

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

**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE FOTODİNAMİK
TEDAVİ VE KEMOTERAPİNİN KOMBİN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyzanur ERK

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

TEMMUZ 2023

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

**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE FOTODİNAMİK
TEDAVİ VE KEMOTERAPİNİN KOMBİN ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyzanur ERK

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI

TEMMUZ 2023

Beyzanur ERK tarafından hazırlanan “Triple Negatif Meme Kanserinde Fotodinamik Tedavi ve Kemoterapinin Kombin Etkisinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 11.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Prof. Dr. Mahmut ÖZACAR**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER (Danışman)**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI (Ortak Danışman)**
Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Prof. Dr. Birsen AYDEMİR**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ**
Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “Triple Negatif Meme Kanserinde Fotodinamik Tedavi ve Kemoterapinin Kombin Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(...../...../20.....).

(imza)

Beyzanur ERK



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimde değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, bu çalışmanın gerçekleşmesine destek olan, her zaman bana kıymetli zamanını ayıran ve elinden geleni yapan, meslek hayatımda bana destek olacağını bildiğim ve verdiği bilgilerden faydalanacağım değerli danışman hocam Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e,

Sorduğum her soruya ilgiyle cevap veren, bu çalışmada desteklerini esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan ortak danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI'ya,

İhtiyacım olduğunda desteklerini esirgemeyen, değerli bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN'a ve lisansüstü eğitimimde benimle değerli bilgilerini paylaşan tüm Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği A.B.D. hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, her kararımda arkamda duran ve beni destekleyen canım annem Güner ERK'e, babam Mehmet ERK'e, kardeşim Ahmet ERK'e teşekkür ederim.

Deneylerimde ve laboratuvarıda geçirdiğim süreçlerde yanımda olan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen Rabia Rana DERLİOĞLU'na, teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemimde hep yanımda olan, benden desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen, hayatım boyunca destek olacaklarını bildiğim arkadaşlarım Zafer KAÇAR'a, Sane ARICIOĞLU'na, Mert Can DUYAR'a, Öykü KABAR'a ve İlker GÜRGİT'e teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımda her zaman desteğini hissettiğim, bir süre önce kaybettiğim biricik amcam Levent Cengiz ERK'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından "2021-7-24-101" numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Beyzanur ERK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
SİMGELER	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Triple Negatif Meme Kanseri	3
2.1.1. TNMK'nın epidemiyoloji	3
2.1.2. TNMK'nın insidansı	3
2.1.3. TNMK'nın klinik özellikleri	5
2.1.4. TNMK'nın tedavisi	6
2.2. Fotodinamik Tedavi	8
2.2.1. FDT'nin bileşenleri	8
2.2.1.1. Fotoduyarlı maddeler	9
2.2.1.2. Işık	15
2.2.1.3. Oksijen	23
2.2.2. FDT etki mekanizması	24
2.2.3. FDT'de singlet oksijen oluşumu	25
2.2.4. FDT'de dozimetri	26
2.2.5. Kanserde FDT'nin etki mekanizması	28
2.3. FDT ve Kemoterapi Kombin Tedavisi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereç	39
3.1.1. Kullanılan cihazlar	39
3.1.2. Kullanılan kimyasal sarf malzemeleri	39
3.2. Yöntemler	40
3.2.1. Hücre kültürü	40
3.2.2. İlaç uygulamaları	41
3.2.2.1. Sisplatin uygulaması	41
3.2.2.3. Kombin tedavi uygulaması	42
3.2.3. WST-1 analizi ile hücre canlılığının belirlenmesi	42
3.2.4. Anneksin V yöntemi ile apoptozun belirlenmesi	44
3.2.5. Akridin orange (AO) boyaması	45
3.2.6. Mitokondri boyaması	46
3.2.7. DAPI boyaması	46
3.2.8. İstatistiksel analiz	46

4. BULGULAR	49
4.1. MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücrelerindeki İntraselüler PpIX Miktar Tayini	49
4.2. 5-ALA/FDT, Sisplatin ve Kombin Tedavi Uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücrelerinde Neden Olduğu Sitotoksitenin Değerlendirilmesi..	50
4.2.1. 5-ALA/FDT'nin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	50
4.2.2. Sisplatinin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi	50
4.2.3. 5-ALA/FDT ve sisplatin kombin tedavisinin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi	51
4.2.3.1. 5-ALA/FDT ışıması sonrasında sisplatin uygulamasının sitotoksik etkisi	51
4.2.3.2. 5-ALA/FDT ve sisplatin eş zamanlı kombin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	52
4.2.3.3. 5-ALA/FDT ile sisplatin eş zamanlı kombin uygulanmasının MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	54
4.3. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Eş Zamanlı Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Apoptozun Değerlendirilmesi	55
4.4. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Değerlendirilmesi	59
4.5. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Mitokondriyal Değişimlerin Değerlendirilmesi.....	62
4.6. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Nükleer Hasarın Görüntülenmesi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	87

KISALTMALAR

5-ALA	: 5-Aminolevulinik Asit
AO	: Akridin Orange
ATCC	: American Type Culture Collection
CI	: Kombinasyon İndeksi
CO₂	: Karbondioksit
CW	: Sürekli Dalga
DAPI	: 4', 6-diamidino-2-phenylindole
DC	: Doğru Akım
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDT	: Fotodinamik Tedavi
FS	: Işığa Duyarlı Madde
FTIC	: Floresein İzotiyosiyanat
GCO	: Global Cancer Observatory
HER-2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HpD	: Hematoporfirin Türevi
HPPH	: 2-(1-Hexyloxyethyl)-2-Devinyl Pyropheophorbide-a
ICG	: Indosiyenin Yeşili
KTP: YAG	: Potasyum Titanil Fosfat İtiryum Alüminyum Garneti
LED	: Light Emitting Diode
mTOR	: Memeli Hedefi Rapamisin
Nd: YAG	: Neodyum İtiryum Alüminyum Garneti
O₂	: Oksijen
OS	: Genel Sağkalım

PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDT	: Photodynamic Therapy
PpIX	: Protoporfirin IX
PR	: Progesteron Reseptörü
R6G	: Rodamin 6G
RFS	: Rekürrensiz Sağkalım
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEER	: US Surveillance, Epidemiology, and End Results
SOLD	: Singlet Oksijen Lüminesans Dozimetrisi
Süksinil-CoA	: Süksinil Koenzim A
TNBC	: Triple Negative Breast Cancer
TNMK	: Triple Negatif Meme Kanseri
UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole A
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	: Suda Çözünen Formazan-1

SİMGELER

°C	: Celcius
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetrekare
dk	: Dakika
J	: Joule
KHz	: Kilo Hertz
kJ	: Kilojoule
kW	: Kilowatt
m	: Metre
m ²	: Metrekare
mg	: Miligram
mHz	: Mega Hertz
mJ	: Milijoule
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
mW	: Miliwatt
nm	: Nanometre
ns	: Nanosaniye
rpm	: Rate Per Minute
s	: Saniye
W	: Watt



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. 2018 SEER verilerine göre ABD'deki TNMK vakalarının yaşa bağlı prevalansı.	4
Tablo 2.2. 2018 SEER verilerine göre TNMK tanısı konulan hastaların etnik kökenine göre prevalansı.	4
Tablo 2.3. Kanser FDT'sinde kullanılan FS türleri.	11
Tablo 2.4. Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.	32
Tablo 4.1. Sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisi sonucu elde edilen CI değerleri.	54



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. TNMK tedavi yaklaşımları.	6
Şekil 2.2. FDT'nin bileşenleri: FS, ışık ve oksijen.	9
Şekil 2.3. 5-ALA'nın Hem sentez yolağı ve mekanizması.	15
Şekil 2.4. Işığın dalga boyuna göre cilde yaklaşık penetrasyon derinlikleri.	17
Şekil 2.5. FDT etki mekanizması, Tip I ve Tip II reaksiyonlarının karşılaştırılması.	25
Şekil 2.6. Kanserde FDT ve ölüme neden olduğu mekanizmalar.	29
Şekil 3.1. WST-1 boyasının formazana dönüşümü.	43
Şekil 3.2. 1 mM 5-ALA ile 2.5 ve 5 µM sisplatinin kombin etkisinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin şematize edilmesi.	44
Şekil 3.3. Anneksin V çalışma prensibi.	45
Şekil 3.4. Sisplatin ve 5-ALA/FDT'nin kombin uygulama protokolü (Created in BioRender.com).	47
Şekil 4.1. (A) Eş zamanlı 2.5 µM sisplatin ve 1 mM 5-ALA uygulanan hücrelerde intraselüler PpIX miktarlarının mikroskop görüntüsü (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-10A hücreleri. (B) Hücrelerde intraselüler floresans PpIX miktarının istatistiksel karşılaştırılması (p<0.05*).	49
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücrelerinde 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).	50
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).	51
Şekil 4.4. 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sıralı sisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).	52
Şekil 4.5. Eş zamanlı 5-ALA/FDT ve Sisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.05*, p<0.01**).	53
Şekil 4.6. Eş zamanlı 5-ALA/FDT ve sisplatin uygulanan MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).	55
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücrelerinde sadece sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda apoptoz miktarının değerlendirilmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin monoterapisi, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm ² , D) 9 J/cm ² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm ² ve F) 9 J/cm ² enerji yoğunluğunda ışıma sonrasında canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre oranları.	57
Şekil 4.8. MCF-10A hücrelerinde sadece sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda apoptoz miktarının değerlendirilmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin monoterapisi, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm ² , D) 9 J/cm ² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm ² ve F) 9	

- J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma sonrasında canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre oranları..... 58
- Şekil 4.9.** Sisplatin monoterapisi, 5-ALA/FDT monoterapisi ve eş zamanlı kombin uygulama sonrasında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde toplam apoptotik hücre ölümünün istatistiksel karşılaştırılması (p<0.01**). 59
- Şekil 4.10.** MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 60
- Şekil 4.11.** MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 61
- Şekil 4.12.** MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen mitokondriyel değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 63
- Şekil 4.13.** MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen mitokondriyel değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 64
- Şekil 4.14.** MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen nükleer hasarın görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 66
- Şekil 4.15.** MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen nükleer hasarın görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 µM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 µM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma. 67

TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE FOTODİNAMİK TEDAVİ VE KEMOTERAPİNİN KOMBİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Dünyada en sık görülen kanser türlerinden biri olan meme kanserinin alt tipi olarak triple negatif meme kanseri (TNMK) östrojen ve progesteron reseptörlerinden ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'den yoksun ve tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık % 10-20'sini oluşturmaktadır. TNMK'nın tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yöntemler kullanılmakla birlikte birincil tedavi basamağı kemoterapidir. Ancak, TNMK'nın heterojen ve agresif yapısı, yüksek rekürrens ve metastatik potansiyeli ve mevcut kanser tedavilerine dirençli olması yeni tedavi stratejilerine yönelik çalışmaların dikkat çekmesine neden olmaktadır.

Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlardan biri fotodinamik tedavidir. Fotodinamik tedavinin (FDT) temelinde ışığa duyarlı maddenin spesifik dalga boyundaki ışık ile uyarıldıktan sonra oksijen ile etkileşime girmesi sonucunda reaktif oksijen türlerini üretmesi ve fotokimyasal olayların indüklenmesi sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) kanser hücrelerinde apoptotik, nekrotik veya otofajik ölümüne neden olması yer almaktadır. FDT'nin temelinde fotosensitizer (FS), ışık ve oksijen olmak üzere üç bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenler tek başına etkin olmamasına rağmen, bir araya geldiklerinde kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermekte ve bu sayede hedef dokuya özgü daha yüksek seçicilik sağlamaktadır. Bu üç önemli unsurdan ilki olan FS, etkili FDT için ışık enerjisini soğuran ROS oluşumunu katalize eden bir fotoaktif moleküldür. FDT'de ışık kaynağı etkinliğinde ise hedef dokuda istenen etkinin sağlanabilmesi için doğru ışık dozu, yeterli FS konsantrasyonu ve oksijene ihtiyaç bulunmaktadır. Bu kapsamda, FDT uygulamalarında farklı lazer veya lazer olmayan ışık kaynağı kullanılmaktadır. FDT'de en önemli son parametre ise oksijendir. FDT'de ROS üretiminde oksijenin dokulardaki konsantrasyonu önemli rol aldığı için FDT'nin terapötik etkinliği hedef dokularda bulunan moleküler oksijen konsantrasyonuna bağlıdır.

5-aminolevülinik asit (5-ALA) protoporfirin IX (PpIX)'un öncüsü olarak FDT uygulamalarında kullanılan bir FS'dir. 5-ALA PpIX'e dönüştüğünde aktif bir FS haline gelmektedir. Tek başına FS olmayan 5-ALA Hem biyosentetik yolağıyla hızla Hem'in başka bir öncüsü olan PpIX'e metabolize olarak aktif bir FS haline gelmekte ve 635 nm dalga boylarındaki ışık ile uyarıldığı zaman ROS miktarındaki artışa bağlı olarak hücrelerin mitokondrilerine hasar vermektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda 5-ALA temelli FDT'nin hücrelerde intraselüler PpIX birikimine neden olduğu, buna bağlı olarak artan ROS üretimi ile farklı kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Ancak, 5-ALA başta olmak üzere FS'lerin tek başına yeterli düzeyde etkin olmaması, ışığın hedef dokuya penetrasyonu, FS seçiciliğinden kaynaklı sorunlar ve oksijen hipoksisi gibi kısıtlamalar FDT'nin etkinliğini sınırlamaktadır. Bu çerçevede FDT ile diğer tedavi yöntemlerinin kombin uygulanmasına yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu kapsamda, literatürde oral hücreli skuamöz karsinom, meme kanseri, melanom ve akciğer kanseri hücrelerinde 5-ALA temelli

FDT ile dosetaksel, sisplatin, fluorourasil ve gefitinib kemoterapi ajanlarının kombin uygulamasının tek başına uygulamalara göre daha etkin olduğu belirlenmiştir. Ancak, TNMK hücrelerinde 5-ALA/FDT ile kemoterapi ajanlarının kombin etkisine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan güçlü bir kemoterapötik ajan olarak sisplatin hücrenin DNA'sında eklentiler oluşturmakta ve böylece DNA replikasyonunu ve zincir uzamasını engelleyerek antineoplastik aktivite göstermektedir. Buna rağmen, sisplatinin neden olduğu yan etkiler ve zamanla sisplatine karşı gelişen direnç sisplatinin tedavide etkin kullanımını kısıtlamaktadır.

Bu çerçevede tez çalışmasında sisplatinin neden olduğu yan etkilerini azaltmak ve 5-ALA temelli FDT uygulamalarında sınırlamaların üstesinden gelmek için ilk kez TNMK ve sağlıklı meme hücrelerinde sisplatin temelli kemoterapi ile 5-ALA/FDT'nin kombin tedavisinin *in vitro* etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisinin MDA-MB-231 TNMK hücreleri ve MCF-10A sağlıklı meme epitel hücrelerinde etkisini incelemek için tek başına sisplatin ve 5-ALA/FDT ile karşılaştırmalı olarak eş zamanlı ve sıralı olmak üzere iki farklı sisplatin ve 5-ALA/FDT kombin tedavi seçeneklerinin anti-kanser etkisi belirlenmiştir. Bu kapsamda tek başına 1, 2.5 ve 5 μM sisplatin, tek başına 1 mM 5-ALA ile inkübe edilen hücelere 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki 635 nm diyot lazer uygulaması yapıldı ve 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı WST-1 analizi ile belirlendi. Eş zamanlı kombin tedavi uygulamasında hücelere 1 mM 5-ALA ile birlikte 2.5 ve 5 μM sisplatin uygulanarak 4 saat inkübe edildikten sonra 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarında lazer ışıması yapılmıştır. Sıralı kombin tedavide ise 1 mM 5-ALA ile 4 saat inkübe edilen hücreler belirtilen enerji yoğunluklarında lazer ışıması yapıldıktan sonra 2.5 ve 5 μM sisplatin eklendi ve 24 saat sonra sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlendi. Hücrelerde meydana gelen apoptotik ölüm miktarının tayini için Anneksin V analizi gerçekleştirildi. Ayrıca, tek başına sisplatin, 5-ALA/FDT uygulaması ile karşılaştırmalı olarak eş zamanlı 5-ALA/FDT ve sisplatin kombin uygulamasının hücre morfolojisinin yanı sıra mitokondri ve nükleusta neden olduğu hasarın görüntülenmesi için akridin oranj, Mitotracker ve DAPI boyaması yapıldı.

