını içerir.
- Hemikolektomi, kolonun sağ veya sol kısmının çıkarılmasını içerir.
- Proktokolektomi, hem kolonun hem de rektumun çıkarılmasını içerir [30, 31].

Cerrahi (Ameliyat); Kolon kanseri olan hastalar için standart tedavilerden biridir. Lokalize tümörler için primer ve bölgesel lenf nodlarının açık cerrahi rezeksiyonu önem taşımaktadır. İleri evre metastaz belirtisi görülmeyen sadece karaciğer ve

akciğerde rezektabl (kesip çıkarılabilir) metastaz gelişen hastaların %25 ile %40'ında cerrahi iyileştirici olmaktadır [34].

2.2.3.2. Ablatif yöntemler

Ablatif yöntemler kolorektal metastazı genellikle karaciğerde sınırlı olan hastalar için kullanılan bir tedavi seçeneğidir. İdeal olarak, hastalar karaciğerde üç veya daha az lezyona sahip olduğunda ve her bir lezyon en fazla üç santimetre çapında olduğu durumlarda kullanılabilir. Ablatif terapiler arasında radyofrekans ablasyonu, mikrodalga ablasyonu ve kriyoablasyon bulunur [35].

Radyofrekans ablasyonu (RFA); Kolorektal karaciğer metastazlarının tedavisi için incelenen ablatif teknik olan RFA, karaciğer tümörlerinin tedavisinde kullanılabilecek bir başka minimal invaziv prosedürdür [35, 36]. RFA frekansı 900 kHz'den düşük olan elektromanyetik enerji kullanmaktadır. Koagülasyon nekrozu, hedef lezyona bir elektrot sokularak ve yüksek frekans değiştirici akım uygulanarak elde edilmektedir. Bu iyonlaşma ve sürtünmeyi indüklemektedir. 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklar elektrik empedansını arttırmakta ve uygulanabilecek enerji miktarını sınırlamaktadır. Bu, salin infüzyonu ve soğutulmuş ıslak elektrotlar kullanılarak önlenilmektedir. RFA probu genellikle ultrason veya CT gibi görüntü kılavuzluğunda kullanılmaktadır [36].

2001 yılında Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan bu tedavi şekli ile 3 cm'den küçük 3 veya daha az lezyonu olan iyi seçilmiş hastalarda % 33'e kadar 5 yıllık sağkalım bildirilmiştir. RFA sonrası lokal nüks için en önemli faktör tümör boyutudur ve daha büyük lezyonlar lokal başarısızlık için daha yüksek risk altındadır [35].

Mikrodalga ablasyonu (MWA); Son yıllarda MWA, kolorektal karaciğer metastazlarının tedavisi için yeni bir ablatif tedavi seçeneği olarak çıkmıştır [18]. Lezyon içine yerleştirilen iğne benzeri proplardan 900 ile 2450 MHz aralığında elektromanyetik radyasyon oluşumuna dayanmaktadır. RFA gibi diğer ablatif

tekniklerle kıyaslandığında MWA, birden fazla iğne prop kullanarak daha büyük lezyonları tedavi etme yeteneği ile daha düzgün doku ısınmasına yol açabilmektedir. Ayrıca daha az doku kömürleşmesi gerçekleştirmektedir. Cilt yanıklarına bağlı bir risk taşıyan topraklama pedlerine olan ihtiyacın ortadan kaldırılması ve daha kısa prosedür süreleri mikrodalga ablasyonunun ek avantajlarından [38]. MWA genellikle ultrason veya BT kılavuzluğu altında yapılmaktadır [36].

Kriyoablasyon; Malign tümörlerin tedavisinde kullanılan ablatif tekniklerin en eskisidir ve günümüzde popülerliğini yitirmiştir. Kriyoablasyonda, tümörü dondurmak için sıvı oksijen veya azot kullanılır [31]. Doku sıcaklıkları -40°C 'ye düşürülür ve prob konfigürasyonuna bağlı olarak çeşitli boyutlarda bir buz topu oluşturulur. Buz topunun içinde -40 ile 0°C arasında değişen öngörülebilir termal bölgeler vardır. Doku ölümü -20 ile -40°C 'de meydana gelmektedir [37].

Kriyoablasyondan sonra bitişik vasküler yapılarda canlı hücre kalmaktadır, böylece daha fazla metastaz ve hasta zararına yol açabilmektedir. MWA ve RFA gibi diğer ablasyon seçeneklerinde bu gerçekleşmez. Bu nedenle, lokal bir ablatif prosedür belirtilirse kriyoablasyondan ziyade termal ablasyon teknikleri kullanılmalıdır [38].

2.2.3.3. Embolizasyon

Embolizasyon, ablasyon ile tedavi edilemeyecek kadar genellikle 5 cm'den daha büyük olan tümörler için kullanılabilir. Ablasyon ile birlikte de kullanılabilir. Bir embolizasyon prosedürü sırasında, karaciğerdeki kanser hücrelerine kan akışını engellemeye veya azaltmaya çalışmak için maddeler kan damarlarına enjekte edilir. Karaciğer metastazı göstermiş kolorektal kanseri tedavi etmek için kullanılan 3 ana embolizasyon prosedür türü vardır.

Transarteriyel embolizasyon (TAE); Kateter bazlı bir lokasyon tedavisidir. Kateter iç uyluktaki küçük bir kesimle artere yerleştirilerek karaciğerdeki hepatik artere geçirilmektedir. Böylece hepatik artere embolize edici materyaller uygulanarak

gerçekleştirilen bir tedavidir. TAE'nin amacı, tümör nekrozu ile sonuçlanan bir toplam arteriyel tıkanması oluşturmaktır [36].

Kemoembolizasyon(TACE); Hepatik arter yoluyla basit bir şekilde sadece embolize edici materyallerin verilmesinin aksine kemoterapötik ajanların mikrokürelere gömülü olarak verilmesi ile birleştirilmiş bir lokal tedavi şeklidir. TACE ayrıca, tümörü besleyen artere doğrudan yerleştirilen bir kateterden kemoterapi verilerek, ardından arteri tıkatarak da yapılabilmektedir [35].

Radyoembolizasyon; TACE ile aynı fizyolojik prensibi kullanmaktadır. Radyoembolizasyon, reçineye veya cam mikrokürelere gömülü radyoaktif beta yayıcı ile tümörün doğrudan yakınına radyasyon uygulanmasını baz alan lokal bir tedavi şeklidir. Bu sayede daha yüksek radyoaktif dozlar elde edilebilmektedir. Radyasyon çok kısa bir mesafe kat ettiğinden sağlıklı doku daha az radyasyon emmektedir [35, 37].

2.2.3.4. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi kolon kanseri tedavisinde kullanımı çok yaygın değildir, ancak ameliyattan önce tümörü küçültmek amacıyla, ameliyat sonrasında kanser bir iç organa veya karnın astarına yapışmışsa, ameliyat sırasında, tümörün bulunduğu bölgeye geride bırakılabilecek kanser hücrelerini öldürmek için kullanılabilmektedir. Ayrıca hareketsiz bölgelerdeki tümör yerleşimi, lokal perforasyon ve T4 veya T3 evre (N1-N2 artan ve/veya inen kolon) gibi bazı yüksek riskli gruplarda kullanılmaktadır [34].

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini yok etmek için yüksek enerjili ışınlar (x-ışınları gibi) ile tümörlü olarak belirlenen bölgeyi hedef alan bir tedavi yöntemidir. Rektal kanserli hastaları tedavi etmek için kolon kanseri olanlara göre daha sık kullanılır. Bazı kolon ve rektal kanserler için kemoterapiyle aynı anda tedavi etmek radyasyon tedavisini daha da iyi hale getirebilir [41]. Bu 2 tedavinin birlikte kullanılmasına “kemoradyoterapi” denir [42].

2.2.3.5. Kemoterapi

Kemoterapi, kanserli hücreleri öldürmek için güçlü kimyasallar kullanan bir ilaç tedavisidir. Sistemik olarak intravenöz ya da oral yolla alınabilmektedir. Lokal şekilde doğrudan vücudun bir bölgesine, tümörü besleyen bir damara veya artere, doğrudan kansere veya ameliyattan sonra kanserin olduğu yere de enjekte edilebilmektedir [34, 43]. Kemoterapi ilaçları çok ağır ilaçlar olduğundan vücudun iyileşmesi için dinlenme periyodu ile birlikte verilmektedir. Mide bulantısı, kusma, iştah kaybı, yorgunluk, ağrı gibi yaşam kalitesini düşüren birçok yan etkisi vardır.

Kolorektal kanser için klinikte yaygın olarak kullanılan kemoterapik ilaçlar 5-Florourasil (5-FU), kapesitabin (Xeloda), irinotecan (Camptosar), oksaliplatin (Eloksatin), trifluridin ve tipracil (Lonsurf)'dir. Hangi kemoterapi ilaçlarının kullanılacağı kanser türü, kanserin evresi, genel sağlık ve önceki kanser tedavilerine göre değişkenlik göstermektedir [46].

2.2.3.6. İmmünoterapi

Vücudun kanserle savaşmak için doğal savunmasını güçlendirmek için tasarlanmıştır. Bağışıklık sistemi işlevini iyileştirmek, hedeflemek veya geri yüklemek için vücut tarafından veya laboratuvarda yapılan malzemeleri kullanır. Kontrol noktası inhibitörleri, kolorektal kanseri tedavi etmek için kullanılan önemli bir immünoterapi türüdür. Kontrol noktası inhibitörlerinden pembrolizumab, tümör hücrelerinin bir reseptörü olan PD-1'i hedefleyerek tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden saklanmasını önler metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılır. Nivolumab tedaviden sonra büyüyen veya yayılan metastatik kolorektal kanseri olan insanları tedavi etmek için kullanılır. Nivolumab ve ipilimumab (Yervoy) kontrol noktası inhibitörleri kombinasyonu ve kemoterapi ile tedavi edildikten sonra büyüyen veya yayılan metastatik kolorektal kanserli hastaları tedavi etmek için onaylanmıştır [45]. İmmünoterapi, daha hedefli, potansiyel olarak daha az toksik bir terapi olarak ümit vaat ediyor [44].

Tablo 2.3. Geleneksel tedavi yöntemlerinin yan etkileri

Geleneksel Tedavi yöntemi	Yan Etkileri
Cerrahi	Ameliyatın olası riskleri ve yan etkileri, Kanama, Enfeksiyon, Bacaklardaki kan pıhtıları
Ablasyon ve Embolizasyon	Karın (karın) ağrısı, Karaciğerde enfeksiyon, Göğüs boşluğunda veya karında kanama, Ciddi komplikasyonlar, Safra kesesi iltihabı, Karaciğerin ana kan damarlarında kan pıhtıları
Radyasyon	Cilt tahrişi, Ameliyattan önce radyasyon verilirse yara iyileşmesi ile ilgili sorunlar, Mide bulantısı, İshal, Ağrılı bağırsak hareketleri veya dışkıda kana neden olabilecek rektal tahriş, Bağırsak inkontinansı (dışkı kaçağı), Mesane tahrişi, Yorgunluk, Tedavi edilen bölgedeki dokuların birbirine yapışmasına neden olan adezyonlar
Kemoterapi	Saç kaybı, Ağız yaraları, İştah kaybı, Mide bulantısı ve kusma, İshal, enfeksiyon, Kolay morarma veya kanama, yorgunluk
İmmünoterapi	Yorgunluk, İshal, Deri döküntüsü ve kaşıntıdır.

Kanser tedavilerindeki temel zorluklar, tedavi sağlıklı dokuları veya organları etkilediğinde ciddi yan etkiler oluşturmalarıdır. Biyolojik ajanlar metastatik vakaların tedavisinde önemli bir rol oynamıştır ve bu seçim tümörün genetik analizi ile giderek daha fazla yönlendirilmektedir. Tümör biyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayan ve

yeni nesil hedefli ilaçların tasarımına yol açan temel araştırmalardaki ilerlemelerle fotodinamik tedavi mevcut tedavi yöntemlerine umut verici alternatif bir tedavi yöntemidir [31].

2.3. Fotodinamik Tedavi

2.3.1. Fotodinamik tedavi tarihçesi

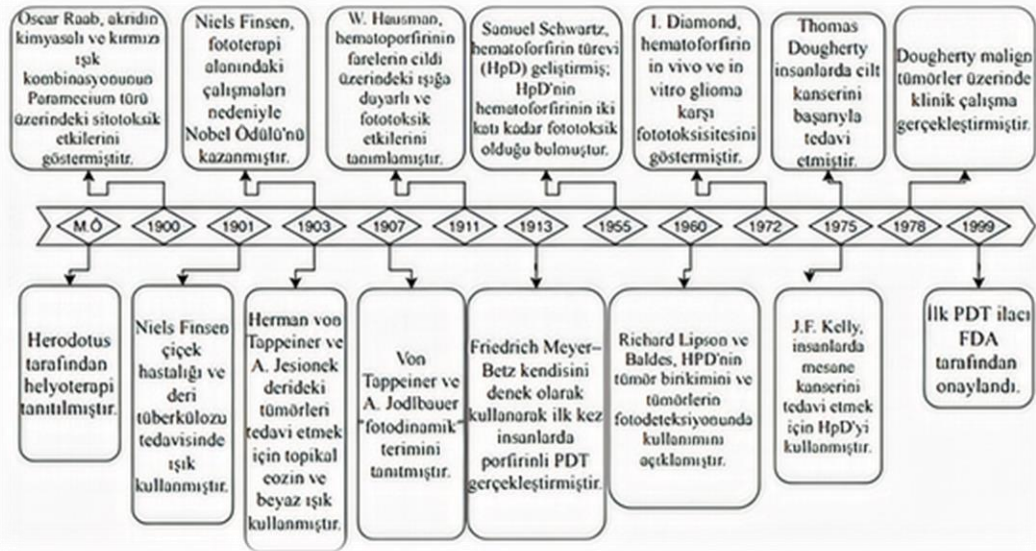
Işık, yüzyıllardır terapötik bir ajan olarak Antik Mısır, Hindistan ve Çin’de sedef hastalığı, raşitizm, vitiligo ve cilt kanseri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır [47,48]. Bilinen en eski raporlarından biri, 3000 yıl önce ünlü Yunan hekimi Herodotus tarafından tanıtılan “helyoterapi” dir. 18. yüzyılın sonlarına kadar güneşe maruz kalmanın faydalı etkileri araştırılmış ve bir 19. yüzyıl doktoru olan Cauvin, 1815’te güneş ışığının skrofula, raşitizm, iskorbüt, romatizma, felç, şişlikler, kas ve zayıflık için iyileştirici bir ajan olduğunu söylemiştir [48, 49]. 19.yüzyılın sonunda Danimarkalı hekim Niels Finsen, kırmızı ışık kullanarak çiçek hastalığı püstüllerinin oluşumunu ve akıntısını önlediğini, kırmızı ışığın bu hastalığı tedavi etmek için kullanılabileceğini göstererek fototerapiyi daha da geliştirmiştir. Ayrıca deri tüberkülozunun tedavisinde ultraviyole ışık kullanımının bu hastalığın iyileştirilmesindeki etkilerini göstererek 1903 yılında Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüştür [47, 48]. Günümüzde fototerapi sedef hastalığı gibi bazı dermatolojik hastalıkların tedavisinde, yeni doğan bebeklerde görülen sarılık tedavisinde ve psikiyatride kullanılmaktadır [50].

100 yıldan uzun bir süre önce, araştırmacılar ayrıca ışık ve bazı kimyasalların bir kombinasyonunun hücre ölümüne neden olabileceğini gözlemlemişlerdir. 1900’de Alman tıp öğrencisi Oscar Raab, bazı dalga boylarının akridin kimyasalı varlığında Paramecium türü de dahil olmak üzere infusoria için öldürücü olduğunu bildirdirmiştir. Bu etkinin, ışığın bitkilerde görülene benzer şekilde klorofil tarafından emilmesinden sonra enerjinin ışıktan kimyasal maddeye aktarılmasından kaynaklandığını ileri sürmüştür. Aynı yıl Fransız nörolog J. Prime, epilepsi tedavisinde oral olarak eozin alımının ardından güneş ışığına maruz kalan bölgelerde

deri iltihabının oluştuğunu keşfetmiştir. Daha sonra 1903'te Herman Von Tappeiner ve A. Jesionek, topikal olarak uygulanan eozinin beyaz ışıkla tedavisinde cilt tümörlerini iyileştirdiğini gözlemledi ve 1907'de bu fenomeni tanımlamak için “fotodinamik eylem” terimini tanıttılar [47, 48].

Şimdiye kadar üzerinde en çok çalışılan kimyasallar, 19.yüzyılın ortalarında tanımlanan porfirinlerdir. W. Hausman, Paramecium ve kırmızı kan hücrelerini hematofofirin ve ışıkla tedavi etmiş ve bu kombinasyonun hücreleri öldürdüğünü bildirmiştir. Ek olarak, hematofofirin uygulamasından sonra ışığa maruz kalan farelerde cilt reaksiyonları rapor etmiştir. 1913'te Alman bilim adamı Friedrich Meyer-Betz, HpD'nin kendi cildi üzerindeki etkilerini test eden ilk kişi olmuştur. 200 mg Hematofofirini vücuduna enjekte etmiş 2 ay boyunca güneş ışığına maruz kaldığında fototoksik reaksiyonlar yaşamıştır [47-52].

1960'larda Richard Lipson ve arkadaşları modern FDT dönemini başlatmıştır. 1972'de I. Diamond ve meslektaşları Porfirinlerin tümör lokalizasyonu ve tümör-fototoksik özelliklerinin kombinasyonunun kanser hücrelerini öldürmek için kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. 1975'te Thomas Dougherty ve arkadaşları, hematofofirin ve kırmızı ışığın uygulanmasının farelerde meme tümörü büyümesini tamamen ortadan kaldırdığını bildirdiğinde önemli bir atılım gerçekleştirmişlerdir. Aynı yıl, J.F. Kelly ve arkadaşları, HPD'nin hafif aktivasyonunun farelerde mesane karsinomunu da ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir [47, 51, 53]. 1993 yılında ise ilk defa fotodinamik tedavide kullanılan fotoduyarlı madde olarak Photofrin® (porfimer sodium) Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration (FDA)) tarafından onaylanmıştır. Bu tarihten itibaren yapılan birçok yeni çalışma ile gelişen fotodinamik tedavibirçok kanser türü ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmış alternatif bir tedavi yöntemidir [54].

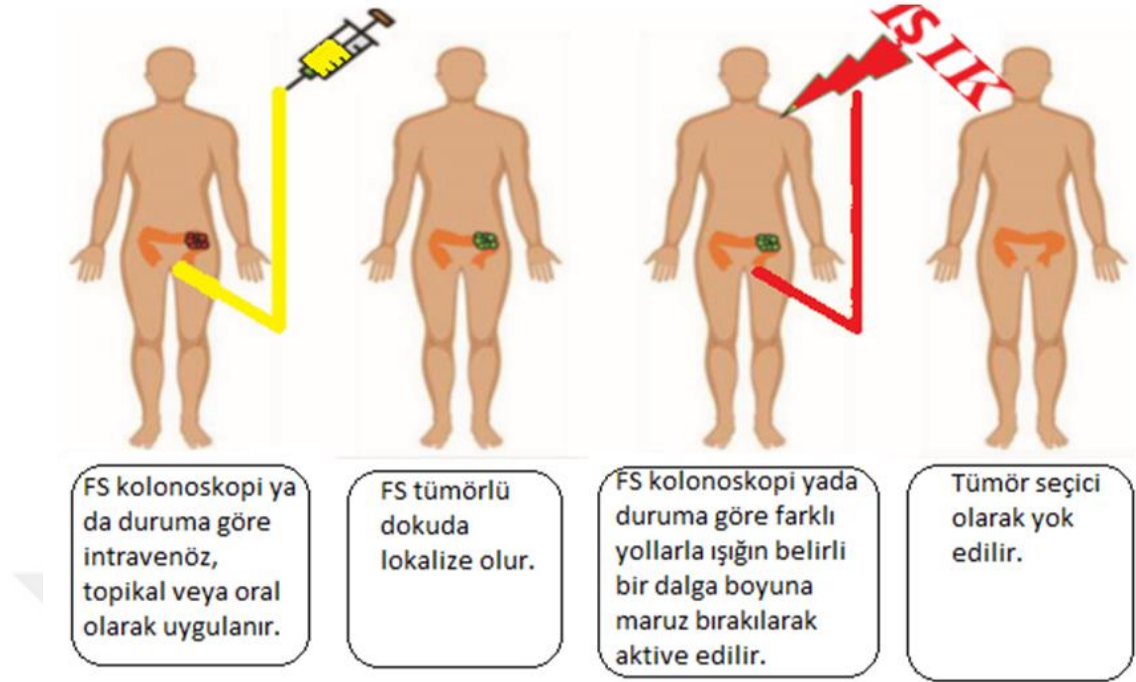


Şekil 2.8. FDT tarihçesi

2.3.2. Fotodinamik tedavi prosedürü

Fotodinamik terapi, malign tümörler, enfeksiyonlar ve diğer lezyonlara seçici sitotoksik aktivite uygulayabilen klinik olarak onaylanmış minimal invaziv bir tedavi prosedürüdür. Prosedür, fotosensitizer adı verilen ışığa duyarlı bir maddenin vücuda sistemik, lokal veya topikal olarak verilmesini ve ardından FS'nin bir absorbans bandına karşılık gelen dalga boyunda ışınlanmasını içermektedir. Oksijen varlığında, bir dizi olay doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikrovaskülatürde hasara ve lokal bir enflamatuvar reaksiyonun indüklenmesine yol açmaktadır.