Elde edilen WST-1 bulgularına göre, MDA-MB-231 hücrelerinde tek başına 2.5 μM sisplatin (% 73.96) ve 5-ALA/FDT'ye kıyasla (6 J/cm^2 : % 75.97 ve 9 J/cm^2 : % 59.55) 5-ALA/FDT ve sisplatin eş zamanlı kombin uygulamasının (1.5 J/cm^2 : % 121.89, 3 J/cm^2 : % 113.34, 6 J/cm^2 : % 55.77, 9 J/cm^2 : % 43.83, 12 J/cm^2 : % 58.02) daha etkin olduğu belirlendi. Ayrıca sıralı kombin tedavi uygulaması ile karşılaştırıldığında (1.5 J/cm^2 : % 128.05, 3 J/cm^2 : % 128.12, 6 J/cm^2 : % 90.99, 9 J/cm^2 : % 77.80, 12 J/cm^2 : % 76.51) eş zamanlı kombin tedavinin hücrelerde daha fazla anti-proliferatif etkiye sahip olduğu analiz edildi ($p < 0.05^*$). Diğer yandan, eş zamanlı 5 μM sisplatin ve 5-ALA/FDT uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 2.5 μM sisplatin ve 5-ALA/FDT'ye göre antagonistik etki göstererek hücre canlılığında özellikle 6 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluklarında daha az etkin olduğu tespit edildi (6 J/cm^2 : % 72.9 ve 9 J/cm^2 : % 65.50). Diğer yandan, MCF-10A hücrelerinde sisplatin ve 5-ALA/FDT kombin uygulamasının (6 J/cm^2 : % 48.10 ve 9 J/cm^2 : % 47.25) tek başına 5-ALA/FDT'ye (6 J/cm^2 : % 40.54 ve 9 J/cm^2 : % 42.22) göre daha az toksik etkisi olduğu analiz edildi. Anneksin V analizi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücrelerindeki toplam apoptotik ölüm yüzdesi tek başına 2.5 μM sisplatin (% 37.88) ve 5-ALA/FDT'ye (6 J/cm^2 : % 31.48 ve 9 J/cm^2 : % 37.78) kıyasla eş zamanlı kombin

tedavide (6 J/cm²: % 46.78 ve 9 J/cm²: % 53.6) anlamlı olarak arttığı analiz edildi (p<0.01**). Ayrıca, sisplatin ve 5-ALA/FDT eş zamanlı kombin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla apoptotik ölüme, nükleer ve mitokondriyal hasara neden olduğu tespit edildi.

Bu çalışma ile sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisinin TNMK hücrelerinde anti-kanser etkisi ilk defa araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, eş zamanlı 2.5 µM sisplatin ile 1 mM 5-ALA uygulaması sonrasında 6 J/cm² ve 9 J/cm² enerji yoğunluklarındaki lazer ışınması yapılan TNMK hücrelerinde tek başına 5-ALA/FDT ve sisplatin uygulamasına göre daha etkin olduğu ve sinerjistik etki gösterdiği (kombinasyon indeksi<1) belirlenmiştir. Ancak, sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin kombin etkisinin TNMK hücrelerinde etkisinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.





DETERMINATION THE EFFECT OF THE COMBINATION TREATMENT OF PHOTODYNAMIC THERAPY AND CHEMOTHERAPY ON TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

SUMMARY

Triple-negative breast cancer (TNBC) which is one of the subtypes of breast cancer that is one of the most common cancer types in the world, is lack of estrogen and progesterone receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and constitutes approximately 10-20 % of all breast cancer cases. Although different methods such as surgery, radiotherapy, and immunotherapy can be used, the primary treatment option is chemotherapy for the treatment of TNBC. However, the heterogeneous and aggressive nature of TNBC, its high recurrence and metastatic potential, and its resistance to existing cancer treatments should be paid attention to studies on new treatment strategies.

One of the current approaches in cancer treatment is photodynamic therapy. Photodynamic therapy (PDT) is based on the production of reactive oxygen species (ROS) as a result of the interaction between molecular oxygen in cells and a photosensitizer (PS) substance that is stimulated by light in a specific wavelength. ROS are formed as a result of the induction of photochemical events also cause apoptotic, necrotic, or autophagic death in cancer cells. There are three components of PDT: photosensitizer (PS), light and oxygen. These components are harmless on their own, but when they are combined, they exhibit cytotoxic effects on cancer cells and thus, providing higher selectivity in the target tissue. The first of these three important elements, PS, is a photoactive molecule that catalyzes the formation of ROS, which absorbs light energy for effective PDT. In the light source activity in PDT, the right light dose, sufficient PS concentration and oxygen are needed to achieve the desired effect in the target tissue. Within this framework, different laser or non-laser light sources are used in PDT applications. The most important last parameter in PDT is oxygen. Since the concentration of oxygen in the tissues plays an important role in the production of ROS in PDT, the therapeutic effectiveness of PDT depends on the molecular oxygen concentration in the target tissues.