FDT; fotosensitizer, ışık ve oksijen olmak üzere 3 temel bileşenden oluşmaktadır. Bunların hiçbirisi tek başına toksik değildir, ancak üçü birlikte tekli oksijen ($^1O_2$) veya reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilen yüksek derecede reaktif ürünlerin oluşumuyla sonuçlanan bir fotokimyasal reaksiyon başlatarak hızla hücre ölümüne yol açan önemli toksisiteye neden olmaktadır [55, 56].



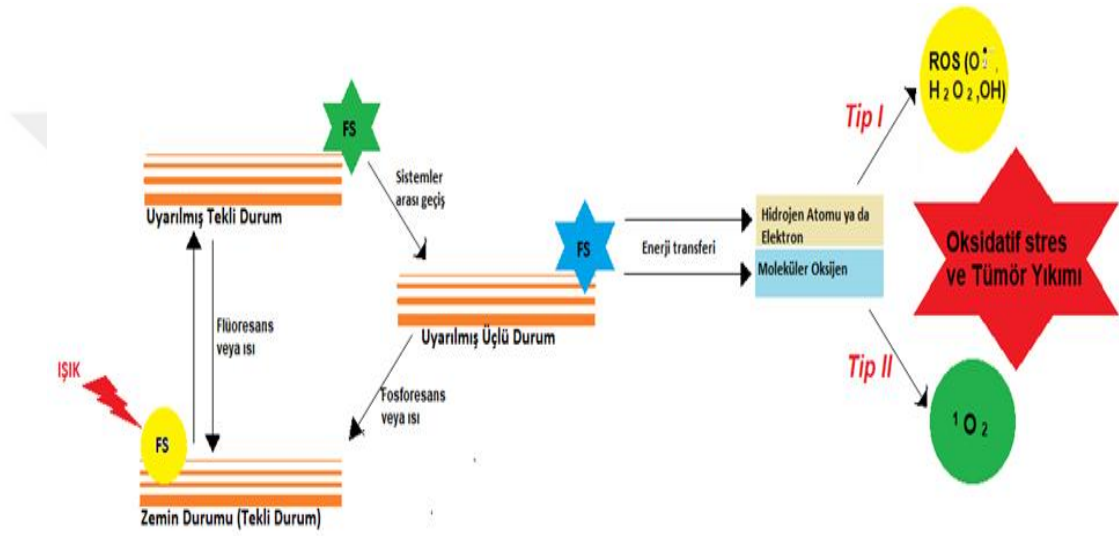
Şekil 2.9. FDT uygulama protokolü

FDT, dünya çapında artan ilgi gören bir tekniktir. Birçok kanser için kullanılmaktadır [57]. Kolorektal kanser; endoskopi, kolonoskopi, lokal eksüzyon gibi yöntemler kullanılarak kolona kolayca erişilebildiğinden bu onkolojik FDT tedavisi formu mümkündür. Bu nedenle kolonoskopi endoskopları, FS ilaçlarını doğrudan tümör bölgelerine iletebilmekte ayrıca FS ilacını aktive etmek için kullanılan ışık kaynağını da kolayca tümör bölgesine iletebilmektedir. FDT'nin kanser hücrelerini başarıyla yok etme kabiliyeti, hedef hücrelerde ROS üretiminin etkinliğine bağlıdır [58].

2.3.3. Fotodinamik tedavi fotokimyası

FDT, biyolojik etki yaratmak için fotofiziksel ve fotokimyasal süreçleri birleştirmektedir. FS'nin ışıkla uyarılması, hücresel substratlar veya sonunda kanser hücrelerinin ölümüne yol açan moleküler oksijen ile fotokimyasal reaksiyonları içermektedir. Genellikle, zemin durumundaki (tekli durum) FS, düşük enerjili moleküler orbitalde zıt spinlerde iki elektrona sahiptir. Işığın emilmesinin ardından, bu elektronlardan biri dönüşünü değiştirmeden daha yüksek enerjili moleküler orbitale aktarılmaktadır. Buna “tekli uyarılmış durum” denir ve tekli uyarılmış

durumda FS çok kararsızdır ve ömrü çok kısa (nano'dan piko sn'ye kadar) olduğu için hücresel substratlarla reaksiyonlara katılamamaktadır. Zemin durumuna geri dönmek için, ya flüoresans şeklinde enerji yaymakta ya da dahili dönüşüm yoluyla ısı enerjisini serbest bırakarak ısı yaymaktadır. Aksi takdirde, uyarılmış tekli durum kendiliğinden sistemler arası geçişe girebilmekte ve uyarılmış elektronun ters çevrilmiş dönüşüyle nispeten uzun ömürlü (daha kararlı) bir üçlü durum oluşturmaktadır. Üçlü durumdaki FS zemin durumuna geri dönebilmek için enerjisini, fosforesans veya ısı formunda enerji salarak dağıtmaktadır [59, 60].



Şekil 2.10. FDT aksiyon mekanizması

FDT'deki hücre ölümüne tip I ve tip II olmak üzere iki tip fotokimyasal reaksiyon aracılık etmektedir. Tip I reaksiyonunda, üçlü durumdaki FS enerjisini ortamdaki hidrojen atomuna veya elektrona transfer ederek ROS (hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikali gibi) oluşturmaktadır. Tip II reaksiyonunda, doğrudan moleküler oksijene transfer ederek tekli oksijen oluşturmaktadır. Böylece, ışığa duyarlılaştırıcılar tip I veya tip II reaksiyon kullanarak veya aynı anda her iki tip reaksiyon mekanizmasını kullanarak kanser hücrelerini öldürebilmektedir. Tekli uyarılmış durumda FS, ömrü çok kısa (nano ile pico sn arasında) olduğu için hücresel substratlarla reaksiyonlara katılamaz, oysa nispeten daha uzun ömürlü (mikro ile mili sn arasında değişen) üçlü durumdaki FS bu reaksiyonları etkili bir şekilde gerçekleştirebilmektedir [59, 61]. Kullanılan fotoduyarlı maddenin türüne, ortamdaki oksijen ve substrat yoğunluğuna bağlı olarak Tip I ve Tip II reaksiyonların

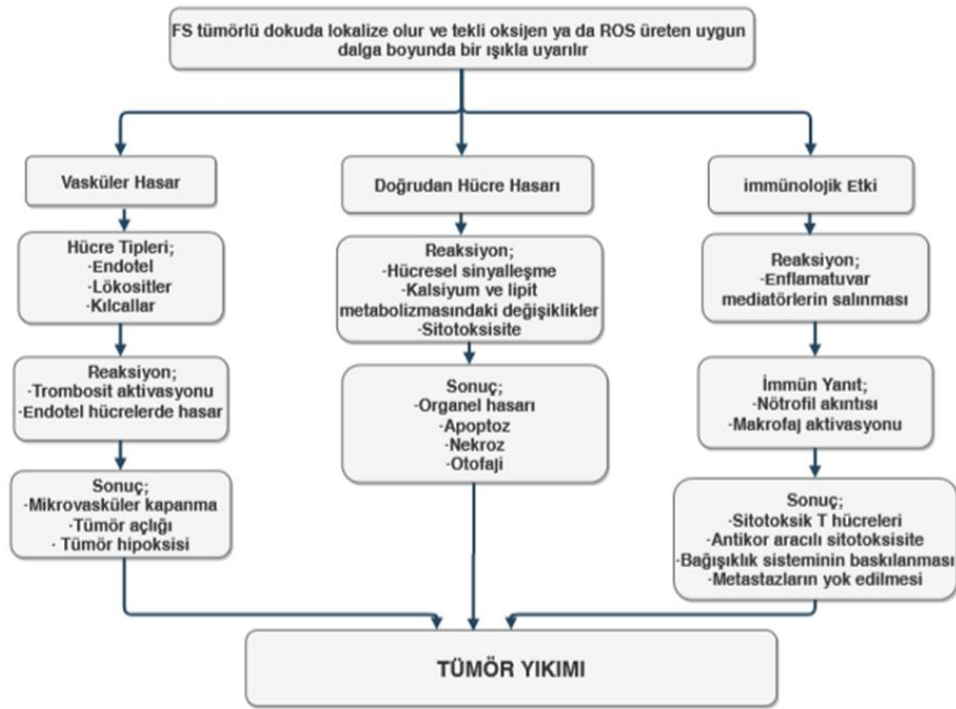
gerçekleşme oranları değişiklik göstermektedir. Her iki reaksiyon sonucunda da hücre ölümü gerçekleşmektedir ancak fotodinamik tedavide genellikle daha basit bir mekanizmaya sahip olan Tip II reaksiyonu gerçekleşmektedir [62].

Yüksek enerji formunda bulunan reaktif oksijen türleri ortamdaki aminoasit kalıntıları, lipitler, nükleik asitler gibi hücre elemanlarından biriyle etkileşimde bulunarak mitokondriyal kökenli apoptozis veya vasküler endotel hasara sebebiyet vererek kanserli hücrenin ölümüne neden olur [62].

2.3.4. Fotodinamik tedavide tümör imha mekanizmaları

Kan dolaşımına bir FS enjekte edildiğinde, çeşitli serum proteinlerine bağlanır sonra endotel hücrelerine aktarılır ve damarların dış çeperine geçer. Bu adımdan sonra, ışığa duyarlı hale getirici hücre dışı matrise bağlanabilmekte veya tümör hücreleri içinde lokalize olabilmektedir. Bu biyolojik dağılımdaki son adım, ışığa duyarlılaştırıcının hedef bölgeden lenfatikler veya kan damarları ile temizlenmesi ve böbrekler veya karaciğer tarafından atılmasıdır. FDT'nin tümörler üzerindeki nihai etkisi büyük ölçüde ışığının hangi aşamada verildiğine bağlıdır ve bu da sonuçta bu tümör yıkımının genel başarısını belirleyecektir [67].

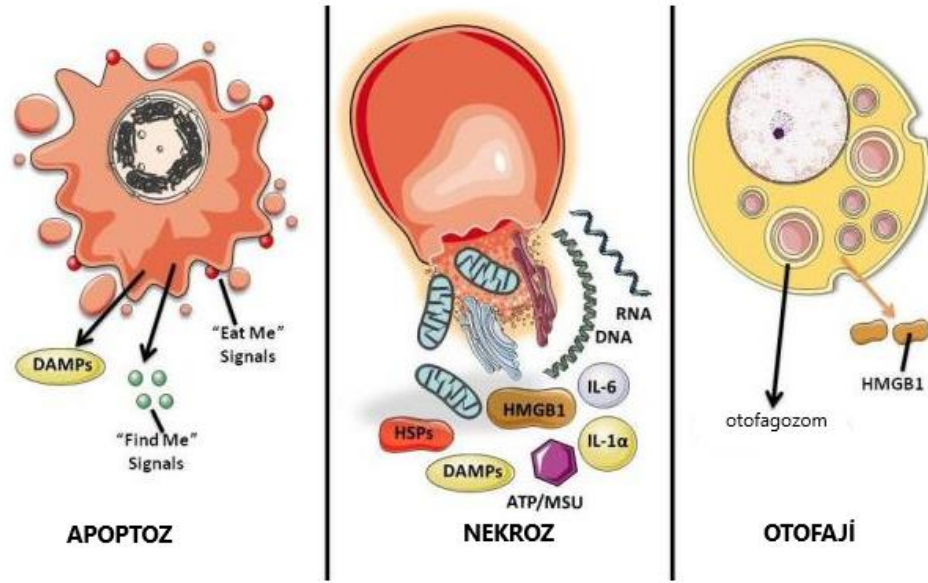
FDT, hücrelerde birçok hücreyel ve moleküler sinyal yolu olayını tetiklemesine rağmen, asıl amacı hücre ölümünü indüklemektir [63]. FDT ile tedavi edildiğinde tümör yıkımına katkıda bulunan üç farklı mekanizma tanımlanmıştır (Şekil 2.11.). İlk olarak açığa çıkan ROS, tümör hücrelerini doğrudan apoptoz veya nekroz ile öldürebilmektedir. Ayrıca FDT, tümörle ilişkili vasküler sisteme zarar vermektedir. Tümör kan damarlarında tromboz ve kanamaya yol açmakta bu da tümörün oksijensiz ve besinsiz kalmasını sağlayarak tümör yıkımına sebep olabilmektedir. Son olarak, FDT ile tümörde indüklenen sitokinlerin ve proteinlerin akut iltihabı ve salınması, hem tümör yıkımına katkıda bulunmakta hem de bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanıması ve yok etmesi için uyarabilen lökositlerin istilasına yol açabilmektedir. Bu üç mekanizma da birbirini etkileyebilmektedir [64, 65].



Şekil 2.11. Tümör imha mekanizmaları

2.3.4.1. Doğrudan hücre hasarı

Fotodinamik terapi sırasında oluşan tekil oksijen ve hidroksil radikalleri çok reaktif ve kısa ömürlüdürler. Tekil oksijenin ömrü 0.04 mikrosaniyeden kısa olup 0.02 μm çapında etkilidir [68]. Bu nedenle, FS'nin hücre içi konumunda veya çok yakınında fotodinamik hasar meydana gelmektedir. Bunlar fotodinamik tedavinin doğrudan etkilerini göstermektedir. FDT, 3 ana hücre ölüm yolunu uyandırabilir: apoptotik, nekrotik ve otofaji ile ilişkili hücre ölümü Şekil 2.12.'deki gibi gerçekleşmektedir [64]. FS'nin konsantrasyonu, fizyokimyasal özellikleri ve hücre altı konumu, oksijen konsantrasyonu, ışığın uygun dalga boyu ve yoğunluğunun yanı sıra hücre tipine özgü özelliklerin tümü doğrudan hücre ölümünün modunu ve kapsamını etkileyebilmektedir [66].



Şekil 2.12. Üç büyük hücre ölümü morfoloji ve immünolojik profilleri [55]

Apoptoz; FDT'de hücre ölümüne yol açan ana mekanizma olarak kabul edilmektedir. Farklı sinyal yollarının neden olduğu hücreyi intihara götüren programlanmış, kontrollü ve enerji tüketen bir hücre ölümü şeklidir [70, 73]. Apoptoz süreci ölüm reseptörlerinin aktivasyonu veya sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı ile başlamaktadır. Her iki olay da sonunda kaspaz -3, -6 ve -7 gibi 'yürütücü kaspazlar' olarak bilinen kaspaz kaskadlarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktif uygulayıcı kaspazlar hücresel substratları ayırmakta, bu da ölmekte olan hücrelerde gözlenen karakteristik biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadır [71]. Bu değişiklikler karakteristik hücresel büzülme, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması, hücre patlaması ve içeriğinden sızıntı olmadan apoptotik cisimlerin oluşumu ile temsil edilmektedir [72].

Hücre sinyal yollarında FDT'nin en önemli hedefi, Bcl-2'nin pro-apoptotik ailesinin aktivasyonudur, çünkü Bcl-2'nin hafif hasarı kanserli hücrelerde apoptozu indüklemektedir. Bcl-2 protein ekspresyonu FDT'ye uygun bir yanıtla ilişkilendirilmiştir ve FDT'de genel kanser yanıtını değerlendirmek için kullanılabilir. Ayrıca, hücre lizati içinde kaspaz 3 ve 9'un güçlü kalıntısının bulunması durumunda, FDT'den sonra yüksek oranda hücre ölümü meydana geldiği ve FDT'nin bunları hücresel ölüm yolu içinde aktive ettiği söylenebilir [65].

Nekroz; Fiziksel veya kimyasal hasar nedeniyle kazara hücre ölümü olarak adlandırılmakta ve genellikle programlanmamış bir süreç olarak kabul edilmektedir [71]. Akut, güçlü, fiziksel veya kimyasal bir hakaret veya kimyasal hakaretin neden olduğu hızlı ve düzensiz bir hücre ölüm şeklidir. Düzenlenmiş hücre ölüm yöntemlerinin aksine pasif bir süreç olarak kabul edilmekte, sinyal yollarıyla protein sentezi, enerji veya düzenleme gerektirmemektedir [72].

Çekirdek büzülmesi, şişmiş sitoplazma ve sitoplazmik zarların ilerleyen parçalanması, hücre parçalanmasına ve materyalin hücre dışı ortama salınmasına yol açmaktadır. Daha yüksek dozlarda FS ve yüksek akıcılık oranlarının, hücreleri nekroza zorlamak ve apoptozu önlemek için daha fazla membran hasarına neden olduğu gözlenmiştir. Buna proteazlar aracılık etmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu FDT sırasında nekrozun ana nedenidir. Nekroz, plazma zarında lokalize olan ışığa duyarlılaştırıcıların neden olduğu hücre ölümünün ana şeklidir. FDT'nin ardından tümör nekroz faktörü ve Fas reseptörleri, kaspaz inhibisyonu koşulları altında reseptör ile etkileşen protein 1'in (RIP1) aktivasyonu yoluyla nekrozu tetiklemektedir [70,71].

Otofaji; Hücrenin hasarlı organellerinin ve sitoplazmasının bir kısmının çift zarlı bir otofagosom içine alındığı kendi kendine parçalanma sürecidir. Otofagosomların lizozomlarla füzyonu, anormal proteinlerin ve organellerin bozulmasını teşvik etmektedir. Otofaji, istenmeyen proteinlerin, organellerin ve istilacı mikroorganizmaların bertaraf edilmesini kolaylaştırmanın yanı sıra, bir hücrenin besinlerini gereksiz süreçlerden açlık veya stres zamanlarında yaşam için gerekli olanlara yeniden tahsis etmesine izin vermektedir. Otofajinin avantajı, hücresel enerji depolarını ve fonksiyonel olmayan organelleri ve proteinleri geri dönüştürebilmesidir. Otofaji yaşlanma, enfeksiyon, açlık ve tümör oluşumu gibi çeşitli sağlık durumlarında ve hastalıklarda rol oynamaktadır. Bununla birlikte, kanserde otofajinin işlevleri biraz tartışmalı görünmektedir. Bir yandan, otofaji kanser ilerlemesi sırasında tümör hücrelerini korurken; diğer yandan kanser hücresi gelişimini baskılamakta hatta hücre ölümünü indüklemektedir [71, 74].

Otofajinin FDT'nin sonucunu nasıl etkilediği hala belirsizdir. Genel olarak memeli hücreleri, otofajiyi hasarlı organellerin hücrelerini temizleyerek ROS aracılı hasara karşı bir savunma olarak kullanırlar. ROS tipi ve oksidatif hasar derecesine bağlı olarak, FDT otofajiyi uyarabilir. Otofaji FDT ile indüklenen apoptozda rol oynayabilir, ancak iki süreç birbirinden bağımsız olarak da ortaya çıkabilir. Otofaji ve apoptoz oranları kanser hücresi tipine, ışığa duyarlılaştırıcıya ve hafif doza bağlıdır [71].

2.3.4.2. Tümör vasküler hasarı

Tümör alanlarının fotoduyarlı maddeye uygun spesifik dalga boyunda bir ışık ile ışınlanması, tümör hücrelerine ve damarlarına zarar veren yüksek sitotoksik ROS üretmektedir. Daha ayrıntılı olarak, ROS, vazoaktif moleküllerin salınmasını, vasküler geçirgenliği ve damar daralmasını etkileyen endotelial hücrelerde ve vasküler bazal membranda geri dönüşümsüz hasarlar bırakmaktadır. Böylece vaskülatür ve doku kanamalarının çökmesi tümör yıkımına yol açmaktadır.

Vaskülatüre FDT aracılı hasar, tümörde inflamatuvar yanıtın başlatılmasıdır. Tümör büyümesi, oksijen ve besin kaynağı nedeniyle vaskülatürün fonksiyonu ile ilişkili olduğundan, mikrovaskülatür yıkımı ve kan damarı oluşumunun önlenmesi, tümör kan damarlarına zarar vermekte, kan damarı tıkanıklığına ve kanamalara neden olmakta ve tümör hücrelerini öldürmektedir [75].

2.3.4.3. Enflamatuvar ve immünolojik etki

İmmünolojik etki, enflamatik bir yanıtın oluşturulmasına dayanmaktadır. Uzun süre apoptozun immünolojik olarak sessiz veya hatta tolerojenik olduğu düşünülürken, kazara nekroz yüksek derecede iltihaplı, hatta bazen zararlı bir hücre ölümü olarak algılanmıştır. Apoptotik hücreler (ve ilgili apoptotik cisimler), zarlarının parçalanmasından önce fagositik hücreler tarafından yutulmaktadır, bu da herhangi bir hücre içi içeriğin salınmasını önlemektedir. Bunun yerine, kazara nekroza, inflamatuvar ve immünomodülatör özelliklere sahip birkaç molekül içeren hücre içi içeriğin hızlı bir şekilde salınması eşlik etmektedir. Bu moleküller, tehlike/hasara

bağlı moleküler paternler (DAMP'ler) olarak bilinir. Artık apoptozun bazı durumlarda, ölen hücrelerde sunulan hem ekzojen (patojenler) hem de endojen (tümör) antijenlere karşı uyarlanabilir bir bağışıklık tepkisini (immünojenik hafıza ile) aktive edebilmektedir. Bu tip hücre ölümü, immünojenik hücre ölümü (ICD) olarak bilinir. Her ne kadar ICD apoptoz belirtileri ile ilişkili olsa da, yeni kanıtlar diğer düzenlenmiş hücre yöntemlerinin, yani nekroptozun da immünojenisite özelliklerine sahip olabileceğini düşündürmektedir [66]. Gerçekten de, klasik nekroptoz indükleyici TSZ (TNF α + SMAC mimetic + z-VAD-fmk), ICD ayırt edici özellikleri (ATP, CALR, HMGB1) gösteren hücre ölümünü tetikleyebilir. Bu TSZ ölmekte olan kanser hücreleri, immünokompetan farelere enjekte edildiğinde, canlı kanser hücreleriyle daha fazla yeniden mücadeleye karşı koruma sağlayan bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmaktadır.

Anti-Tümör FDT Mekanizmaları		
	Organel	Süreçler
Doğrudan Hücre Hasarı	Mitokondri; - Sitokrom c sürümü - BLC-2 hasarı Sitoplazma; - NFκB hasarı	Apoptoz
	Endoplazmik Retikulum; - Beclin 1 - mTOR aktivasyonu	Otofaji
	Hücre Zarının Parçalanması	Nekroz
Vasküler Hasar	Oksijen ve Besin Maddelerinin Lokal Tükenmesi	Apoptoz Nekroz Otofaji
İmmünojenik Etki	Sitotoksik T hücreleri	Granzim aracılı apoptoz

Şekil 2.13. Anti tümör FDT mekanizmaları

2.4. Fotodinamik Tedavi Komponentleri

2.4.1. Fotoduyarlı maddeler

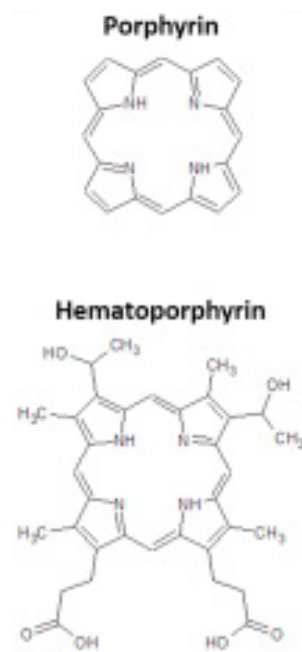
FDT'nin üç önemli elementinden biri ışığa duyarlılaştırıcıların varlığıdır. Bu ışığa duyarlılaştırıcılar, ışığı belirli bir dalga boyunda emebilen, fotokimyasal veya fotofiziksel reaksiyonları tetikleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır. İdeal fotosensitizerü tanımlayan bir dizi özellik vardır. Bunlar;

- FDT'den faydalanacak kanser hastalarının bu tedaviye sahip olabilmesi için dünya çapında bir kitleye ticari olarak ulaşılabilir olmalıdır.
- Ticarileştirilmiş ve onaylanmış FS, muntazam, tekrarlanabilir bir ürüne olanak tanıyan en titiz standartlarda üretilmelidir.
- Üretimi kolay ve maliyeti düşük olmalıdır.
- Depolanma durumunda bozulmaması için yüksek derecede kimyasal saflık içermelidir.
- İdeal olarak FS ajanı tercihen hedef dokuda birikmeli ve tedavinin seçiciliğini maksimuma çıkarmak için çevredeki normal dokudan temizlenmelidir. Doku veya vasküler yarılanma ömrü klinik duruma uygun olmalıdır.
- Aynı gün içinde tek bir FS uygulaması ve tedavisine izin vermek için hızlı birikim ve klerensi tercih edilebilir.
- Işığa duyarlı etkisi yalnızca belirli bir dalga boyunun varlığında olmalıdır.
- Yüksek fotokimyasal reaktivite; ışığın maksimum emilimi 600 nm ile 800 nm dalga boylarında olmalıdır. 800 nm'nin üzerindeki bir dalga boyunda ışığın soğurulması, tekli durumda oksijeni uyarmak ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretilmesi için yeterli enerji sağlayamaz.
- Minimum 400 nm ile 600 nm aralığında absorpsiyonu olmalıdır bu, güneş ışığından kaynaklanan olası aşırı ışığa duyarlılığı önlemektedir.
- Emilim bantları, melatonin, hemoglobin veya oksihemoglobin gibi endojen boyalar dahil olmak üzere vücuttaki diğer maddelerin Emilim bandıyla örtüşmemelidir.
- Karanlıkta minimal sitotoksite göstermelidir.

- Vücudun dokularında kolay çözünürlük göstermelidir.
- Neoplastik dokular için yüksek seçicilik göstermelidir. Fotosensitizer, orada en az birkaç saat kalan etkilenen bölgelerden yavaşça çıkarılmalı, ancak sağlıklı dokulardan hızla uzaklaştırılmalı, böylece tedavinin fototoksik yan etkileri en aza indirilmelidir.
- Fotosensitizer, FDT'nin bu tedavileri önlemek ve bu nedenle doğada rekabetçi olarak görülmek yerine cerrahi, kemoterapi ve radyasyon gibi diğer onkolojik müdahalelere bütünüleyici ve tamamlayıcı olmasına izin vermelidir.

Bu özelliklerin hepsini barındıran bir fotosensitizer geliştirmek oldukça zordur. Tüm özellikler sağlanmasa da çoğunun sağlandığı birçok fotosensitizer klinikte kullanılmak üzere onaylanmıştır. Bu ajanlar birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak tarih içinde gelişim göstermiştir [76-78].

2.4.1.1. Birinci nesil fotosensitizerler

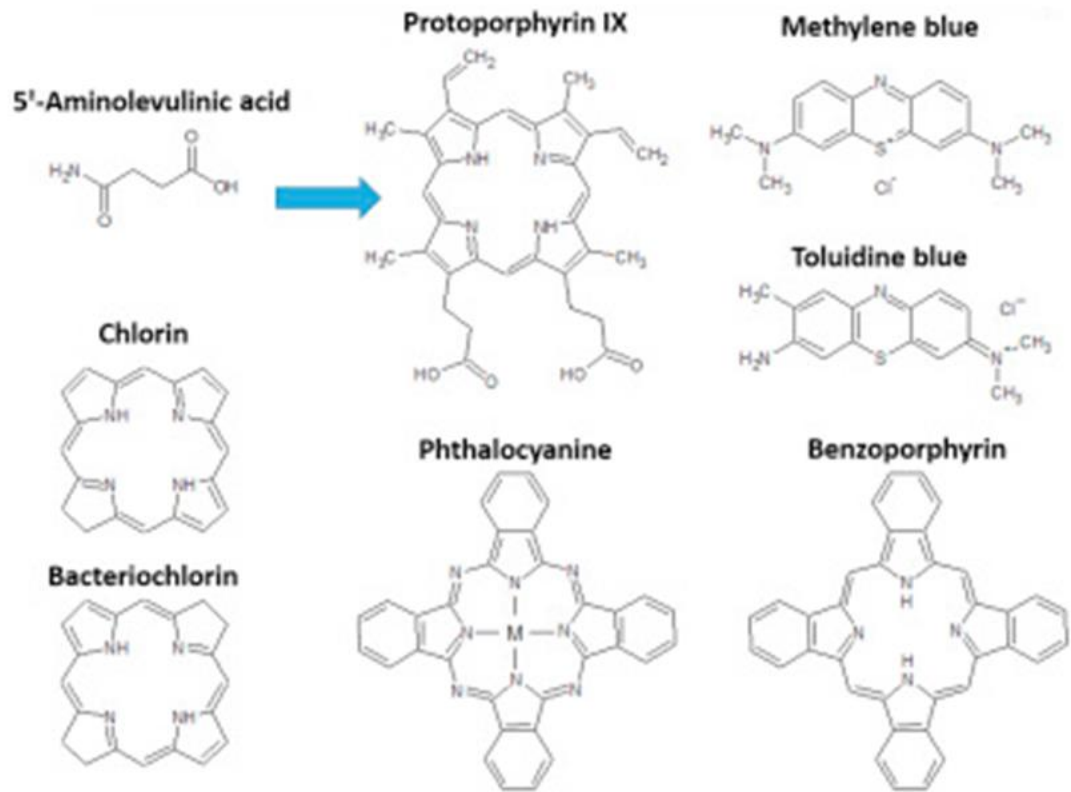


Şekil 2.14. Birinci nesil fotosensitizerler [79]

Hematoporfirin ve Fotofrin birinci nesil FS olarak kabul edilmektedir. Fotofrin, akciğer kanserleri, mesane kanserleri, özofagus kanseri ve erken evre servikal kanser

tedavisinde onaylanmıştır. Bununla birlikte, çok çeşitli kanser tedavisi için onaylanmış, özgüllük eksikliği, kutanöz fototoksiste, hidrofobiklik ve terapötik pencerede zayıf emilim gibi birçok dezavantajı vardır. Bu birinci nesil fotosensitizerler sadece ışığın dokulardan penetrasyonunun düşük olduğu ve bu nedenle sadece yüzeysel tümörler için kullanılabildiği görünür bölgede uyarılırlar. Bu FS'nin sentetik prosedürleri karmaşıktır ve saf ürünler elde etmek zordur. Fotofrin, biyolojik kullanım için önemli faktörlerden biri olan suda çözünür değildir. Ayrıca, FDT'den sonra, FS'nin uzun yarı ömrü ve ciltte yüksek birikimi nedeniyle cilt birkaç hafta ışığa aşırı duyarlılık göstermektedir. Birinci kuşak fotosensitizerlerin dezavantajları yeni bileşiklerin araştırılması ihtiyacını doğurmuştur ve ikinci jenerasyon fotosensitizerlerin gelişimini başlatmıştır [59, 78].

2.4.1.2. İkinci nesil fotosensitizerler



Şekil 2.15. İkinci nesil bazı fotosensitizerler [79]

1980'lerden sonra potansiyel ışığa duyarlı hale getirme özelliklerine sahip yüzlerce madde önerilmiştir; bunlardan sadece birkaçı klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Anti-

kanser FDT'de klinik kullanım için özel olarak onaylanan maddelerin sayısı daha da azdır. Şu anda, ikinci jenerasyon fotosensitizerler grubu hematoporfirin türevleri ve 5-aminolevulinik asit, benzoporfirin türevleri, texaphyrinler, tiyopürin türevleri, klorin ve ayrıca bakteriyoklorin analogları ve ftalosiyaninlerdir. Protoporfirin IX'in öncüsü olan 5-aminolevulinik asit (5-ALA) kullanımı önemli bir keşiftir. 5-ALA, sadece protoporfirine dönüştükten sonra aktif bir FS haline gelen bir tür ön ilaçtır. Bu nedenle, ALA veya esterleri birçok klinik uygulamada topikal veya oral olarak kullanılabilir. İkinci kuşak fotosensitizerler, 650-800 nm dalga boyu aralığında maksimum emilmeleri nedeniyle daha yüksek bir kimyasal saflık, daha yüksek tekli oksijen oluşumu verimi ve derin yerleşimli dokulara daha iyi nüfuz etme ile karakterize edilmektedir. Ayrıca, kanserli dokular için daha yüksek bir seçicilik ve fotosensitizerin vücuttan daha hızlı ortadan kaldırılması sonucu daha az yan etki gösterirler. İkinci jenerasyon FS'nin ana dezavantajı, sudaki zayıf çözünürlükleridir, bu da intravenöz uygulamalarında önemli ölçüde sınırlayıcı bir faktördür. Bu alandaki gelişmeler üçüncü nesil fotosensitizerlerin gelişimini doğurmuştur [59, 78].

2.4.1.3. Üçüncü nesil fotosensitizerler

Üçüncü kuşak fotosensitizerlerin gelişimi, tümör dokusuna daha yüksek bir seçiciliğe sahip olan ve çevredeki sağlıklı dokulara verilen zararı azaltan maddelerin sentezine dayanır. Fotodinamik yöntemin biyoyararlanımını etkin bir şekilde artıran yeni ilaç verme sistemleri ortaya çıkmaktadır. İlacın seçiciliğini arttırmak için aşağıdaki modifikasyonları kullanılır:

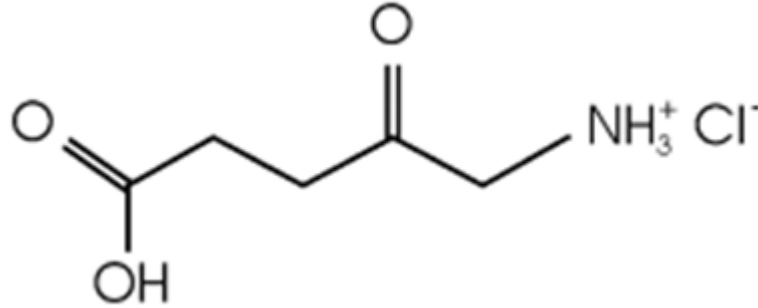
- İkinci nesil fotosensitizerlerin hedef reseptöre odaklanan moleküller ile kombinasyonları,
- Hücre duvarlarının sentezi için, çoğalan tümör hücrelerinin daha fazla kolesterole ihtiyaç duyması nedeniyle LDL lipoprotein ile fotosensitizerlerin kombinasyonları,
- Bir ışığa duyarlılaştırıcının kanser hücresinin spesifik antijenine yönelik bir hücreden üretilen antikorla konjuge edilmesi,

- Büyüme faktörü reseptörleri, transferin (demirin organlara taşınmasını sağlayan protein) reseptörleri veya hormonlar gibi tümör yüzey belirteçlerinin kullanımı.

Bu çözümler, seçili bir alanda seçiciliğin arttırılmasına ve ışığa duyarlılaştırıcının daha fazla birikmesine izin vermekte ve böylece tatmin edici terapötik etkileri korurken ilacın dozlarını azaltma imkanı vermektedir [59, 78].

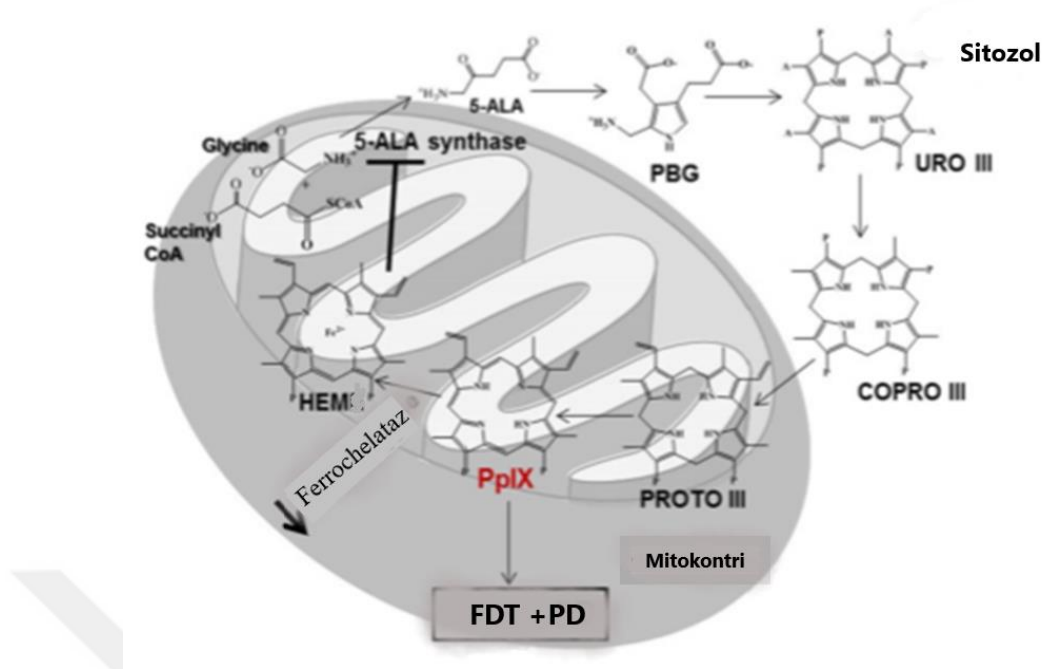
Fotosensitizer Türü	Aktive Olduğu Dalgaboyu
Hematoporfirin türevleri	620-650 nm
Fenotiazin (toluidin ve metilen mavisi dahil)	620-700 nm
Cyanine	600-805 nm
Fitoterapötik ajanlar	550-700 nm
Ftalosiyenin	660-700 nm

2.4.2. 5-Aminolevulinik asid



Şekil 2.16. 5-ALA moleküler yapısı [87]

5-ALA, hayvanlarda ve bitkilerde bulunan ve hemoglobin ve klorofilin ortak öncüsü olan doğal bir aminoasittir. Mitokondride süksinil koenzim A ve glisinden sentezlenmekte ve ekzojen olarak uygulanmaktadır. Sitoplazmadaki çeşitli öncüler aracılığıyla, mitokondride, heme'nin son öncüsü olan PpIX'in biyosentezine yol açmaktadır. PpIX daha sonra ferrochelataz ile katalize edilmekte ve hem iyonu ile sonuçlanan demir iyonu ile bağlanmaktadır [79, 80].



Şekil 2.17. Hem biyosentezinin şematik gösterimi [81]

Son 40 yılda, 5-aminolevulinik asit (5-ALA), tümörlerin saptanması ve tedavisi alanında büyük ilgi görmüştür. Özellikle deri, mesane ve gastrointestinal yol gibi bir dizi organdaki tümörlerin görüntülenmesi ve fotodinamik tedavisinde kullanılmaktadır. Kanser veya kanser öncesi hücrelere aşırı eksojen 5-ALA'nın uygulanması halinde biyosentetik yolak üzerinde görülen negatif geri besleme kontrolden çıkmaktadır. Ferrochelataz aktivitesi yavaşlar. Ferrochelatazın PpIX'i hem'e dönüştürme kapasitesinin sınırlı olması nedeniyle, hücrelerde aşırı eksojen 5-ALA varlığı PpIX birikmesine neden olmaktadır. Bu etki neoplastik hücrelerde belirgindir. Ayrıca, bazı malign hücreler, hem transferrin reseptörlerinin artan ekspresyonuna hem de daha da önemlisi, PpIX'in hem haline dönüştürülmesine yol açan düşük demir depolarına sahiptir [82, 83].