5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a PS used in PDT applications as a precursor to protoporphyrin IX (PpIX). When 5-ALA is converted to protoporphyrin, it becomes an active PS. 5-ALA is not PS alone, but it becomes an active PS by rapidly metabolizing another Hem precursor, PpIX, with the Hem biosynthetic pathway. Then, 5-ALA is excited by light at 635 nm wavelengths, and damages the mitochondria of the cells due to the increase in the amount of ROS. In previous studies, it has been determined that 5-ALA-based PDT causes intracellular PpIX accumulation in cells, and increased ROS production leads to its cytotoxicity in different cancer cells. However, limitations such as the ineffectiveness of PS, especially 5-ALA alone, the penetration of light into the target tissue, problems of PS selectivity, and oxygen hypoxia restrict the effectiveness of PDT. In this context, studies on the combination of PDT and other treatment methods has drawn attention. In this context, it has been

determined in the literature that the combined applications of 5-ALA-based PDT and docetaxel, cisplatin, fluorouracil, and gefitinib chemotherapy agents are more effective than the monotherapies in oral cell squamous carcinoma, breast cancer, melanoma, and lung cancer cells. However, there is no study evaluating the combined effect of 5-ALA/PDT and chemotherapy agents in TNBC cells.

Cisplatin as a potent chemotherapeutic agent used in the treatment of various types of cancer forms inserts in the DNA of the cell. Thus, it shows antineoplastic activity by inhibiting DNA replication and chain elongation. However, the side effects caused by cisplatin and acquired resistance limit the effective use of cisplatin in treatment.

From this viewpoint, it was aimed to determine the effect of cisplatin-based chemotherapy and 5-ALA/PDT combination treatment in vitro in TNBC and healthy breast cells for the first time to reduce the side effects caused by cisplatin and overcome the limitations in 5-ALA-based PDT applications.

To determine the effect of the combined treatment of cisplatin and 5-ALA/PDT in MDA-MB-231 TNBC cells and MCF-10A healthy breast epithelial cells, the anti-cancer effects of two different cisplatin and 5-ALA/PDT combined treatment options, simultaneously and sequentially, were compared with cisplatin alone and 5-ALA/PDT were determined. In this context, the cells treated with 1, 2.5 and 5 μM cisplatin alone or 1 mM 5-ALA and irradiated with 635 nm diode laser at energy densities of 1.5, 3, 6, 9 and 12 J/cm^2 and the cell viability was determined by WST-1 analysis after 24 h incubation. In the simultaneous combined treatment application, 2.5 and 5 μM cisplatin was applied to the cells with 1 mM 5-ALA and after incubation for 4 hours, laser irradiation was performed at energy densities of 1.5, 3, 6, 9 and 12 J/cm^2 . In the sequential combination treatment, the cytotoxic effect of cells incubated with 1 mM 5-ALA for 4 hours and after laser irradiation at the indicated energy intensities, the cells were incubated with 2.5 and 5 μM cisplatin and the cell viability was determined for 24 hours. In this study, the cytotoxicity was determined by WST-1 analysis, and the total amount of apoptotic cell death was determined by Annexin V analysis. Additionally, acridine orange, MitoTracker, and DAPI staining were performed to observe the damage in the cell morphology, mitochondria and nucleus caused by cisplatin and 5-ALA/PDT alone and their combination treatment.

After the application of 2.5 μM cisplatin and 1 mM 5-ALA to MDA-MB-231 and MCF-10A cells, they were visualized with a red filter, and it was observed that the amount of intracellular PpIX associated with ROS production increased.

According to the WST-1 results, it was determined that the simultaneous application of 5-ALA/PDT and cisplatin (1.5 J/cm^2 : 121.89 %, 3 J/cm^2 : 113.34 %, 6 J/cm^2 : 55.77 %, 9 J/cm^2 : 43.83 %, 12 J/cm^2 : 58.02 %) was more effective in MDA-MB-231 cells compared to 2.5 μM cisplatin (73.96 %) and 5-ALA/PDT (6 J/cm^2 : 75.97 % and 9 J/cm^2 : 59.55 %) monotherapies. Besides, it was analyzed that the simultaneous combination therapy had more anti-proliferative effect on cells compared to the sequential combination therapy (1.5 J/cm^2 : 128.05 %, 3 J/cm^2 : 128.12 %, 6 J/cm^2 : 90.99 %, 9 J/cm^2 : 77.80 %, 12 J/cm^2 : 76.51 %) ($p < 0.05^*$). On the other hand, when MDA-MB-231 cells treated with 5 μM cisplatin and 5-ALA/PDT simultaneously, it showed an antagonistic effect compared to 2.5 μM cisplatin and 5-ALA/PDT combination, and was less effective on cell viability, especially at energy densities of 6 and 9 J/cm^2 (6 J/cm^2 : 72.9 % and 9 J/cm^2 : 65.50 %). On the other hand, combined administration of cisplatin and 5-ALA/PDT (6 J/cm^2 : 48.10 % and 9 J/cm^2 : 47.25 %)

compared to 5-ALA/PDT alone (6 J/cm²: 40.54 % and 9 J/cm²: 42.22 %) induced less toxic effects in MCF-10A cells.

According to the results of the annexin V analysis, the percentage of total apoptotic death significantly increased in the simultaneous combined treatment (6 J/cm²: 46.78 % and 9 J/cm²: 53.6 %) compared with 2.5 μ M cisplatin (37.88 %) and 5-ALA/PDT alone (6 J/cm²: 31.48 % and, 9 J/cm²: 37.78 %) in MDA-MB-231 cells ($p < 0.01^{**}$). In addition, it was determined that the simultaneous combination treatment of cisplatin and 5-ALA/PDT caused more apoptotic death and nuclear and mitochondrial damage in MDA-MB-231 cells. Differently from this, less apoptotic death and nuclear and mitochondrial damage were observed in MCF-10A cells treated with combination therapy compared to MCF-10A cells treated with cisplatin or 5-ALA/PDT monotherapies.