Bugüne kadar, FDT'nin klinik uygulamaları, vücudun lazer veya diğer ışık kaynaklarından ışınlanmaya kolayca yatkın bölgeleriyle sınırlandırılmıştır. Sonuç olarak, FDT öncelikle cilt, mesane, ağız ve dişi üreme sisteminin tümörleri ve neoplazileri için bir tedavi olarak araştırılmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler, epidermisin en üst katmanında düşük geçirgenliklere sahiptir. Bu nedenle, birkaç izole çalışmaya rağmen, genellikle büyük, yüksek konjüge moleküller olan

önceden oluşturulmuş fotosensitizerler topikal FDT'de yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu, doğal seçicilik eksiklikleri ile birleştğinde, nispeten düşük molekül ağırlığına sahip olan 5-ALA'nın modern topikal FDT'de en sık kullanılan ajan olmasını sağlamaktadır. 5-ALA'nın topikal uygulamasına dayanan FDT, bazal hücreli karsinom, aktinik keratoz, Bowen hastalığı, vulval intraepitelyal neoplazi, vulval paget hastalığı ve servikal intraepitelyal neoplazi tedavisinde başarıyla kullanılmıştır. 5-ALA'nın topikal uygulanmasından kaynaklanan neoplastik hücrelerde oldukça seçici PpIX birikimi nedeniyle, teknik aynı zamanda ağız, mesane, endometriyum ve serviksin neoplastik lezyonlarının fotodiyagnozunda kullanım bulmuştur. UV ışığı ile tedavi edilen alanın aydınlatılması, çevredeki sağlıklı doku mavi görünürken, neoplastik dokuda kırmızımsı pembe PpIX floresanına neden olmaktadır. Teknik genellikle konvansiyonel muayene yöntemleri ile gözden kaçabilen subklinik lezyonların saptanmasına izin vermektedir [83, 84].

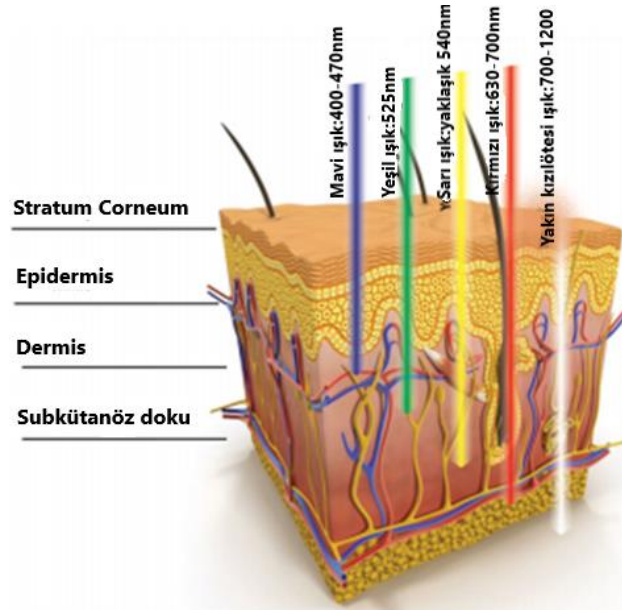
PpIX molekülleri, görünür kırmızı ışık (600-740 nm) ve yeşil ışık (450-580 nm) gibi belirli ışık dalga boyları tarafından düşük güçle uyarıldığında, ışık enerjisini emer ve bir uyarma durumuna geçer ve daha sonra bir zemin durumuna geri döner. Bu geçiş aşaması sırasında, hidroksi radikalleri, tekli oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi reaktif oksijen türleri enerji dönüşümü ile üretilir. Bu fotokimyasal reaksiyonlar tarafından üretilen reaktif oksijen türleri kanser hücrelerine zarar verir ve hücre ölümüne yol açan apoptozu indükler. Bu, ALA- FDT'nin prensibidir [80]. Ayrıca PpIX'in mitokondride lokalizasyonu yararlıdır, çünkü mitokondriyal foto hasar, iç mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve sitokrom c seviyelerinin azalmasıyla mitokondriyal apoptotik yolağı doğrudan tetiklemekte ve hücre ölümünün apoptozla gerçekleşmesini sağlamaktadır. Apoptoz giren hücrelerde sitoplazmik yoğunlaşma, sitoplazmik parçalanma ve nükleer parçalanma meydana gelmektedir. Hücresel içerikleri de dahil olmak üzere bu durumdaki hücreler, makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositler tarafından hızla fagositize edilmektedir. Bu nedenle, genellikle hücresel içeriklerin nekroz ile sızıntısından kaynaklanan iltihap baskılanmakta ve çevreleyen hücrelere ve dokulara minimum hasar verilmektedir. Başka bir deyişle, esas olarak apoptoz ile antikanser etkinliği gösteren ALA - FDT, az sayıda olumsuz etkisi olan bir tedavidir [80, 81, 85].

2.4.3.Fotodinamik tedavide ışık

Işık FDT'nin önemli bir bileşenidir. Hedeflenen bölgede biriken foto-duyarlı maddenin aktifleşmesini sağlamaktadır. Işık doku içine girdiğinde saçılım, emilim ya da dağılım göstermektedir. Bu, doku tipine veya ışığın dalga boyuna göre değişim göstermektedir ve FDT'nin etkinliği için büyük önem teşkil etmektedir. Belirli bir ışık dalga boyunun etkili penetrasyon derinliği, hedef dokuda absorpsiyon ve saçılma gibi optik özelliklerin bir fonksiyonudur.

2.4.3.1.Dalga boyu

Kullanılan dalga boyları 400 ile 1200 nm arasında değişmektedir. Bu aralık ışığın dokuya en fazla nüfus ettiği aralıktır. Daha uzun dalga boylarında ışık su tarafından, daha kısa dalga boylarında ise endojen kromoforlar tarafından absorbe edilmektedir. Farklı hücreler ve dokular, ışığı farklı dalga boylarında emer ve bu kesinlikle dalga boylarının elde etmesi gereken penetrasyonla ilgilidir. Kırmızı ışık (630-700 nm) 1-3 mm derinliğe inerek dermis aktive edici fibroblastlara ulaşabilmektedir. Mavi ışığın (400-470 nm) penetrasyon potansiyeli daha düşüktür ve cildin epidermis tabakasındaki cilt koşulları için yararlı olduğu gösterilmiştir. Sarı ışık (yaklaşık 540 nm) kızarıklık, şişme ve pigmentasyonla ilişkili diğer etkileri içeren cilt koşullarında etkilidir. Kızılötesine yakın ışık (700-1200 nm) derideki maksimum nüfuza ulaşır; in vivo çalışmalar, anjiyogenez stimülasyonu ile yara iyileşmesindeki etkinliği ortaya konmuştur [86].



Şekil 2.18. Farklı dalgalıboylarının penetrasyon derinliği [86]

2.4.3.2. Işık kaynakları

FDT için ışık kaynağı seçimi, tümörün yeri, verilen ışık dozu ve foto-duyarlılaştırıcı seçimi ile belirlenebilmektedir. Normal olarak FDT'de geleneksel lambalar, lazerler ve ışık yayan diyotlar (LED) kullanılmaktadır. Mevcut ışık kaynaklarının avantajları ve dezavantajları kullanım amacı ve tümörün yerine göre değişiklik göstermektedir. Dermatolojik uygulamalar için lazer olmayan kaynaklar, geniş aydınlatma alanları, düşük maliyetleri ve basit yapıları nedeniyle lazerlere tercih edilmektedir. Yüksek saçılma ve düşük penetrasyon nedeniyle tümör bölgesine gerekli ışık enerjisini görünür ve NIR ışıkları ile sağlamak zordur. Lazerler yüksek yoğunluklu tutarlı monokromatik ışık üretmektedir. Erişilemeyen bölgelere (akciğer, idrar kesesi vb.) ulaşmak ve saçılma nedeniyle ışık kaybını azaltmak için bir veya daha fazla fiber optik cihaza bağlanabilir ve bu şekilde ışık iletimini daha yönlenebilir hale getirirler. FDT' de geleneksel olarak lazerlerin kullanılmasının en önemli sebebi budur. Ancak son yıllarda LED'lerin geliştirilmesiyle FDT'de kullanımlarının mümkün olduğu bir aşamaya ilerlemiştir [59, 87].

2.4.3.3. Işığın yayan diyodlar (LED'ler)

1962'de icat edilen LED başlangıçta önemli bir biyolojik aktivite üretememiştir. İnsan sağlığı için ilk faydalı etkiler, Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA) tarafından, işlem için gereken uygun dalga boyunu ve yoğunluğu sağlayabilen, tutarlı olmayan bir şekilde dar bir ışık spektrumu üreten LED'lerin geliştirilmesi ile bulunmuştur. Son 15 yılda, LED teknolojisi sürekli iyileştirilmiştir. Monokromatik kızılötesi enerji (MIRE) olarak da bilinen kırmızı, mavi, sarı ve kızılötesine yakın kızılötesi ışıkları günümüzde mevcuttur.

LED tedavisi günümüzde, gözlemlenen etkilerin artmış ATP üretimi, hücre içi oksidatif stresin modülasyonu, kollajen sentezinde değişiklik, anjiyogenezin uyarılması ve kan akışının uyarılmasını içeren FDA onaylı bir kozmetik prosedürdür. LED biyolojik etkileri klinik tedavide olduğu gibi ışık parametrelerinden güçlü bir şekilde etkilenmektedir [86].

LED klinik ve laboratuvar kullanımı için çeşitli avantajlar sağlayacaktır. Emisyon dalga boyu seçimi UVA'dan (350 nm) kızılötesine (1100 nm) yakındır. Bant genişliği 5-10 nm'dir ve güç çıkışı, lazerlere kıyasla, daha az invaziv ve hedeflenen dokular için potansiyel olarak daha az zararlı olduğu için önemli ölçüde daha düşüktür. LED'ler ablatif olmayan termal olmayan ve özellikle fotosensitizer kullanılmadığında cilde ve dokulara zarar vermez. LED kullanımı lehinde iki temel özellik fiyat ve çok yönlülüktür. LED ucuzdur (diğer tüm kaynaklarla karşılaştırıldığında), bu nedenle geniş alanları ışınlamak için diziler halinde düzenlenebilirler. Pillerle çalıştırılabilirler, böylece tamamen ve kolayca taşınabilirler. Dahası, farklı anatomik alanları telafi etmek için farklı geometrik kombinasyonlar halinde düzenlenebilirler. Fototerapi ve FDT'de LED kullanımı için prototipler geliştirilmeye devam etmektedir. Ayrıca, LED'ler oldukça seçici emisyon dalga boylarıyla üretilebilir. Bu nedenle, LED'ler FDT uygulamaları için bu çalışmada da olduğu gibi birden fazla dalga boyu sağlamak için umut verici bir ışık kaynağıdır [88]. Işık kaynağının yanı sıra uygulanan protokol de çok önemlidir.

2.4.3.4. Işıık dozimetrisi

FDT'nin etkinliği, diğer faktörlerin yanı sıra, hedef dokuya verilen toplam ışıık dozuna bağlıdır. Fluence, bir kesit alanı boyunca maruz kalan ışıığın toplam enerjisidir ve “J/cm²” olarak ifade edilir. Fluence oranı, ışıınlanan noktanın kesit alanı boyunca saniyede meydana gelen olay enerjisidir ve “W/cm²” olarak ifade edilir. Düşük akıcılık oranları FDT için faydalıdır çünkü yüksek fluence oranları oksijenin tükenmesine neden olur. FDT'nin başarısı esas olarak toplam ışıık dozuna, maruz kalma süresine, akıcılık oranına ve fraksiyonasyon moduna bağlıdır. Fotodinamik reaksiyonun üretilmesi için ışıık penetrasyonu ve ışıık eşığinin belirlenmesi yoluyla ışıık dozimetrisini etkili bir şekilde optimize eden uygun deneysel sistemler ile matematiksel ve Monte Carlo hesaplama modelleri araştırılmaktadır [89, 90].

2.5. Oksijen

Fotodinamik terapinin en önemli bileşenlerinden biri de oksijendir. Oksijen konsantrasyonu organdan organa dolayısıyla tümörden tümöre bile damar yoğunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Solid tümörlerdeki oksijen eksikliği tedavinin önündeki en büyük engeldir. Doku oksijenasyonu tekli oksijenin oluşumu için büyük önem taşımaktadır.

Yüzeyde lokalize olan tümörlerde hipoksi, derin yerleşimli tümörlere göre daha az görölmektedir. Derin yerleşimli tümörlerde ışıığa duyarlı maddeler ışıık ile aktiveleştirildiklerinde ortamdaki oksijenin dokudaki difüzyondan daha hızlı tükenmesi hipoksiye neden olmaktadır. Fotodinamik terapinin başarılı olmasında fotoduyarlı madde ve ışıık seçimi kadar ortamdaki oksijenin varlığı da büyük önem taşımaktadır.

Fotodinamik tedavide yüksek dozlarda ışıılama kullanılması dokudaki oksijen miktarının hızlı bir şekilde azalmasına sebep olmaktadır. Böylece reaktif oksijen türlerinin üretimi durmakta buna bağlı olarak da tedavinin etkinliği azalmaktadır.

Fotodinamik tedavinin en önemli parametrelerinden biri olan bu oksijen oranının kontrol edilmesi amacıyla aşıtlı yöntemler geliştirilmiştir. Dokulardaki oksijen konsantrasyonunu izlemek amacıyla geliştirilen yöntemler doku ışık hızını ayarlayabilmemize olanak sağlamaktadır. Hedef dokuya gönderilen toplam ışık dozunu koruyacak şekilde ya belirli aralıklarla dokuyu ışınlayarak (puls mod) ya da ışınlama süresini arttırarak (sürekli mod) oksijenin tüketim ve difüzyon hızı arasında denge sağlanabilir. Belirli aralıklarla ışınlama yapıp dokunun oksijenlenmesini beklemek güzel bir stratejidir ancak tedavi öncesi hipoksik olan hücrelerde işe yaramayabilmektedir ayrıca bu tedavi süresinin uzamasına neden olmaktadır. Bu nedenle farklı stratejiler ve yöntemler üzerinde çalışılmaktadır.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

3.1.1. Hücre hatları ve besiyerleri

Çalışmada HT-29 (ATCC® HTB38™) kolon kanseri ve WI-38 (ATCC® CCL75™) normal akciğer fibroblastik hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları ATCC ‘den temin edilmiştir. HT-29 hücre hattı, 1964 yılında 44 yaşında bir Kafkas kadınından türetilen hücrelerdir. WI-38 hücre hattı, 3 aylık gebeliği durdurulmuş bir dişi fetüsün akciğer dokusundan türetilen bir insan hücre hattıdır.

HT-29 kolon kanseri hücre hattı %10 FBS (fetal bovin serum), %1 oranında 100 u/ml penisilin ve 2 µM L-glutamin içeren DMEM kültür ortamında flasklarda 37 °C’de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

WI-38 normal akciğer fibroblastik hücre hattı %10 FBS, %1 oranında 100 u/ml penisilin ve 2 µM L-glutamin içeren DMEM kültür ortamında flasklarda 37 °C’de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.2. Hücrelerin kültüre alınması

-80°C dolapta dondurulmuş halde bulunan hücreler çözündürülürken ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözülmekte ve ani olarak serbest sıvı salınmaktadır. Bu da hücrelerin şişerek patlamasına yol açmaktadır. Bu durumu engellemek için çözünmenin dondurmanın aksine çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Hücre canlılıklarının kontrollerinin sağlanması amacıyla -80°C dolaptan alınan hücreler 37°C’de yaklaşık 2 dakika kadar çözülünceye kadar hızlıca

çalkalanmıştır. Kroyotüpün etrafı alkolle temizlenmiş ve laminar kabin içerisine alınmıştır. Kroyotüp içerisinde bulunan 1 ml hacmindeki hücreler çok az pipetaj yapılarak falkonlara alınmış üzerine 5 ml taze besiyer eklenmiştir. Ardından 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Flasklara 5 ml taze besiyeri konulmuş ve 1 ml hücre-besiyeri karışımları flasklara eklenerek hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler büyüyüp, istenilen morfolojik özellikleri gösterdiklerinde ve %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çalışılacak hücreler için ise dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Dondurma işlemi için flasktaki tüm besiyeri çekilip atılmış ardından besiyeri kalıntısını ortadan kaldırmak ve hücre içi ve dışı osmotik basıncı dengelemek için PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkama yapılmıştır. Flask zeminine bağlanmış bağları koparıp hücreleri ayağa kaldırmak için %25 tripsin EDTA kullanılmıştır. 5dk inkübatörde bekletilmiştir çünkü tripsin sıcakta daha da aktif şekilde çalışmaktadır. Tüm hücreler kalktıktan sonra tripsini inaktive etmek amacıyla taze besiyeri eklenmiş ve falkona alınıp santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml içeriğinde %90 oranında besiyeri ve %10 oranında DMSO eklenerek yeni kroyotüp içerisine alınmıştır. DMSO su moleküllerini bağlayarak su kristalizasyonunu yavaşlatmak ve hücre içi ve dışının eş zamanlı donmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Hücreler hızlı dondurulduğunda ortamdaki tuz konsantrasyonu aniden artar, hücreler osmotik basınçtaki artıştan dolayı büzülür ve ölürlür bundan dolayı hücre hatlarına zarar gelmesini önlemek amacıyla kroyotüpler kademeli olarak önce -20 °C'de 1 saat bekletildikten sonra -80 °C'de saklanmıştır.

Üzerinde çalışma yapmak için belli bir yoğunluğa ulaşan hücreler canlılıklarının kontrollerinin sağlanması amacıyla flask zemininden tripsinle ayrılarak falkonlara konulmuştur ve santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml taze besiyer ile homojenize edilip sayım yapılmıştır. Sayım yapıldıktan sonra deneyin yapılacağı 96'lık hücre plakalarına (2×10^4 hücre/kuyu) ekilip 24 saat inkübe edilmiştir flasklara hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Işık Kaynağı

Çalışmada ışık kaynağı olarak bir Tübitak projesi sonucu Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal laboratuvarında üretilen LED cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.1.). 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm dalga boyuna sahip LED'ler kullanılmıştır. LED'ler ± 10 nm aralığa sahiptir. Cihaz, 0 ile 500 mW arasında optik güç üretmek için yüksek optik çıkış kararlılığı ile geliştirilmiştir. Optik çıkış sürekli olarak fotodiyot ile ölçülmüştür. Gerçek zamanlı optik güç çıkışı kalibrasyonu, fotodiyot transimpedans amplifikatör devre çıkışına göre yapılmıştır. LED bağlantı sıcaklığı TEC (termoelektrik soğutma) sistemi ile stabilize edilmiştir. LED sistemiyle aynı optik çıkış gücünü üretebilmek için LED bağlantı sıcaklığı üreticinin veri sayfasında belirtildiği gibi 44 °C'de sabitlenmiştir. Sıcaklık kontrol sisteminin temel prensibi, LED'in peltier elemanlarının soğuk tarafı ile doğrudan temas halinde olması ve soğutucu, fan ile doğrudan temas halinde olmasıdır. Termistör, LED bağlantı noktasından sıcaklığın gerçek zamanlı ölçümünü sağlar. Sistem, daha uzun deney süresi nedeniyle dalga boyu kaymasını önlemiştir.



Şekil 3.1. LED cihazı

LED sistemi, kullanıcıya herhangi bir hata olmadan istenen optik gücü üretme olanağı veren dokunmatik ekran ve gömülü sistem tabanlı denetleyiciden

oluşmaktadır. Hassas kontrol, fotodiyot ve TEC sistemi ile optik çıkış gücünden sürekli geri bildirim ile elde edilmiştir. Cihaz, hücre hattı çalışmalarına uygun olarak, çoklu well-plate ortamında ışımaya yapabilmektedir. Optik güç ve zaman deneye göre seçilmiş ve sistem enerjiyi hesaplayabilmiştir.

3.3. Fotoduyarlı Madde

Çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak 5-ALA (Sigma, A3785-500mg) kullanılmıştır. 5-ALA görünür kırmızı ışık (600-740 nm) ve yeşil ışık (450-580 nm) gibi belirli ışık dalga boylarında absorbans gösterir. Uygulama öncesinde kuru toz halindeki 5-ALA steril su ile çözelti haline getirilerek ana stok hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılacak olan konsantrasyonlara göre ana stok üzerinden taze serumsuz besiyeri ile seyreltme yapılmıştır. Ana stok çözeltisi ve ayarlanan konsantrasyonlardaki 5-ALA -20 °C'de ve karanlıkta saklanmıştır. Deney boyunca da ışığa maruz kalması engellenmiş, deneyler karanlık ortamda yapılmıştır.

3.4. MTT Hücre Canlılık Testi

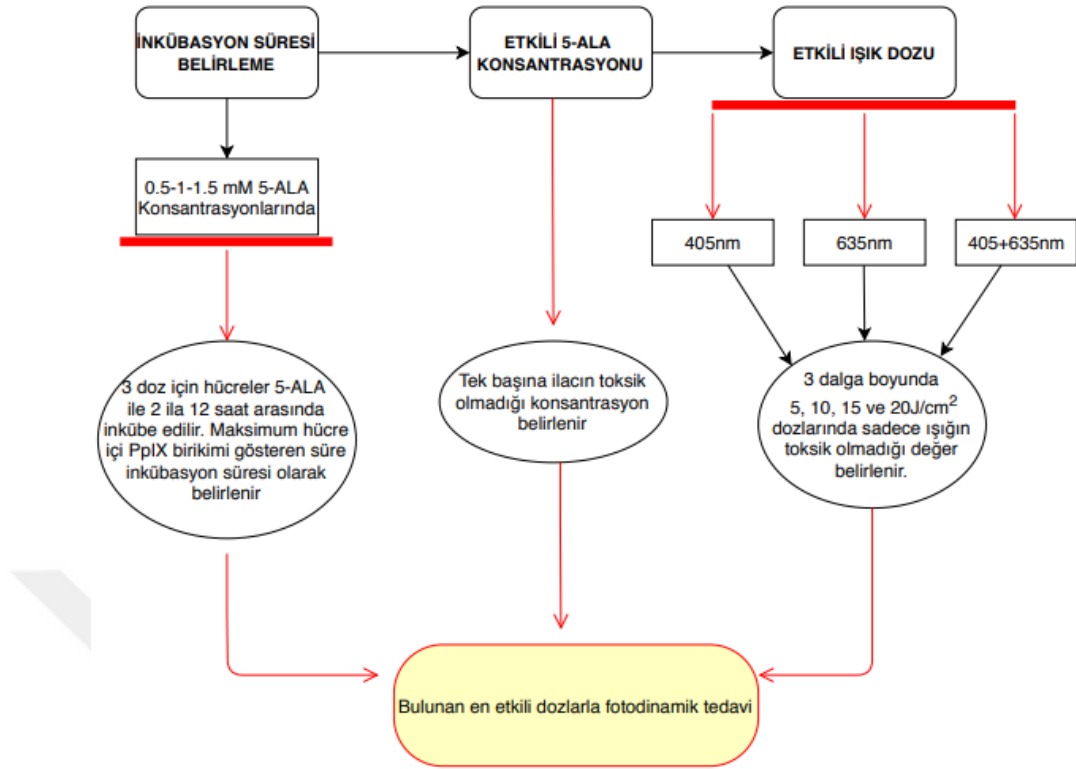
MTT bir tetrazolyum tuzudur. Tetrazolyum tuzları organik yapıdaki bileşiklerdir. Bu bileşikler elektron alarak indirgenirler ve formazan denilen yapıya dönüşürler. Bu dönüşüm sırasında renk değişiklikleri gözlemlenir. Tetrazolyum halkası yalnızca aktif mitokondri tarafından kırılabilir bu sebeple oluşan bu renk değişimi yalnızca canlı hücreler tarafından gerçekleştirilebilir. Ölü hücreler bu bileşikleri indirgeyemez ve renk değişimi oluşturamazlar. İn vitro ortamda meydana gelen bu değişikliklerin yalnızca canlı hücrelerde olması bu tuzları çok önemli hale getirmiştir.

MTT pozitif yüklü bir bileşiktir ve ökaryot hücrelerin membranından kolayca geçebilir. Hücre içinde indirgenir ancak indirgenme sonucunda oluşan formazan suda çözünmemektedir ve vasatta kristal şeklinde çökme göstermektedir. Bu yüzden MTT testi yapılırken çökelen kristalleri çözmek için DMSO kullanılmaktadır [92]. MTT uygulama protokolü aşağıda maddelendiği şekilde yapılmıştır;

- Hücreler tedaviye göre belirli bir süre ilaçla inkübe edildikten sonra 96 kuyulu plakalardaki her kuyudan ortam çekilerek kalıntıları temizlemek için PBS ile yıkanmıştır.
- 10 µl MTT solüsyonu ve 90 µl serumsuz taze besiyeri konulmuştur. Arka plan oluşturmak için boş bir kuyuda da aynı işlem uygulanmıştır.
- 3 saat 37 °C’de %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından kuyulardan (arka plan oluşturulan kuyu da dahil) ortam çekilerek hücre içine çöken kristalleri çözmek için 100 µl DMSO konulmuştur ve 45 dk kadar yine 37°C’de %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Bu inkübasyon süresinin ardından hücrelerin 570 nm’deki değeri bir SPECTROstar Nano® marka mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Tüm kuyuların absorbans değerlerinden arka planın absorbansı çıkarılmıştır ve yüzde canlılık oranı bu değerlerle hesaplanmıştır.
- Deneylerde kontrol grubu olarak kullanılan hiçbir işlem görmemiş hücreler %100 canlı kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.5. Fotodinamik Tedavi Uygulama Protokolü

FDT uygulamaları inkübasyon süresi, sitotoksisite ve fototoksisite optimizasyon deneyleri ve bu deneyler neticesinde belirlenen en uygun dozlarla ana deney çalışması olmak üzere 2 aşama olarak oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. Fotodinamik tedavi uygulama protokolü blog diyagramı

3.5.1. Optimizasyon çalışması

3.5.1.1. 5-ALA'nın inkübasyon süresinin ölçümü

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak inkübasyon süresi araştırılmıştır. İnkübasyon süresi belirlenirken hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar gerçekleştirilen protokol aşağıda maddelendiği gibidir.

- Donmuş halde bulunan HT-29 ve WI-38 hücreleri çözündürüldükten ve flasklara alındıktan sonra 2 veya 3 gün ara ile besiyerleri değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler (%80-90 konfluent) tripsin ile kaldırılmış ve thoma lamında sayımları yapılmıştır. Her iki hücre hattı için de hücreler 96 kuyulu plakalara her kuyuya 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37°C 'de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır.

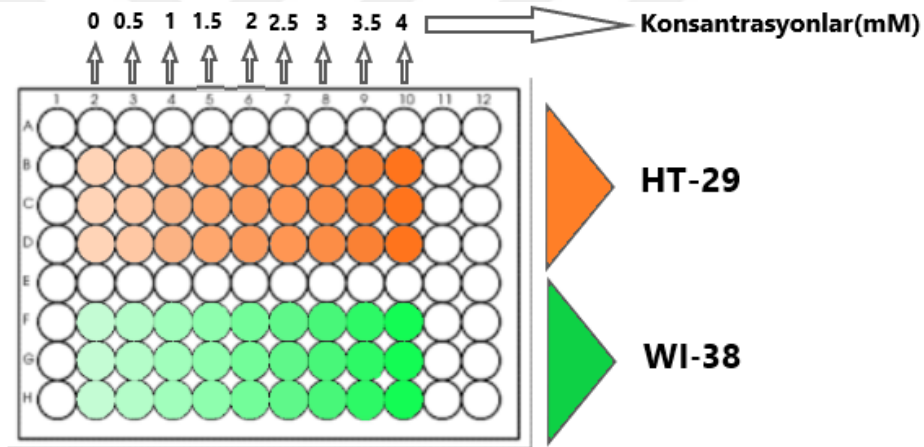
- 24 saatlik yapışma süresinin sonunda kuyulardaki besiyeri aspire edilmiş ve 0,5 mM, 1 mM ve 1,5 mM konsantrasyonlarında 5-ALA her kuyuya 100 µl olacak şekilde verilmiştir.
- 0 ile 12 saat arasında 37 °C’de %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir. İlk 6 saat boyunca saat başı sonrasında 8,10 ve 12. saatlerden sonra ölçüm alınmıştır. ALA ile inkübasyon sırasında ışığa maruz kalmaktan kaçınılmıştır.
- Hücre içi PpIX birikimini ölçmek için, her inkübasyon süresinin ardından hücreler iki kez PBS ile yıkanmış ve 100 ul % 1 SDS çözeltisi içinde lize edilmiştir. PpIX birikimi, bir SPECTROstarNano marka mikropilaka okuyucusu PpIX’ın uyarma dalga boyu olan 405 nm’ye ayarlanarak floresan yoğunluğuna göre belirlenmiştir.
- Deneyler her iki hücre hattı için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.2. 5-ALA’nın optimal konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu deneyde HT-29 kolon kanseri ve WI-38 akciğer fibroblastik hücre hattı üzerinde gerekli olan optimal konsantrasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. 5-ALA’nın optimal konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla ana stoktan seyreltilerek 8 farklı (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM) 5-ALA konsantrasyonu hazırlanmıştır. Sitotoksikite belirlenirken hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar gerçekleştirilen protokol aşağıda maddelendiği gibidir.

- Donmuş halde bulunan HT-29 ve WI-38 hücreleri çözündürüldükten ve flasklara alındıktan sonra 2 veya 3 gün ara ile besiyerleri değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler (%80-90 konfluent) tripsin ile kaldırılmış ve thoma lamında sayımları yapılmıştır. Her iki hücre hattı için de hücreler 96 kuyulu plakalara her kuyuya 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37 °C’de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır.

- 24 saatlik yapışma süresinin sonunda kuyulardaki besiyeri aspire edilmiş ve belirlenen konsantrasyonlarda 5-ALA her kuyuya 100 µl olacak şekilde verilmiştir. Kontrol grubuna ise 100 µl taze besiyeri verilmiştir. Grupların 96 kuyucuklu plaka üzerindeki yerleşimi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.
- Optimizasyon çalışması sonunda elde edilen sonuçlara göre belirlenen inkübasyon süresi kadar 37 °C'de %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresinin ardından kuyulardaki solüsyon aspire edilmiş ve her kuyuya 100 µl taze besiyeri konulmuştur.
- Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır ve 24 saatin ardından canlılık MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Sitotoksiste optimizasyonu deneyi 96 kuyucuklu plaka dizaynı

3.5.1.3. Işığın optimal dozunun belirlenmesi (fototoksiste)

Bu deneyde HT-29 kolon kanseri ve WI-38 akciğer fibroblastik hücre hattı üzerinde gerekli olan optimum enerji yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Işık kaynağı olarak proje ürünü olan LED cihazı kullanılmıştır. 2 farklı dalga boyu ve bunların kombinasyonu ile çalışılmıştır. Bu dalga boyları 5-ALA'nın pik absorbans verdiği 635 nm ve 405 nm baz alınarak kullanılmıştır. Çalışma 4 farklı uygulama üzerinden dizayn edilmiştir. Tablo 3.1.'de uygulamalar ve numaralandırılması verilmiştir. Uygulama 1'de hücreler 5-ALA kullanılmadan 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm dalgaboylarında sadece ışığın toksik etkisini anlamak için ile 30 mW/cm² güç

yoğunluğu ve 5 J/cm² enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır. Uygulama 2’de hücreler 5-ALA kullanılmadan 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm dalgaboylarında sadece ışığın toksik etkisini anlamak için ile 30 mW/cm² güç yoğunluğu ve 10 J/cm² enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır. Uygulama 3’de hücreler 5-ALA kullanılmadan 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm dalgaboylarında sadece ışığın toksik etkisini anlamak için ile 30 mW/cm² güç yoğunluğu ve 15 J/cm² enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır. Uygulama 4’de hücreler hücreler 5-ALA kullanılmadan 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm dalgaboylarında sadece ışığın toksik etkisini anlamak için ile 30 mW/cm² güç yoğunluğu ve 20 J/cm² enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır.

Tablo 3.1. Fototoksiste uygulamaları

Dalga boyu (nm)	Uygulanan Enerji Yoğunluğu (J/cm ²)			
	5 J/cm ²	10 J/cm ²	15 J/cm ²	20 J/cm ²
405 nm				
635 nm				
405 +635 nm	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3	Uygulama 4

Fototoksiste belirlenirken hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar gerçekleştirilen protokol aşağıda maddelendiği gibidir.

- Donmuş halde bulunan HT-29 ve WI-38 hücreleri çözündürüldükten ve flasklara alındıktan sonra 2 veya 3 gün ara ile besiyerleri değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler (%80-90 konfluent) tripsin ile kaldırılmış ve thoma lamında sayımları yapılmıştır. Her iki hücre hattı için de hücreler 96 kuyulu plakalara her kuyuya 2 x 10⁴ hücre gelecek şekilde ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37°C’de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır.
- 24 saatin sonunda besiyerleri aspire edilmiş ve 100 µl taze besiyeri konulmuştur.
- Hücreler daha sonra 5-ALA’nın pik verdiği emilim dalga boyları olan 405 ve 635 nm dalga boyunda ve bu dalga boylarının kombine olduğu 405+635 nm yeni bir kaynakla ışınlanmıştır. Işınlama kullanılan kaynağın güç değeri 30 mW/cm² olarak ölçülmüş ve uygun sürelerle maruz bırakılarak 5, 10, 15 ve 20 J/cm² dozlarında gerçekleştirilmiştir. Maruz kalma süresi, istenen enerji

yoğunluğunu elde etmek üzere ayarlanmıştır. Her dalga boyu için ayrı bir 96'lı well plate kullanılmıştır. Kontrol grubunun ışıktan etkilenmemesi için kontrol grubuna ait farklı bir well plate kullanılmıştır. Grupların birbirlerinin ışığından etkilenmesini en aza indirmek amacıyla well platenin uzak noktalarına ekim yapılmıştır.

- Işınlanmanın ardından hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır ve 24 saatin ardından canlılık MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir.

3.6. Ana Çalışma

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında MTT hücre canlılık testi sonuçları değerlendirilerek HT-29 ve WI-38 hücre hatları için 5-ALA inkübasyon süresi, sitotoksitesi ve LED ışığının enerji parametresi belirlenmiştir. Belirlenen değerlere göre ana çalışmaya geçilmiştir. Çalışma 4 farklı uygulama üzerinden dizayn edilmiştir. Tablo 3.2.'de uygulamalar ve numaralandırılması verilmiştir. Uygulama 5'de WI-38 hücre hattı 0,5 mM 5-ALA ile 5 saat inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 6'da hücreler 1 mM Fotolon ile 5 saat inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerjisi ile uyarılmıştır. Uygulama 7'de hücreler 0,5 mM 5-ALA ile 5 saat inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 8'de hücreler 1 mM 5-ALA ile 5 saat inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek için her uygulama 3 paralelli kendi içerisindeki gruplar 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.2. Fotodinamik tedavi uygulamaları		
Konsantrasyon (mM)	Hücre Hattı	
	WI-38	HT-29
0,5 mM	Uygulama 5	Uygulama 7
1 mM	Uygulama 6	Uygulama 8

Ana çalışmada hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar gerçekleştirilen protokol aşağıda maddelendiği gibidir.

- Donmuş halde bulunan HT-29 ve WI-38 hücreleri çözündürüldükten ve flasklara alındıktan sonra 2 veya 3 gün ara ile besiyerleri değiştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler (%80-90 konfluent) tripsin ile kaldırılmış ve thoma lamında sayımları yapılmıştır. Her iki hücre hattı için de hücreler 96 kuyulu plakalara her kuyuya 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37°C 'de %5 karbondioksitli inkübatöre alınmıştır.
- 24 saatlik yapışma süresinin sonunda kuyulardaki besiyeri aspire edilmiş ve optimizasyon çalışmasında belirlenmiş olan konsantrasyonda 5-ALA her kuyuya 100 μl olacak şekilde verilmiştir. Kontrol gruplarına ise 100 μl taze besiyeri verilmiştir.
- Yine optimizasyon çalışmalarında belirlenen inkübasyon süresi kadar 37°C 'de %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon süresinin ardından bütün kuyulardaki solüsyonlar aspire edilerek taze besiyeri verilmiştir.
- Besiyerlerinin tazelenmesinin ardından fotodinamik tedaviye geçilmiş ve optimizasyon çalışmalarında belirlenen enerji ile 3 tip dalga boyunda LED ile uyarılmıştır. Her dalga boyu için farklı bir 96'lı well plate kullanılmıştır. Kontrol grubunun ışıktan etkilenmemesi için kontrol grubuna ait farklı bir well plate kullanılmıştır.
- Tedavinin ardından hücreler 24 saat 37°C 'de %5 karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir ve 24 saatin sonunda canlılık MTT testi ile değerlendirilmiştir.

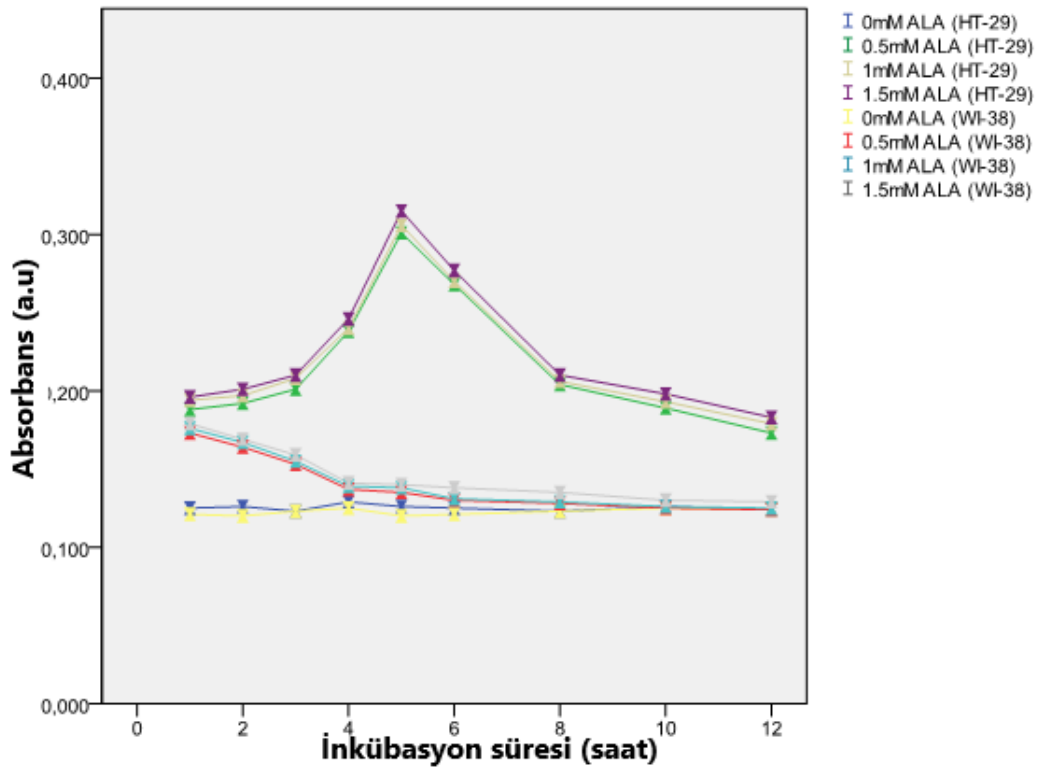
Tablo 3.3. Fotodinamik tedavi değerleri

FOTODİNAMİK TEDAVİ	DEĞERLER
İnkübasyon süresi	5 saat
ALA-5 konsantrasyonu	0,5 mM, 1 mM
Uygulanan Güç	30 mW/cm ²
Süre	166 sn
Enerji Yoğunluğu	5 J/cm ²

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Optimizasyon Çalışması Bulguları

4.1.1. İnkübasyon süresi bulguları



Şekil 4.1. Hücre içi PpIX birikimi

İnkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla HT-29 kolon kanseri ve WI-38 akciğer fibroblastı hücre hattı üzerinde yapılan çalışma sonuçları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Sonuçlar mikropılaka okuyucusundan alınan absorbans sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. İlk 6 saat her saatte sonuç alınmış sonrasında 8,10 ve 12. saatlerde ölçüm alınmıştır. HT-29 hücre hattı için ilk birkaç saatlik inkübasyon

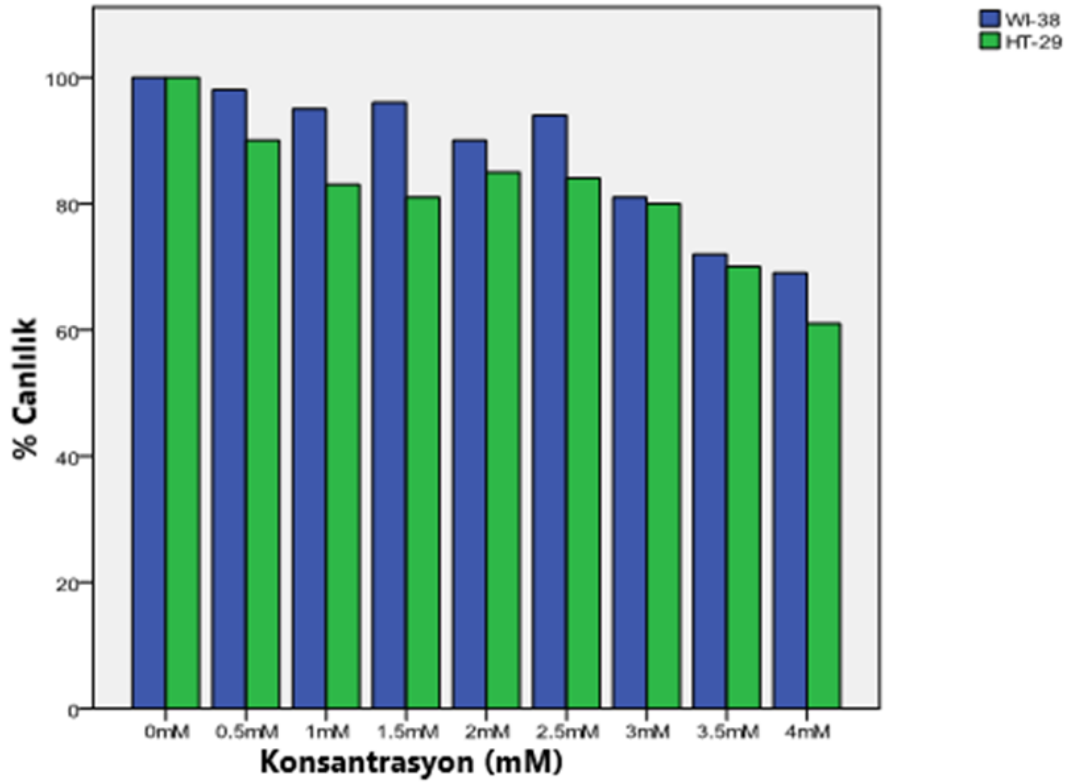
süresinde 5-ALA emiliminin düşük olduğu 5. saatte maksimuma ulaşır devam eden saatlerde giderek azaldığı görülmüştür. WI-38 hücrelerinde absorbans değerleri tüm ölçüm boyunca daha düşük değerler vermiştir. 4. saatten sonra 5-ALA'nın WI-38 hücre hattında neredeyse tamamen atıldığı görülmüştür.