In this study, the anti-cancer effects of cisplatin and 5-ALA/PDT combination treatment on TNBC cells were investigated for the first time. The findings showed that the simultaneous application of 2.5 μ M cisplatin and 1 mM 5-ALA irradiated by 6 J/cm² and 9 J/cm² energy densities is more effective than 5-ALA/PDT and cisplatin alone and the simultaneous combination therapy exerts synergistic effects (Combination index < 1). However, further studies are needed to elucidate the combined effect of cisplatin and 5-ALA/PDT on TNBC cells at the molecular level. On the other hand, 5-ALA/PDT combination treatment with cisplatin exerts toxicity in MCF-10A normal cell line. Therefore, nanoparticulate drug delivery systems could be used for reducing the toxic effect of 5-ALA with cisplatin combination on MCF-10A cells and increasing the selectivity in the target tissue. Additionally, further studies can be carried out with advanced molecular analysis to optimize the PDT application protocol and to detect each FS in cancer cells after irradiation. Finally, the combined effects of different types of PS and cisplatin in different cancer types will be further analyzed.



1. GİRİŞ

Dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri en çok ölüm gözlenen ikinci kanser tipidir. Meme kanserinin moleküler alt tiplerinden biri olarak triple negatif meme kanseri (TNMK) tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık % 10-20'sini oluşturmaktadır [1,2].

TNMK hastaları diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif özelliklere ve kötü prognoza neden olduğu için TNMK hastalarına özgü etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Genel olarak meme kanseri tedavisinde kullanılan sitotoksik ajanlar sıklıkla çeşitli yan etkilere neden olmaktadır ve sitotoksik ajanların kısa dönem etkileri TNMK'da diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha yüksektir. Hedefe yönelik tedaviler ise spesifik bir moleküle etki etmesine rağmen, TNMK'da östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) ekspresyonlarının negatif olması, spesifik hormon tedavileri ve hedefe yönelik tedavileri etkisinin sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle TNMK tedavisi için daha hedefli ve normal hücrelerde daha az yan etkiyi sağlayabilecek yenilikçi tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır [2-4].

Fotodinamik tedavi (FDT), ışığa duyarlı ve ışığa duyarlı bir madde (FS) ile belirli bir dalga boyundaki ışığın etkileşimi sonucu bazı onkolojik olmayan hastalıkların yanı sıra spesifik bazı kanser tiplerinin tedavisinde kullanılan invaziv olmayan modern bir tedavi yöntemidir. FDT'nin gösterdiği iyi terapötik sonuçlar ve diğer tedavi seçenekleri ile uygulanabilme olasılığı farklı tıbbi alanlarda kullanımına yol açmıştır [5-7]. Diğer yandan FDT kullanılan FS'nin çözünürlüğü, hedef dokuda penetrasyonu ve yeterli oksijen konsantrasyonunun elde edilememesi gibi özellikleri de kanser tedavisinde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda FDT ile kemoterapi ajanlarının kombin etkisinin belirlenmesine yönelik araştırmaları hız kazanmıştır. Kanser tedavisinde FDT ile kemoterapinin kombin tedavisi ile kemoterapinin normal hücrelerde neden olduğu yan etkilerin azaltılmasının yanı sıra FDT'nin ışık penetrasyonunda ve kullanılan FS'lerin stabilitesindeki sorunların önüne geçilebilir [6].

Bu kapsamda, mevcut tez çalışmasında ilk kez sisplatin ile 5-aminolevulinik asit (5-ALA) temelli FDT'nin TNMK ve sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve morfolojik etkilerini belirlenmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Triple Negatif Meme Kanseri (TNMK)

Triple negatif meme kanseri (TNMK) ER, PR ve HER2 proteininin ekspresyonunun negatif olduğu meme kanseri alt tipi olarak tanımlanmaktadır [1,3]. TNMK, diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla özgün moleküler profili, uzak metastaz, agresif davranış, hedefe yönelik tedavi yoksunluğu, kısa genel sağkalım (OS) ve rekürrensiz sağkalım (RFS) ile karakterizedir [3,4].

2.1.1. TNMK'nın epidemiyoloji

Günümüzde tıbbi gelişmelere rağmen, kan ve kalp hastalıkları ölüme neden olan birincil hastalıklar olarak kabul edilse de kanser halen önemli bir sağlık sorunudur [8]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın verilerine göre 2020 yılında dünya üzerinde 2.3 milyon kişiye meme kanseri teşhisi konulmuştur [2]. Bu vakaların yaklaşık % 10-20'sini ise TNMK hastaları oluşturmaktadır. 2010 yılında US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) programına göre, 57483 kanser tanısı konulan kişilerden 6193 TNMK kişiye konulmuştur. Bu kapsamda, tüm vakaların yaklaşık % 12.5'inin TNMK hastası olduğu görülmektedir [9]. Ayrıca, TNMK insidansı yaşa, etnik kökene, sosyoekonomik statüye ve sağkalım oranlarına göre değişim göstermektedir [10].