4.1.2. 5-ALA'nın sitotoksik etkisi

Çalışmada 5-ALA'nın tedavi için kullanılacak dozunu optimize etmek amacıyla HT-29 kolon kanseri ve WI-38 akciğer fibroblastı hücre hatları 8 farklı 5-ALA konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda MTT testiyle hücre canlılıkları analiz yapılmıştır. 5-ALA konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı yüzdeleri Tablo 4.1.'de görüldüğü gibidir. MTT testi sonuçları değerlendirilerek uygulanacak konsantrasyon 0.5 ve 1 mM 5-ALA olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 5-ALA farklı konsantrasyonlardaki hücre canlılığı yüzdeleri

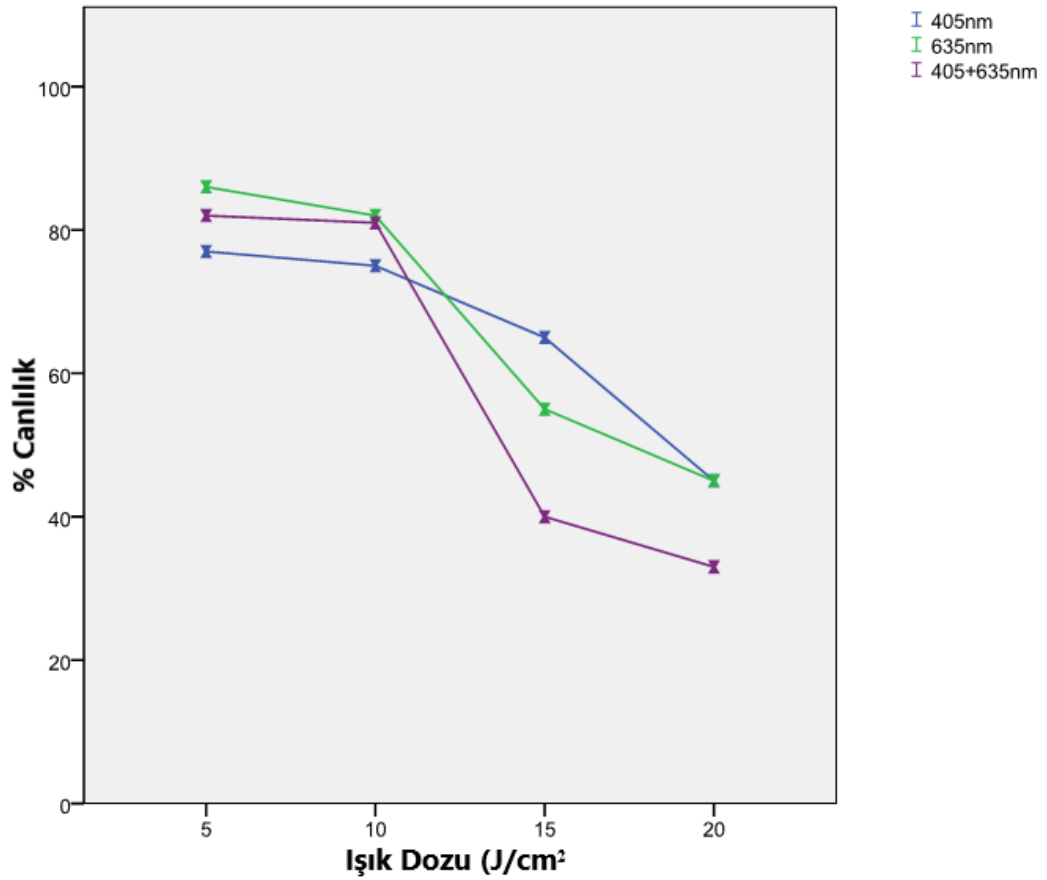
Konsantrasyon	% Yüzde Canlılık	
	WI-38	HT-29
0,5 mM	% 97,61	% 89,65
1 mM	% 95,63	% 83,09
1,5 mM	% 95,83	% 80,7
2 mM	% 90,35	% 85,43
2,5 mM	% 94,61	% 83,66
3 mM	% 80,7	% 79,58
3,5 mM	% 71,76	% 70,82
4 mM	% 68,61	% 61,32



Şekil 4.2. Çalışma konsantrasyonlarındaki hücre canlılık yüzdeleri

4.1.3. Fototoksisitenin belirlenmesi

HT-29 hücre hattı üzerinde in vitro 5-ALA aracılı fotodinamik terapi uygulamaları için 5-ALA olmadan sadece ışığın yoğunluğunun hücreler üzerindeki etkisinin optimizasyonu test edilmiştir. 5 J/cm², 10 J/cm², 15 J/cm² ve 20 J/cm² olmak üzere 4 farklı ışık yoğunluğu 405 nm, 635 nm ve 405+635 nm olmak üzere 3 tip dalga boyu modeli ile denenmiştir.



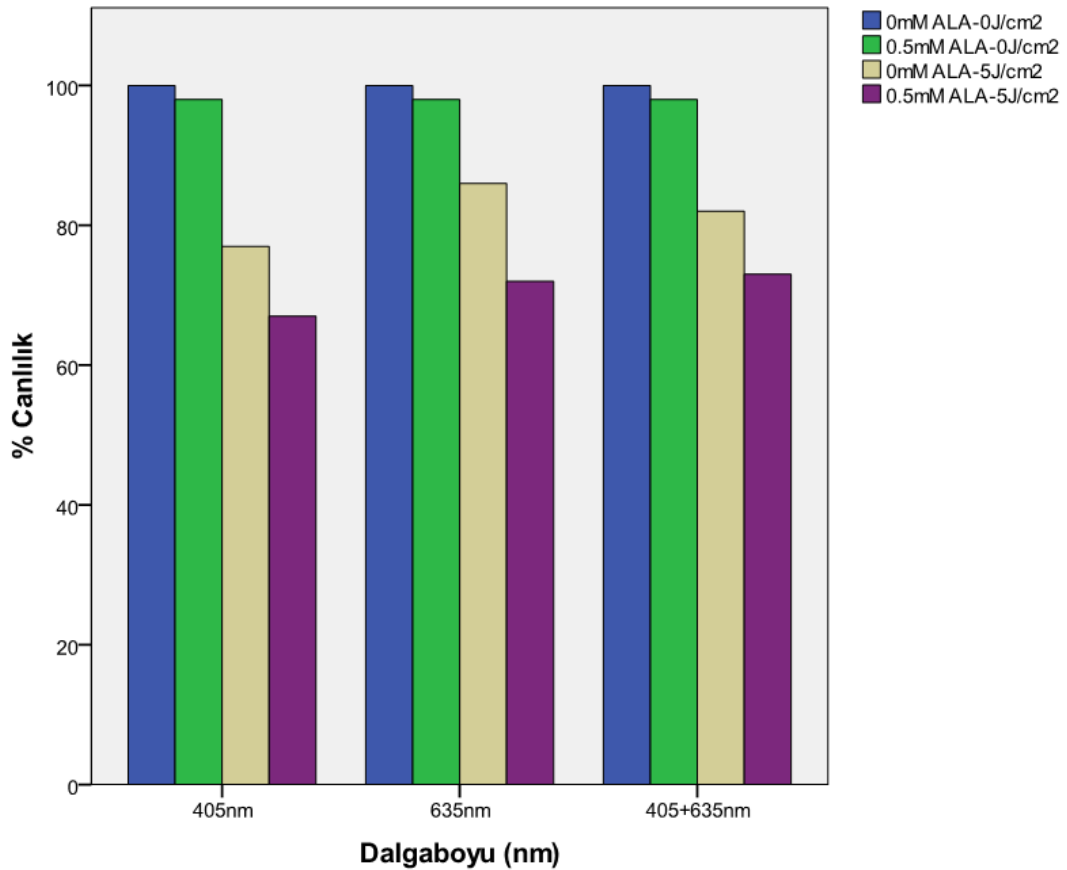
Şekil 4.3. Farklı ışık dozlarında hücre canlılık yüzdeleri

Uygulama 1'e ait sonuçlar Şekil 4.3.'de verilmiştir. Bu uygulamada ilk grup hücreler üzerinde hiçbir ilaç uygulaması yapmadan 30 mW/cm² güç ile 166 sn boyunca yani 5 J/cm² enerji yoğunluğunda uyarılmıştır. MTT testi sonucu hücre canlılık yüzdesi uygulama 1'de 405 nm'de %77, 635 nm'de %82, 405+635 nm'de %86 olarak belirlenmiştir. Uygulama 2'de 30 mW/cm²güç ile 333 sn boyunca yani 10 J/cm² enerji yoğunluğunda uyarılmıştır. MTT testi sonucu hücre canlılık yüzdesi 405 nm'de %75, 635 nm'de %81, 405+635 nm'de %82 olarak belirlenmiştir. Uygulama 3 'de 30 mW/cm² güç ile 500 sn boyunca yani 15 J/cm² enerji yoğunluğunda uyarılmıştır. MTT testi sonucu hücre canlılık yüzdesi 405 nm'de %65, 635 nm'de %40, 405+635 nm'de %55 olarak belirlenmiştir. Uygulama 4'te 30 mW/cm²güç ile 666 sn boyunca yani 20 J/cm² enerji yoğunluğunda uyarılmıştır. MTT testi sonucu hücre canlılık yüzdesi 405 nm'de %45, 635 nm'de %33, 405+635 nm'de %45 olarak belirlenmiştir.

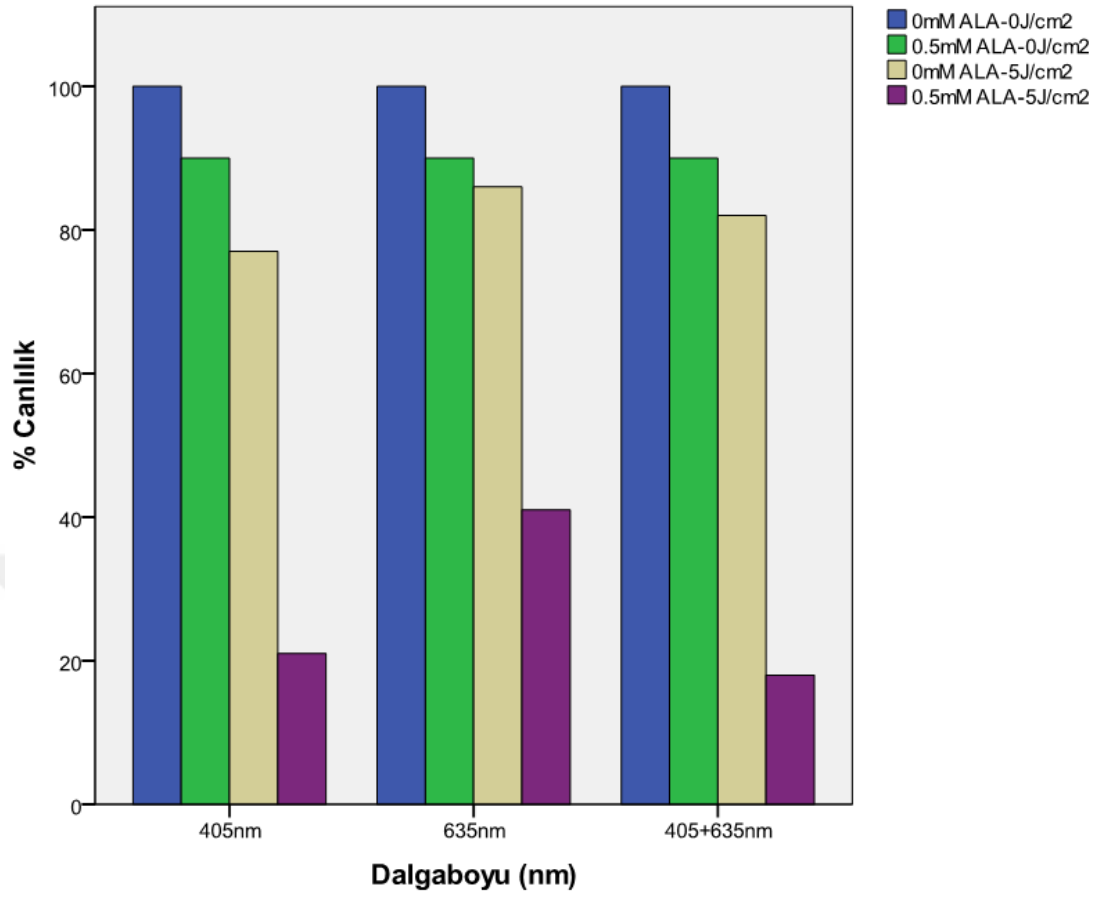
4.2. Ana Çalışma Bulguları

Ana çalışma optimizasyon deneylerinde yapılan sonuçlar göz önüne alınarak fotodinamik tedavi 5 saat inkübasyon süresi, 0,5 mM ve 1 mM 5-ALA konsantrasyonları, 5 J/cm² enerji yoğunluğunda gerçekleştirilmiştir. Tedaviden 24 saat sonra MTT testiyle hücre canlılıkları analizi yapılmıştır.

Uygulama 5’de 0,5 mM 5-ALA konsantrasyonunda WI-38 hücre hattı 5 saatlik inkübasyonun ardından 5 J/cm² enerji yoğunluğunda 3 farklı dalga boyunda LED ile ışınlanmıştır. Sonuçlar tedaviden 24 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı yüzdeleri 435 nm dalga boyunda %67, 635 nm’de %72, 405+635 nm’de %73 olarak belirlenmiştir.

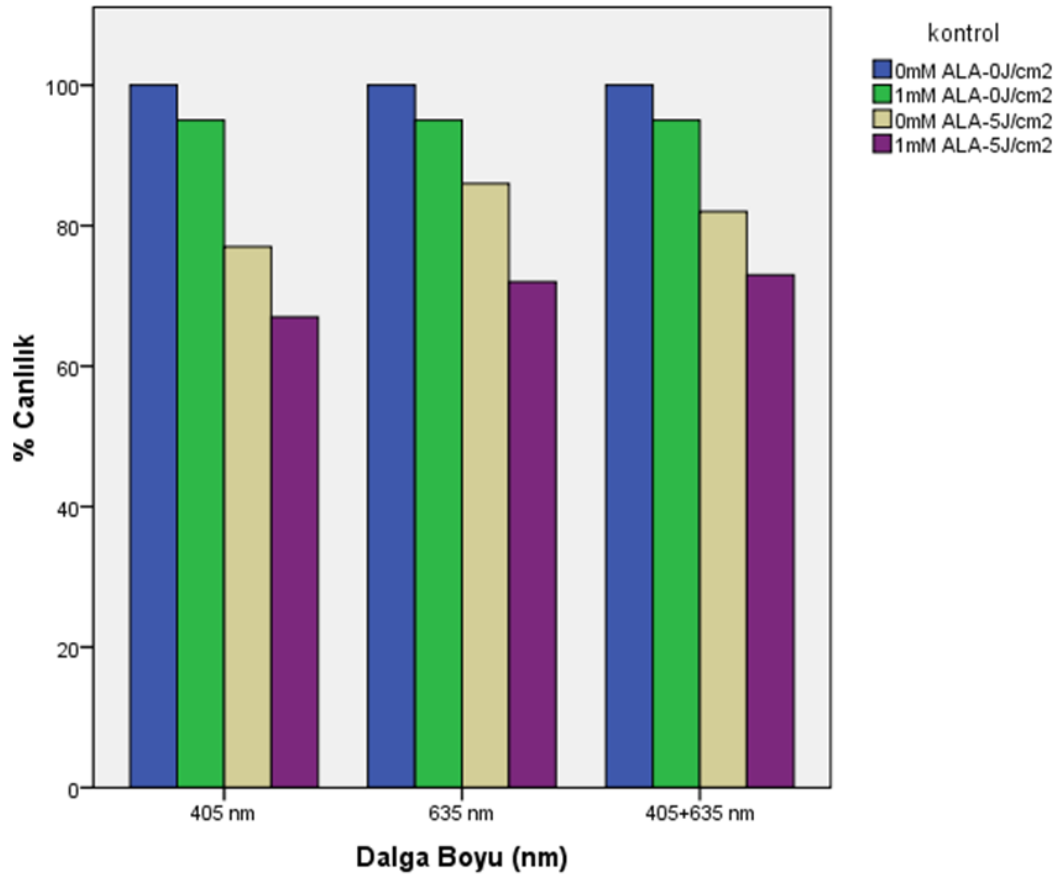


Şekil 4.4. Uygulama 5 hücre canlılık yüzdeleri



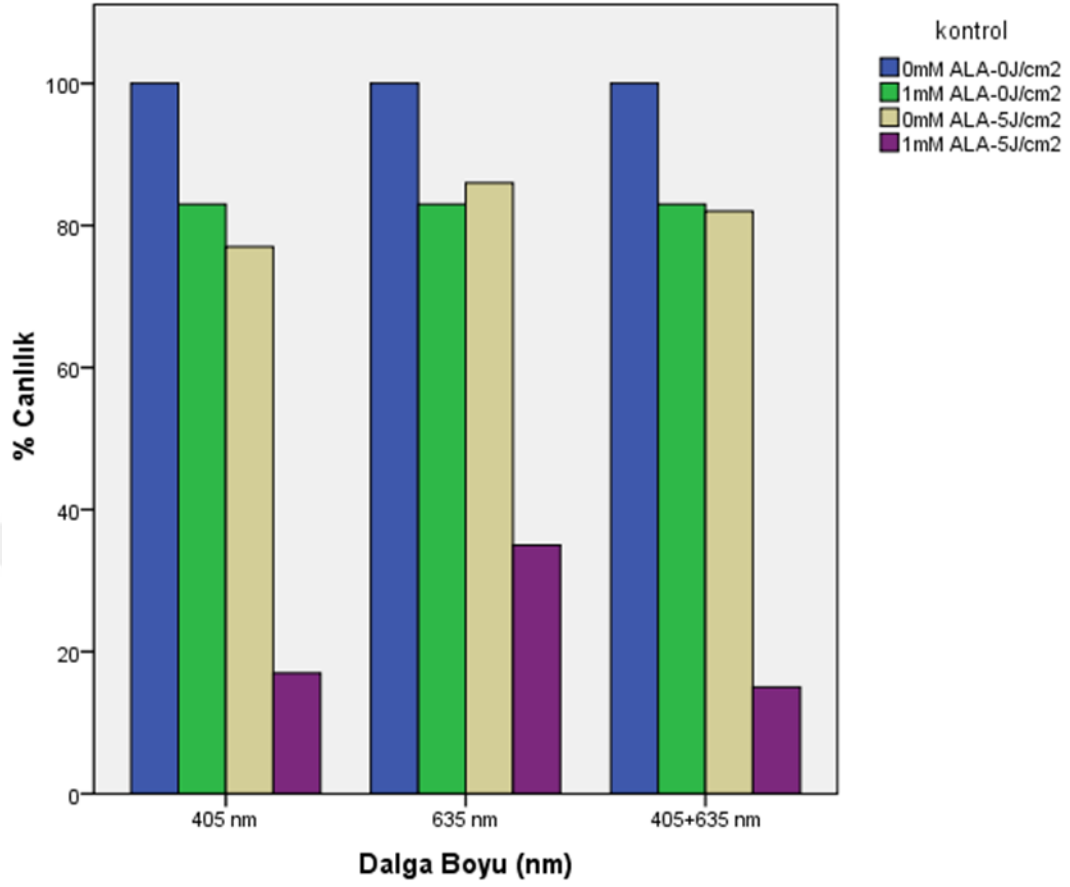
Şekil 4.5. Uygulama 6 hücre canlılık yüzdeleri

Uygulama 6'de 1 mM 5-ALA konsantrasyonunda WI-38 hücre hattı 5 saatlik inkübasyonun ardından 5 J/cm² enerji yoğunluğunda 3 farklı dalga boyunda LED ile ışınlanmıştır. Sonuçlar tedaviden 24 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı yüzdeleri 435 nm dalga boyunda %57, 635 nm'de %68, 405+635 nm'de %71 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Uygulama 7 hücre canlılık yüzdeleri

Uygulama 7’de 0,5 mM 5-ALA konsantrasyonunda HT-29 hücre hattı 5 saatlik inkübasyonun ardından 5 J/cm² enerji yoğunluğunda 3 farklı dalga boyunda LED ile ışınlanmıştır. Sonuçlar tedaviden 24 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı yüzdeleri 435 nm dalga boyunda %21, 635 nm’de %41, 405+635 nm’de %18 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Uygulama 8 hücre canlılık yüzdeleri

Uygulama 8’de 1 mM 5-ALA konsantrasyonunda HT-29 hücre hattı 5 saatlik inkübasyonun ardından 5 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 3 farklı dalga boyunda LED ile ışınlanmıştır. Sonuçlar tedaviden 24 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı yüzdeleri 435 nm dalga boyunda %17, 635 nm’de %35, 405+635 nm’de %15 olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fotodinamik tedavi, kanser hücrelerini öldürmek için ışıkla birlikte fotosensitizer olarak adlandırılan özel ilaçlar kullanan bir tedavi yöntemidir. İlaçlar sadece belirli dalga boylarında uyarıldıktan sonra etkinleşmektedir. Vücudun tedavi edilen kısmına bağlı olarak, ışığa duyarlı hale getirici ajan ya bir damar yoluyla kan dolaşımına ya da lokal olarak uygulanır. Ajan, vücudunun tüm hücreleri tarafından emilir, ancak kanser hücrelerinde normal hücrelerde olduğundan daha çok birikir ve daha uzun süre kalır. Belli bir süre içinde ilaç kanser hücreleri tarafından emilir. Ardından tedavi edilecek bölgeye ışık uygulanır. Işık, ilacın reaksiyona girmesine ve hücreleri öldüren özel bir oksijen molekülü oluşturmaya neden olur. FDT, ayrıca kanser hücrelerini besleyen kan damarlarını yok ederek ve bağışıklık sistemini kansere saldırması için uyararak da yardımcı olabilir.

5-aminolevulinik asit (5-ALA) fotodinamik tedavide yaygın olarak kullanılan bir fotosensitizerdir. 5-aminolevulinik asit, hem grubunun biyosentezinde başlangıç olarak belgelenmiştir. İnkübasyon süresi boyunca, 5-ALA, dahil edildiği hücrelerdeki hem biyosentezi yoluyla protoporfirin IX'a (PpIX) dönüştürülmektedir. Kanser ve kanser öncesi hücrelerde, PpIX'i heme dönüştüren enzimin daha aktif olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla daha fazla PpIX biriktirir. PpIX'in çevre dokuya göre kanserde ve kanser öncesi hücrelerde birikmesi ALA-FDT'nin hedefli bir yaklaşım olmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada da ışığa duyarlı ajan olarak 5-ALA kullanılmıştır.

PpIX, mavi ve kırmızı ışık dahil görünür ışık spektrumu boyunca daha küçük piklerle ultraviyole spektrumda bir pik emilimine sahiptir [93]. ALA-FDT 'de genellikle, 635 nm civarında kırmızı ışık veya 405 nm civarında mavi ışık FDT için ışık kaynağı olarak kullanılmaktadır. 405 nm dalga boyu en yüksek emme katsayısına sahiptir

ancak nisbeten daha düşük penetrasyon derinliği göstermektedir. Bundan dolayı mavi ışık derin yerleşimli hastalıklar için dezavantajlıdır. Kırmızı ışık durumunda ise düşük emilim katsayısı nedeniyle tedavi süresinin uzatılması gerekmektedir. FDT verimliliği, bu iki dalga boyunun kombine hale getirildiği yeni bir ışık kaynağı kullanılarak geliştirilebileceği düşünülmüş ve çalışmada 405 nm, 635 nm ve ikisinin kombine hale getirildiği 405+635 nm dalga boyları kullanılmıştır.

Genel olarak ışığa duyarlı ajanın absorpsiyon spekturumu aralığında dokulara yeterince nüfus edebilen ve uygun bir ışık gücüyle yayılan herhangi bir kaynak FDT’de kullanılabilir. LED’lerin ışık verimliliği günümüzde önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ayrıca LED’ler daha az ısı yaymaktadır ve böylece enerji kaybını en aza indirmektedir. Yarı iletken teknolojisi alanındaki gelişmeler nedeniyle, LED’ler olağanüstü dayanıklılığa sahiptir ve nispeten ucuzdur. Geniş spektrumları nedeniyle, fotosensitizerin spektral kaymasını telafi edebilmektedirler. Ayrıca, LED’ler oldukça seçici emisyon dalga boylarıyla üretilebilmektedirler [86, 94]. Bu nedenle, LED’ler FDT uygulamaları için birden fazla dalga boyu sağlamak için umut verici bir ışık kaynağıdır. Bu çalışmada da birden fazla dalga boyu kullanıldığından LED ışık kaynağı kullanımı uygun görülmüştür.

Ayrıca LED’ler ışınlanması gereken ilgili alana veya organa uyacak şekilde mekansal olarak düzenlenebilmektedir. Kalın bağırsak (kolon) gastrointestinal (GI) kanalda bulunmaktadır. Gastrointestinal kanalda bulunan organlar, ışık için kolayca erişilebilen yüzeysel ve büyük mukozal bölgelerdir. Endoskopik ablatif yöntemler ile ulaşılması ve kolektomi yöntemiyle kolonun kısmi veya tamamen vücut dışına çıkarılması mümkündür. Klinikte yeri olan bir çalışma olması için çalışmamızda kanserli hücre hattı olarak kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır [55]. Ayrıca fotodinamik tedavide ilaç uygulaması genellikle topikal olduğu için ilacın sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi de büyük önem teşkil etmektedir. Bu sebeple deneylerin sağlıklı hücreler üzerinde de yapılması gerekmektedir. Literatürde sağlıklı hücreler üzerinde fotodinamik tedavi uygulamalarının eksikliği görülmüş ve çalışmaya WI-38 akciğer fibroblastı, sağlıklı hücrede fotodinamik tedavi etkilerini görmek ve tedaviyi öyle planlamak amacıyla kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında yapılan literatür araştırmasında in vitro FDT çalışmalarında 5-ALA'nin farklı hücre hatları ile etkileri araştırılmıştır.

Schwake ve ark. [95], 5-ALA ön işleminden sonra PpIX biriktiği gösterilen çeşitli pediyatrik beyin tümörleri olan medulloblastom (DAOY, UW228), pNET (PFSK-1) ve rabdoid tümör (BT16) hücre hatlarının fotodinamik tedaviye duyarlı olup olmayacağı araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) 5-ALA ile 4 saat inkübasyondan sonra 25 J/cm² enerji dozunda ve 635 nm dalga boyunda bir diyet lazerle gerçekleştirilen tedavinin sonuçlarını WST-1 hücre proliferasyon testi ile analiz etmişlerdir. İn vitro yapılan bu çalışmada FDT'nin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde canlılığı azalttığını bulmuşlardır.

A. Kawczyk-Krupka ve ark. [96], farklı malignite potansiyeli olan SW480 ve SW620'nin insan kolorektal kanser hücrelerini kullanmışlardır. Hücre hatları, in vivo hipoksiye benzer koşullara ulaşmak için ALA ile muamele etmişlerdir. FDT kolorektal kansere kişiselleştirilmiş bir yaklaşımın bileşeni olabilir, bu nedenle normokside ve kobalt klorür (CoCl₂) kaynaklı hipoksinin ICAM-1 ve VCAM-1 üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Daha sonra hücreler, hem normokside hem de hipoksi benzeri koşullarda 600-720 nm dalga boylarına geçiren kızılötesi ve turuncu filtrelerle uyumlu tutarsız bir ışık kaynağı ile görünür ışıkla 10, 30 ve 60 J/cm² enerji yoğunluğunda ışınlanmıştır. Hücre canlılığı LDH ve MTT analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Deney sonucunda, normoxia ve CoCl₂ ile indüklenen hipokside ALA-PDT'nin, in vitro kolon kanseri hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin salgılanmasına etkisi olmadığını ortaya koymaktadır ayrıca canlılık istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır.

J.F. Cornelius ve ark. [97], ilk kez kordoma hücre hattında (U-CH2) 5-ALA aracılı fotodinamik tedavi gerçekleştirmişlerdir. Kordomalar kafatası tabanı ve sakrumun çok nadir görülen tümörleridir. Farklı 5-ALA konsantrasyonları ile 6 saat inkübasyondan sonra PPIX birikimi, akışkan sitometrisi ile belirlenmiştir. 635 nm dalga boyunda 30 mW/cm² güçte ve 18.75 J/cm² enerji yoğunluğunda lazer ışığına maruz bırakılmıştır. Hücre sağkalımı, WST-1 deneyi kullanılarak lazer ışığına maruz

kaldıktan 24 saat sonra ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarla ilk kez, insan kordoma hücrelerinin ALA- FDT ile yok edilebileceği gösterilmiştir.

F. Şueki ve ark. [98], 5-ALA aracılı FDT'yi insan epitel hücre hattı olan PC-3 ve Caco-2 iki hücre hattı üzerinde test etmişlerdir. Belirlenen FDT dozları, iki farklı Curcumin konsantrasyonu ile birlikte hücre hatlarına uygulanmıştır. 6 saatlik inkübasyon süresinden sonra farklı lazer enerji yoğunlukları (0, 1, 2,5, 5, 10 ve 20 J/cm²) ile sürekli dalga (CW) modunda 635 nm diyot lazer ile ışınlanmıştır. Hücre canlılığı tedaviden 24 saat sonra MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 5-ALA aracılı PDT, curcumin ile birleşerek, yüksek dirençli bir kanser hücre dizisi olarak kabul edilen Caco-2 üzerinde sinerjik olarak artmış antitümör FDT etkinliği göstermiştir.

Austin ve ark. [99], deri yassı epitel hücre hattında (SCC-13) 0, 0,5, 1 ve 2 mM 5-ALA ile 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve 417 nm mavi ışıkla 1000 saniye süreyle fotoaktif edilmiştir. Annexin-V testi uygulanmış ve yüksek oranda apoptoz görülmüştür.

Hatakeyama ve ark. [100], ALA-PDT'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde çeşitli LED'ler kullanılarak antitümör etkisini değerlendirmiştir. 1 mM 5-ALA ile 3 saatlik inkübasyon süresinin ardından hücreler, 16 mW/cm güç ve 3 J/cm² enerji yoğunluğunda LED ile ışınlanmıştır. Üç tip LED, mavi (tepe dalga boyu, 456 nm), beyaz (geniş bant) ve kırmızı (635 nm) kullanılmıştır. Işınlamadan yirmi dört saat sonra, ALA-PDT'nin sitotoksik etkileri MTT deneyi kullanılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı, tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktür ve mavi ve beyaz LED'ler, kırmızı LED'lere kıyasla daha fazla antitümör etkisi göstermiştir.

Literatürde çeşitli kanser hatları üzerinde 5-ALA tabanlı gerçekleştirilen yukarıda bahsedilen ve daha birçok çalışmalar incelenmiş olup 5-ALA'nın çalışıldığı ve etkili olduğu dalga boylarının değişiklik gösterdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında bu konu üzerine yoğunlaşmış ve mavi ışık, kırmızı ışık ve bunların kombine halini

içeren yeni bir kaynakla tedavi uygulanmıştır. Kullanılan güç ve enerji yoğunluklarına karar verilirken literatür çalışmaları baz alınmıştır.

Tez çalışması optimizasyon deneyleri ve bu deneyler sonucunda alınan bulgular kullanılarak ana deneyler olmak üzere iki esas bölümden oluşmaktadır. Optimizasyon çalışmalarıyla tedavi için en iyi koşulların bulunması amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda inkübasyon süresi, en iyi ilaç ve ışık dozu belirlenmiştir.

İnkübasyon süresinin belirlenmesi tedavi etkinliği açısından çok önemlidir. Hücrelerin ilaç doyumuna ulaştığı noktada ışınlama yapmak tedavi etkinliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Ayrıca tedaviye başlanan sürede sağlıklı hücrelerin ilaçtan temizlenmiş olması gerekmektedir aksi durumda sağlıklı hücreler nekroza uğrayacaktır. Literatür çalışmalarında farklı hücreler için etkili 5-ALA Emilimi için farklı inkübasyon süreleri gözlenmiştir.

C. M. N. Yow ve ark. [101], 5-ALA aracılı fotodinamik tedavinin insan hepatosellüler karsinom hücre dizisi olan HepG2 üzerindeki inkübasyon süresi çalışmalarında maksimal ilaç alımı, in vitro inkübasyondan 18 saat sonra meydana gelmiştir. PpIX'in esas olarak HepG2 hücrelerinin sitoplazmasında bulunduğunu gözlemlemiştir.

M. Atif ve ark. [102], HeLa hücre hattında hücreler 5-ALA ile 0-48 saat boyunca inkübe edilmiş ve ilk 9 saat her saat başı sonrasında 16, 18, 24 ve 48 saatlerde mikropiloksin okuyucu ile PpIX'in emilim dalga boyuna karşılık gelen 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. İlk 3 saatte düşük 4. saatten sonra absorbansın arttığı görülmüştür. Maksimum değerine 18. saatte ulaşılmış ve inkübasyon süresi 18 saat olarak belirlenmiştir. Aynı grup araştırmacılar 2010 senesinde insan kas kanseri hücre hattı RD hücreleriyle 5-ALA bazlı çalışmada ilk 7 saat her saat başı sonrasında 22-29 saatleri arası ve 47. ve 48. saatlerde alınan ölçümlerle 48 saatlik inkübasyon süresinin maksimum absorbans verdiğini görmüşlerdir [103].

Bu, ALA'nın hücre alımının hücre tipine bağlı olduğunu gösterir. Ayrıca ALA dışındaki bir ışığa duyarlılaştırıcı için HT-29 hücreleri için farklı bir inkübasyon süresine ihtiyacımız vardır [104], bir ışığa duyarlılaştırıcının hücre alımının yapıya bağlı olabileceğini gösterir. Bu deney WI-38 hücreleri için inkübasyon süresinin belirlendiği ilk çalışmadır daha önce sağlıklı hücrelerle kıyaslamalı olarak fotodinamik tedavi için inkübasyon süresi belirlenmemiştir.

Şekil 4.1.'de gösterilen sonuç, çeşitli inkübasyon süreleri için kanserli ve sağlıklı hücrelerde ALA'nın hücre alımına karşılık gelmektedir. Bu sonuçlara göre HT-29 hücrelerindeki ALA emilimi ilk birkaç saatlik inkübasyon süresinde çok düşüktür ve 5 saatlik inkübasyondan sonra ALA emilimi maksimumuna ulaşmıştır ve ilerleyen saatlerde giderek azalmıştır. WI-38 hücrelerinde daha düşük absorbans değerleri gözlenmiştir bu kanserli hücrelerin sağlıklı hücrelere göre daha çok PpIX biriktirdiğinin ispatı niteliğindedir. Aynı zamanda WI-38 hücrelerinin hücre içi PpIX'i 4 saatten sonra neredeyse tamamen hücreden attığı gözlemlenmektedir. Bu tedaviye başlandığında canlı hücrelerin ilaçtan temizlendiği için zarar görmeyeceği anlamına gelmektedir. Inkübasyon süresi belirlemede 3 farklı doz kullanılmıştır. Bu bir nevi deney ispatı gerçekleştirmek için yapılmıştır çünkü hangi doz olursa olsun inkübasyon süresi deneyinde her dozun etkisinin aynı olması beklenmektedir. Sonuçlar da bunu destekler niteliktedir. Üç farklı 5-ALA konsantrasyonunda absorbans seviyelerinin neredeyse aynı olduğu görülmektedir. Bu konsantrasyonlar için sonuçlardaki ihmal edilebilir farklılıklar, belirli bir konsantrasyon için 5-ALA emiliminin hücre alımına uygunluğa ulaştığı şeklinde yorumlanabilir.

Bu sonuçlara dayanarak, ALA'nın HT-29 hücrelerinde inkübasyon süresini 4-6 saat arasında optimize edilebilmektedir, çünkü bu aralıkta etkili FDT sonuçlarına neden olmak için yeterli ALA emilimi alınmıştır. Bu çalışmada inkübasyon süresi olarak 5 saat kullanılmıştır.

Fotodinamik tedavide ışığa duyarlı ajanın konsantrasyonu da büyük önem teşkil etmektedir. Sadece ilaçla yapılan deneylerde ilacın yüksek toksisite göstermesi istenmeyen bir durumdur. Çünkü amaç kanserli hücreyi sadece ilaçla değil ışıkla

kombin halindeyken yani tedaviyle öldürmektir. Sadece ilacın toksik etki gösterdiği konsantrasyonlar in vivo düşünüldüğünde sağlıklı hücreleri de nekroza sürükleyeceği anlamına gelmektedir ve bu istenmeyen bir durumdur. Şekil 4.2., HT-29 ve WI-38 hücrelerinin ışınlama olmadan hayatta kalma oranları üzerinde artan 5-ALA konsantrasyonlarının etkilerini göstermektedir. Düşük ilaç dozlarında ışığa maruz kalmadan hücrelere ilaç enjeksiyonu nedeniyle dikkate değer bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Sağlıklı hücre hattı olan WI-38, kanser hücrelerine göre daha az hücre içinde PpIX birikimi gösterdiğinden ölüm oranları daha düşüktür. Bu sonuç PpIX'in kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere göre daha fazla biriktiğinin ve daha uzun süre kaldığının bir başka ispatıdır. Düşük dozlarda sadece ilacın çok fazla toksik etkisinin olmadığı görülmüş, 3-4 mM arası nisbeten daha yüksek 5-ALA konsantrasyonları için, hücresel bileşenlerle daha yüksek konsantrasyonlarda 5-ALA'nın toksisitesini temsil edebilecek düzeyde sitotoksikite gözlenmiştir. HT-29 hücrelerinde 2 mM ve 2.5 mM 5-ALA dozları için, hücre canlılığı, daha düşük dozlar olan 1 ve 1.5 mM dozlarındakine göre daha fazladır. Bu sonuçlar henüz 5-ALA kimyasal özelliğinin, bu konsantrasyonda HT-29 hücrelerinin yaşayabilirliğinin artmasına yardımcı olduğu şeklinde açıklanabilmektedir. Ancak yine de bu konunun keşfedilmesi için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır. Fotodinamik tedavide, çok yüksek ilaç konsantrasyonuna atfedilebilecek nekrotik hücre ölümünü tetiklemekten kaçınabilmek için daha düşük bir ilaç dozu tercih edilir. Bu nedenle, HT-29 hücrelerinde ALA-FDT için 0,5 ve 1 mM'lik hafif doz, etkili sonuçlar üretmek için kullanılabilir.