2.1.2. TNMK'nın insidansı

Yapılan çoğu çalışmada TNMK ve diğer meme kanserleri arasında yaş, etnik, sosyoekonomik durum, hastalık evresi, tümör büyüklüğü ve hayatta kalma oranı ile ilgili farklılıklar araştırılmıştır. Diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında, TNMK hastalarında yaş aralığı daha düşüktür. TNMK hastalarında ortalama yaş 54 olarak belirtilmesine rağmen, diğer meme kanseri alt tiplerinde yaş ortalaması 60 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadaki incelemeler sonucu TNMK teşhisi alan kadınların % 63'ü 60 yaş altındayken, diğer meme kanserlerinde kişi sayısının yarısından fazlası bu yaş aralığında belirlenmiştir. Ayrıca, TNMK tanısı alan hastaların 65 yaş üstü olma olasılığı % 10-30 olarak belirtilmektedir [11]. 2018 SEER prevalans verileri incelendiğinde ise, ABD'de 150979 kadına TNMK tanısı konulduğu

ve 76050 hastanın 40-64 yaş aralığında olduğu belirlenmiştir (Tablo 2.1) [12]. 2019 yılına ait bir çalışmada çalışma da ise TNMK ile diğer meme kanseri alt tipleri kıyaslanmış ve ortalama tanı yaşının TNMK hastalarında (59.3) diğer alt tiplere göre (62.1) daha düşük olduğu tespit edilmiştir [13].

Tablo 2.1. 2018 SEER verilerine göre ABD'deki TNMK vakalarının yaşa bağlı prevalansı [12].

Prevalans Yaşı	Kanser Hastası Kişi Sayısı
Tüm Yaşlar	150979
<50 Yaşlar	26825
40-64 Yaşlar	76050
75+ Yaşlar	28436

TNMK'nın bir diğer klinik özelliği etnik kökendir. Birçok çalışmada yaş ve ırk ile TNMK arasında önemli bir etkileşim olduğu belirlenmiştir. 2010 yılında yürütölmüş olan bir çalışmada aynı yaş grubunda meme kanseri tanısı alan hastalar içerisinde Afroamerikalı olmayan kadınlarda TNMK insidansının Afroamerikalı hastalara göre % 15 daha az olduğu ve Afroamerikalı kadınlarda beyaz ırkta kadınlara göre neredeyse 3 kat fazla TNMK vakası olduğu tespit edilmiştir [14]. Başka bir araştırmada etnik köken ile TNMK ilişkisini incelemek için 6370 TNMK ve 44704 diğer meme kanseri alt türleri tanısı konulmuş hasta araştırılmaya dahil edilmiştir. TNMK hastalarının çoğu hispanik veya hispanik olmayan siyahiler olarak belirlenmiştir [11]. 2018 SEER verilerine göre ABD'de TNMK tanısı konulan 150979 kadından 113585 tanesinin hispanik olduğu görölmektedir (Tablo 2.2) [12].

2017 yılında Yeh vd. tarafından yapılan çalışmada TNMK tanısı konulan hastaların % 18'i Afroamerikalı iken, % 13'ü Asyalı kadın olarak belirlenmiştir [4]. Ayrıca, Global Cancer Observatory (GCO) tarafından 2018 yılında sunulan rapora göre, Avrupa ve Kuzey Amerika'da daha yüksek tanı oranı olsa da TNMK hastalarında ölüm oranının daha düşük olduğu ve bu nedenle Afrikalı TNMK hastalarında tümörün daha agresif bir fenotipe sahip olduğu belirtilmiştir [15].

Tablo 2.2. 2018 SEER verilerine göre TNMK tanısı konulan hastaların etnik kökenine göre prevalansı [12].

İrk/Etnik Köken	Kanser Hastası Kişi Sayısı
Tüm Irklar (Hispanik dahil)	150979
Hispanik olmayan beyazlar	102185
Beyazlar (Hispanik dahil)	113585

TNMK'nın bir diğer klinik özellik sosyoekonomik statüdür. Sosyoekonomik açıdan statü arttıkça kanser prevalansı artmasına rağmen, TNMK insidansı diğer kanser türlerine göre düşük statülerde daha yaygın görülmektedir. Düşük sosyoekonomik durum, ileri klinik evre ve ER-negatif meme tümörleri ile ilişkilendirilmektedir. 2007 yılında yürütülmüş olan bir çalışmada düşük sosyoekonomik statüye sahip bölgelerdeki kadınlarda, yüksek sosyoekonomik statüye sahip bölgelerde yaşayan kadınlara göre TNMK teşhisi konma olasılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sosyoekonomik durumu düşük olan hastalarda TNMK tanısı konma olasılığının diğer hastalara göre 1.14 kat daha yüksek olduğu belirtilmektedir [10].