Yalnızca ilacın toksik etki göstermesinin istenmemesi gibi ışığın da tek başına toksik olmaması gerekmektedir. Işık tek başına hücreyi öldürüyorsa bu hücrenin tedaviden dolayı değil sıcaklık veya bazı dış etkenlerle istenmeyen bir şekilde nekroza uğradığı anlamına gelmektedir. Bu sebeple tek başına ışığın fototoksikitesinin en az olduğu değer tedavi için uygundur ve optimizasyon çalışmalarıyla bu belirlenmelidir. FDT'nin klinik etkinliği, ışığın dozimetrisine bağlıdır: toplam ışık dozu, ışığa maruz kalma süresi ve ışığa maruz kalma modu FDT yanıtını da doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada belirlenen değerler literatür çalışmalarıyla belirlenmiştir. Şekil 4.3.'te gösterilen 5 J/cm² ila 20 J/cm² aralığındaki ışınlama

dozları için hücre yaşayabilirliğine karşılık gelen sonuçlar, hücre yaşayabilirliğinin, ışığa duyarlılaştırıcılar olmadan test edilen doz aralıklarında düşük dozlarda önemli ölçüde etkilenmediğini kanıtlamıştır. 30 mW/cm² çıkış gücü kullanılmıştır. Veriler, 10 J/cm² değerinden sonra yüksek ışık dozları üzerinde bazı toksisiteyi göstermektedir. Fotodinamik terapi tedavisinde, çok yüksek ışık yoğunluğuna atfedilebilecek nekrotik hücre ölümünü tetiklemekten kaçınabilmek için daha düşük bir ışık dozu tercih edilir. Bu nedenle, HT-29 hücrelerinde ALA-FDT için 5 J/cm² 'lik hafif doz, etkili sonuçlar üretmek için kullanılabilir.

Yapılan bu inkübasyon süresi, sitotoksikite ve fototoksikite çalışmalarından sonra belirlenen optimum dozlarla ana çalışma gerçekleştirilmiştir.

405 nm dalga boyu, PpIX'in Emilimi göz önüne alındığında en toksik olanıdır, ancak cilde düşük nüfuzu vardır. Bu nedenle, çoğu çalışma ALA-FDT için kullanılan bir diğer dalga boyu olan 635 nm ile gerçekleştirilmektedir [95, 97, 98]. Ancak bu dalga boyu da düşük emilim katsayısına sahiptir.

Tomoya Hatakeyama ve ark. [100], in vitro ve in vivo olarak yaptıkları çalışmalarda mavi ışığın kırmızı ışığa göre daha etkili olduğunu sunmuşlardır. İn vivo çalışmada penetrasyon derinliği düşünüldüğünde beklenen sonuç bu değildir ancak yine de mavi ışığın daha etkin olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ALA-FDT için 405 nm, 635 nm ve bu iki dalga boyunun kombine hale geldiği 405+635 nm dalga boyunda LED kullanılmıştır. Sonuçlar, standart doz çizgisine kıyasla 405 nm ve 635 nm kombinasyonunun daha etkili olduğunu ve sadece 405 nm kadar etkili olduğunu doğrulanmıştır. 405 nm + 635 nm'deki toplam hücre ölümü kontrolünkinden önemli ölçüde daha yüksektir ve tek başına 405 nm ve tek başına 635 nm ile karşılaştırılabilir.

Bu bulgular, 405 nm ve 635 nm ışığın kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde en büyük sinerjistik etkileri ürettiğini göstermektedir. Şekil 4.7.'de deneysel sonuçlar, HT-29 hücre hattının canlılığının, 5 J/cm² lazer ışık dozu ile tedavi edildiğinde 1 mM 5-ALA ile önemli ölçüde azaldığını ve 405 nm'de % 17'e, 635 nm'de %35'e ve iki

dalga boyunun kombine olduğu 405+635 nm’de %15’e düştüğünü gösterdi. Bu nedenle, ilaç ve hafif dozların uygun kombinasyonunun ve belki de uygun ışınlama süresinin FDT gerçekleştirilirken kanserli hücelere maksimum zarar verebileceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda 5 saat inkübasyon süresi ile en yüksek PpIX birikimiyle tedavi etkinliği arttırılmıştır. Sağlıklı hücre hattında bu sürede ilacın temizlenmiş olması klinik açıdan çok önemlidir.

Bu çalışma ile ortaya konan ALA-FDT’nin insan kolon adenokarsinom hücrelerinin inhibisyonununa, ALA’nin ve LED’in yalnız uygulamalarında toksititeye neden olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, ALA-FDT klinik uygulamalar için uygun olabileceği gösterilmiştir. Klinikte, cerrahinin mümkün olmadığı tümörlerde, metastatik tümörlerde ameliyat esnasında alternatif tedavi seçeneği olarak tercih edilebilir. ALA-FDT’nin klinik etkisinin daha net öngörülmesi için in vivo araştırmalar ve klinik denemeler yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, literatüre özgün katkıda bulunacağı ve ileride yapılacak çalışmalar için veri kaynağı olacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kalumuck, K. E., & Doss, K. Book Review: Review of: National Institutes of Health Curriculum Supplements: Human Genetic Variation and Cell Biology and Cancer, by Biological Sciences Curriculum Study and Videodiscovery; 1999; <http://science.education.nih.gov/customers.nsf/highschool.htm>. Cell Biology Education, 3(3), 152-154, 2004
- [2] Bommer, U. A., & Vine, K. L. Cancer biology: molecular and genetic basis., 2014
- [3] Bray, F., Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394-424, 2018
- [4] www.cancer.org., Erişim Tarihi: 04.01.2019
- [5] Blackadar, C. B. Historical review of the causes of cancer. World journal of clinical oncology, 7(1), 54, 2016
- [6] Golemis, E. A., Scheet, P., Beck, T. N., Scolnick, E. M., Hunter, D. J., Hawk, E., & Hopkins, N. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. Genes & development, 32(13-14), 868-902, 2018
- [7] <https://gco.iarc.fr/today/home>. Erişim Tarihi: 16.01.2019
- [8] Sudhakar, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. Journal of cancer science & therapy, 1(2), 1, 2009
- [9] Kalyanaraman, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. Redox biology, 12, 833-842, 2017
- [10] <https://tr.medicineh.com/68-picture-of-the-intestines-66962>., Erişim Tarihi: 23.05.2019
- [11] www.cancerresearchuk.org., Erişim Tarihi: 11.02.2019
- [12] Azzouz, L. L., & Sharma, S. Physiology, large intestine. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2020

- [13] Kahai, P., Mandiga, P., & Lobo, S. Anatomy, abdomen and pelvis, large intestine,2017
- [14] <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq> Erişim Tarihi: 17.03.2019
- [15] Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., ... & Arauz-Peña, G. Colorectal cancer: a review. *Int. J. Res. Med. Sci*, 5(11), 4667-4676,2017
- [16] A. Kuzu, Kolon polipleri,2015
- [17] Nguyen, H. T.,& Duong, H. Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18,2018
- [18] Lauby-Secretan, B., Vilahur, N., Bianchini, F., Guha, N., & Straif, K. The IARC perspective on colorectal cancer screening. *New England Journal of Medicine*, 378(18), 1734-1740,2018
- [19] Mahadevan, V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*, 35(3), 115-120,2017
- [20] Herbst, C. L., Miot, J. K., Moch, S. L., & Ruff, P. Colorectal Cancer (CRC) treatment and associated costs in the public sector compared to the private sector in Johannesburg, South Africa. *BMC health services research*, 20, 1-11,2020
- [21] Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., ... & Alberts, S. R. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(1), 23-30,2004
- [22] Street, W. Cancer facts & figures 2019. *Am Cancer Soc*, 76.,2019
- [23] Moss, A.,& Nalankilli, K. Standardisation of polypectomy technique. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(4), 447-453,2017
- [24] Feagins, L. A. Colonoscopy, Polypectomy, and the Risk of Bleeding. *The Medical clinics of North America*, 103(1), 125-135,2019
- [25] Rutter, M. D.,& Jover, R. Personalizing Polypectomy Techniques Based on Polyp Characteristics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*,2019

- [26] Heafner, T. A., & Glasgow, S. C. A critical review of the role of local excision in the treatment of early (T1 and T2) rectal tumors. *Journal of gastrointestinal oncology*, 5(5), 345, 2014
- [27] Park, S. M., Kye, B. H., Kim, M. K., Jalloun, H. E., Cho, H. M., & Lee, I. K. Are we doing too much?: local excision before radical surgery in early rectal cancer. *International journal of colorectal disease*, 33(4), 383-391, 2018
- [28] Althumairi, A. A., & Gearhart, S. L. Local excision for early rectal cancer: transanal endoscopic microsurgery and beyond. *Journal of gastrointestinal oncology*, 6(3), 296, 2015
- [29] Nastro, P., Beral, D., Hartley, J., & Monson, J. R. Local excision of rectal cancer: review of literature. *Digestive surgery*, 22(1-2), 6-15, 2005
- [30] www.mayoclinic.org Erişim Tarihi: 21.04.2019
- [31] Haller, D. G., Catalano, P. J., Macdonald, J. S., O'Rourke, M. A., Frontiera, M. S., Jackson, D. V., & Mayer, R. J. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8671-8678, 2005
- [32] Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(20), 2050-2059, 2004
- [33] Cirocchi, R., Campanile, F. C., Di Saverio, S., Popivanov, G., Carlini, L., Pironi, D., ... & Vettoretto, N. Laparoscopic versus open colectomy for obstructing right colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Visceral Surgery*, 154(6), 387-399, 2017
- [34] Board, P. A. T. E. Colon Cancer Treatment (PDQ®). In PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US), 2020
- [35] Nosher, J. L., Ahmed, I., Patel, A. N., Gendel, V., Murillo, P. G., Moss, R., & Jabbour, S. K. Non-operative therapies for colorectal liver metastases. *Journal of gastrointestinal oncology*, 6(2), 224, 2015
- [36] Gruber-Rouh, T., Marko, C., Thalhammer, A., Nour-Eldin, N. E., Langenbach, M., Beeres, M., ... & Vogl, T. J. Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases. *The British Journal of Radiology*, 89(1064), 20151060, 2016
- [37] Solbiati, L., Ahmed, M., Cova, L., Ierace, T., Brioschi, M., & Goldberg, S. N. Small liver colorectal metastases treated with percutaneous radiofrequency ablation: local response rate and long-term survival with up to 10-year follow-up. *Radiology*, 265(3), 958-968, 2012

- [38] Simon, C. J., Dupuy, D. E., & Mayo-Smith, W. W. Microwave ablation: principles and applications. *Radiographics*, 25(suppl_1), S69-S83,2005
- [39] Pathak, S., Jones, R., Tang, J. M. F., Parmar, C., Fenwick, S., Malik, H., & Poston, G. Ablative therapies for colorectal liver metastases: a systematic review. *Colorectal Disease*, 13(9), e252-e265,2011
- [40] Bhardwaj, N., Strickland, A. D., Ahmad, F., Dennison, A. R., & Lloyd, D. M. Liver ablation techniques: a review. *Surgical endoscopy*, 24(2), 254-265,2010
- [41] Haddock, M. G. Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review. *Radiation Oncology*, 12(1), 11,2017
- [42] Zenda, S. Chemoradiotherapy, the Standard Treatment at Present. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*, 45(3), 412-415,2018
- [43] Prasad, V., Fojo, T., & Brada, M. Precision oncology: origins, optimism, and potential. *The Lancet Oncology*, 17(2), e81-e86,2016
- [44] Bever, K. M., & Le, D. T. An expanding role for immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(3), 401-410,2017
- [45] Ganesh, K., Stadler, Z. K., Cercek, A., Mendelsohn, R. B., Shia, J., Segal, N. H., & Diaz, L. A. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), 361-375,2019
- [46] Goyle, S., & Maraveyas, A. Chemotherapy for colorectal cancer. *Digestive surgery*, 22(6), 401-414,2005
- [47] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5), 380-387,2003
- [48] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1562/00318655%282001%290740656THOPAP2.0.CO2>
- [49] Daniell, M. D., & Hill, J. S. A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 61(5), 340-348,1991
- [50] Zanolli, M. Phototherapy treatment of psoriasis today. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2), 78-86,2003
- [51] Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506-516,2020
- [52] Kessel, D. More adventures in photodynamic therapy. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15188-15193,2015

- [53] Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., & González, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148-154,2008
- [54] Usuda, J., Kato, H., Okunaka, T., Furukawa, K., Tsutsui, H., Yamada, K., ... & Tsuboi, M. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *Journal of thoracic oncology*, 1(5), 489-493,2006
- [55] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Korbek, M. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281,2011
- [56] Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1-8,2009
- [57] Mansoori, B., Mohammadi, A., Doustvandi, M. A., Mohammadnejad, F., Kamari, F., Gjerstorff, M. F., ... & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for cancer: role of natural products. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 26, 395-404,2019
- [58] Kruger, C. A.,& Abrahamse, H. Targeted Photodynamic Therapy as Potential Treatment Modality for the Eradication of Colon Cancer. In *Multidisciplinary Approach for Colorectal Cancer*. IntechOpen,2019
- [59] Chilakamarthi, U.,& Giribabu, L. Photodynamic therapy: past, present and future. *The Chemical Record*, 17(8), 775-802,2017
- [60] Palumbo, G. Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert opinion on drug delivery*, 4(2), 131-148,2007
- [61] Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R., & Chorilli, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. *Molecules*, 21(3), 342,2016
- [62] Erdem, S. S., Parlar, R. E., Akgül Obeidin, V., & Şahin, U. Skov-3 over kanseri hücre hattında fotodinamik terapi uygulaması,2017
- [63] Davids, L. M., Kleemann, B., Kacerovská, D., Pizinger, K., & Kidson, S. H. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 91(2-3), 67-76,2008
- [64] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2(2), 91-106,2005

- [65] Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1-8,2009
- [66] Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 535-545,2006
- [67] Nowis, D., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbsiak, M., & Gołąb, J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2(4), 283-298,2005
- [68] Moan, J.,& Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 53(4), 549-553,1991
- [69] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., ... & Kulbacka, J. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107,2018
- [70] Sarbu, M. I., Matei, C., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Caruntu, C., Constantin, C., ... & Georgescu, S. R. Photodynamic therapy: A hot topic in dermatology. *Oncology letters*, 17(5), 4085-4093,2019
- [71] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516-2539,2011
- [72] Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G.,& Gomes-da-Silva, L. C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1872(2), 188308,2019
- [73] Hwang, H. S., Shin, H., Han, J., & Na, K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48(2), 143-151,2018
- [74] Ouyang, G., Xiong, L., Liu, Z., Lam, B., Bui, B., Ma, L., ... & Huang, H. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 396-403,2018
- [75] Krammer, B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer research*, 21(6B), 4271,2001
- [76] Allison, R. R.,& Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 7(2), 61-75,2010

- [77] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293,2004
- [78] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., ... & Kulbacka, J. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107,2018
- [79] de Freitas, L. F.,& Hamblin, M. R. Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy* (pp. 1-27). William Andrew Publishing,2016
- [80] Inoue, K. 5- Aminolevulinic acid- mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *International Journal of Urology*, 24(2), 97-101,2017
- [81] Herceg, V., Lange, N., Allémann, E., & Babič, A. Activity of phosphatase-sensitive 5-aminolevulinic acid prodrugs in cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 34-42,2017
- [82] Tewari, K. M.,& Eggleston, I. M. Chemical approaches for the enhancement of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17(11), 1553-1572,2018
- [83] Donnelly, R. F., McCarron, P. A., & Woolfson, D. A. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 1177391X0700100005,2007
- [84] Krieg, R. C., Messmann, H., Rauch, J., Seeger, S., & Knuechel, R. Metabolic Characterization of Tumor Cell-specific Protoporphyrin IX Accumulation After Exposure to 5- Aminolevulinic Acid in Human Colonic Cells. *Photochemistry and photobiology*, 76(5), 518-525,2002
- [85] Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1), 27-42,2004
- [86] Sorbellini, E.,Rucco, M., & Rinaldi, F. Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. *Lasers in Medical Science*, 33(7), 1431-1439,2018
- [87] wikipedia.org/wiki/Aminolevulinic_acid Erişim tarihi:15.06.2020
- [88] Brancalion, L.,& Moseley, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*, 17(3), 173-186,2002

- [89] Seshadri, M., Bellnier, D. A., Vaughan, L. A., Sperryak, J. A., Mazurchuk, R., Foster, T. H., & Henderson, B. W. Light delivery over extended time periods enhances the effectiveness of photodynamic therapy. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2796-2805,2008
- [90] Panjehpour, M., Overholt, B. F., Phan, M. N., & Haydek, J. M. Optimization of light dosimetry for photodynamic therapy of Barrett's esophagus: efficacy vs. incidence of stricture after treatment. *Gastrointestinal endoscopy*, 61(1), 13-18,2005
- [91] <https://www.kolonrektum.com/kolon-kanseri-ve-genetik>
- [92] TOKUR, O.,& AKSOY, A. In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118,2017
- [93] Ozog, D. M., Rkein, A. M., Fabi, S. G., Gold, M. H., Goldman, M. P., Lowe, N. J., ... & Munavalli, G. S. Photodynamic therapy: a clinical consensus guide. *Dermatologic Surgery*, 42(7), 804-827,2016
- [94] Duse, L., Pinnapireddy, S. R., Strehlow, B., Jedelská, J., & Bakowsky, U. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 126, 233-241,2018
- [95] Schwake, M., Nemes, A., Dondrop, J., Schroeteler, J., Schipmann, S., Senner, V., ... & Ewelt, C. In-vitro use of 5-ALA for photodynamic therapy in pediatric brain tumors. *Neurosurgery*, 83(6), 1328-1337,2018
- [96] Kawczyk-Krupka, A., Czuba, Z. P., Kwiatek, B., Kwiatek, S., Krupka, M., & Sieroń, K. The effect of ALA-PDT under normoxia and cobalt chloride (CoCl₂)-induced hypoxia on adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) secretion by colorectal cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 19, 103-115,2017
- [97] Cornelius, J. F., Eismann, L., Ebbert, L., Senger, B., Petridis, A. K., Kamp, M. A., ... & Steiger, H. J. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of chordoma: In vitro experiments on a human tumor cell line. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 20, 111-115,2017
- [98] Şueki, F., Ruhi, M. K., & Gülsoy, M. The effect of curcumin in antitumor photodynamic therapy: in vitro experiments with Caco-2 and PC-3 cancer lines. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 27, 95-99,2019
- [99] Austin, E.,& Jagdeo, J. An in vitro approach to photodynamic therapy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (138), e58190,2018

- [100] Hatakeyama, T., Murayama, Y., Komatsu, S., Shiozaki, A., Kuriu, Y., Ikoma, H., ... & Ochiai, T. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology reports*, 29(3), 911-916,2013
- [101] Yow, C. M. N., Wong, C. K., Huang, Z., & Ho, R. J. Study of the efficacy and mechanism of ALA- mediated photodynamic therapy on human hepatocellular carcinoma cell. *Liver International*, 27(2), 201-208,2007
- [102] Atif, M., Firdous, S., Khurshid, A., Noreen, L., Zaidi, S. S. Z., & Ikram, M. In vitro study of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for apoptosis in human cervical HeLa cell line. *Laser Physics Letters*, 6(12), 886,2009
- [103] Atif, M., Fakhar-e-Alam, M., Firdous, S., Zaidi, S. S. Z., Suleman, R., & Ikram, M. Study of the efficacy of 5-ALA mediated photodynamic therapy on human rhabdomyosarcoma cell line (RD). *Laser Physics Letters*, 7(10), 757,2010
- [104] Ruhi, M. K., Ak, A., & Gülsoy, M. Dose-dependent photochemical/photothermal toxicity of indocyanine green-based therapy on three different cancer cell lines. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 21, 334-343,2018