2.1.3. TNMK'nın klinik özellikleri

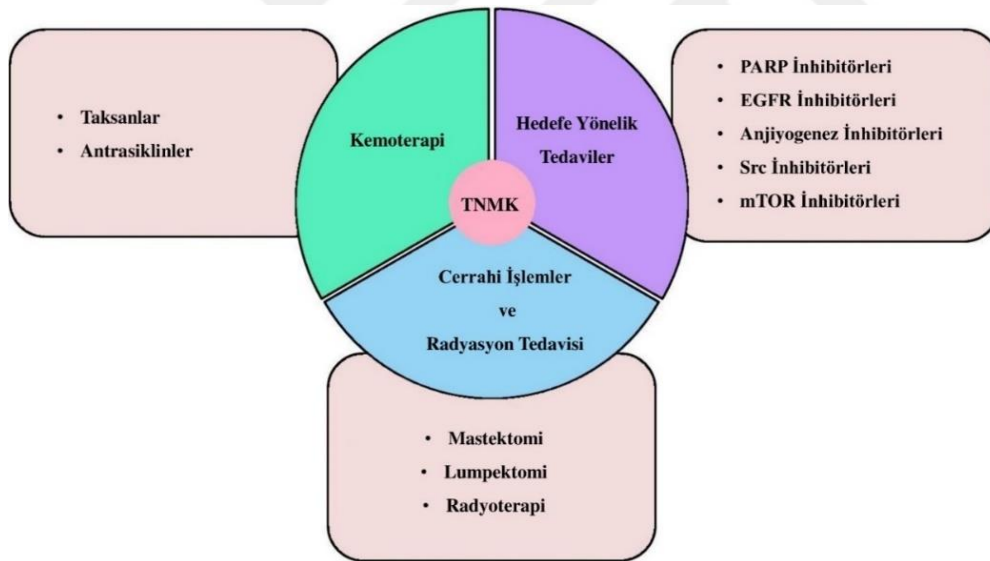
TNMK tümörleri genellikle daha ileri evre, daha büyük tümör boyutu ve lenf nodülü pozitifliği gibi agresif özellikler sergilemektedir [16]. Primer TNMK tümörleri daha büyük boyuta sahip olup daha ileri evrededir ve hızlı büyümektedir [9]. TNMK hastalarına daha geç evrede tanı konulmaktadır ve TNMK tümörleri çoğunlukla III. evre tümörlerdir [17]. Dent ve vd.'nin çalışmalarında TNMK hastalarının çoğunluğunun evre III (% 66) olduğu ve III. evreye daha yatkın olduğu belirtilmiştir. Ayrıca TNMK hastalarında sadece % 36.5'inde tümör boyutu <2 cm iken, diğer meme kanseri alt tiplerinin % 62.7'si <2 cm bulunmuştur [18].

Bununla birlikte, TNMK ile emzirme süresi arasında negatif ilişki varken yüksek doğum sayısı ile pozitif anlamda ilişki bulunmaktadır. Bazı çalışmalar sonucunda menarş ve gebelik süresi daha genç olan kadınlarda TNMK görülme olasılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TNMK'nin bir diğer önemli klinik özelliği de metastazdır. TNMK hastalarının yaklaşık % 46'sında uzak metastaz görülmektedir ve bu metastaz daha çok beyin ve hayati organlarda meydana gelmektedir. TNMK tanısı konulan hastalarda metastaz meydana gelme riski TNMK olmayan hastalara kıyasla

daha yüksektir (% 33.9 - % 20.4). Ortalama uzak metastaz süresi TNMK için 2.6 yıl iken diğer meme kanseri gruplarında bu süre 5 yıldır. Ayrıca, TNMK hastalarında metastaz sonrası sağkalım yaklaşık olarak 13.3 aydır [2,18,19].

2.1.4. TNMK'nın tedavisi

TNMK tümörleri diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif özelliklerle (yüksek rekürrens, uzak metastaz, daha yüksek ölüm oranı vb.) karakterize edilmesinden dolayı TNMK hastalarının tedavisinde kemoterapi temel tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir. Kemoterapiye ek olarak, TNMK için ameliyat, radyoterapi, immünterapi gibi tedavi seçenekleri de bulunmaktadır (Şekil 2.1) [19]. Buna rağmen, yüksek rekürrens ve metastaz riskine sahip olması ve kötü prognoz sergilemesi nedeniyle TNMK için henüz spesifik bir tedavi rejimi bulunmamaktadır. Ayrıca TNMK tümörlerinde ER, PR ve HER2 ekspresyonlarının negatif olmasına bağlı olarak spesifik hormon tedavileri ile hedefe yönelik tedavilerin başarısı sınırlı kalsa da hedefe yönelik tedavi seçenekleri için araştırmalar devam etmektedir [20,21].



Şekil 2.1. TNMK tedavi yaklaşımları [22].

TNMK'nın lokal tedavisi, meme tümör kitlesinin mastektomi veya lumpektomi ile cerrahi olarak çıkarılmasıdır ve hastaların genel sağ kalım süresinin arttırılmasına, meme kanserine bağlı ölümleri azaltılmasına katkı sağlamaktadır. Ancak, cerrahi müdahale sonrası rekürrens riski yüksektir ve çok az randomize kontrollü veri bulunmaktadır [23,24].

TNMK tedavisinde radyoterapi genellikle cerrahi müdahale sonrasında kullanılmasına rağmen, göğüs ağrısı, enfeksiyon, meme yağ dokusuna zarar verme ve kaburgalarda zayıflığa yol açabilme gibi dezavantajların yanı sıra radyoterapiye karşı direnç gelişme olasılığı nedeniyle etkisi sınırlıdır [24-26].

Kemoterapi ise günümüzde TNMK tedavisinde temel tedavi yaklaşımıdır [27]. TNMK tedavisinde özellikle antrasiklin ve taksan temelli kemoterapi kullanılmaktadır [19]. Buna ek olarak, TNMK tümörlerinin tedavisinde sisplatin ve karboplatin gibi platin temelli ajanlarda kullanılmaktadır. Ancak TNMK'nın heterojen yapısı hastalarda kemoterapi yanıtının düşük olmasına ve ilaç direnci gelişmesine neden olduğundan dolayı 3 yıl içinde rekürrens ve metastaz riskini arttırmaktadır [26,28]. Bu nedenle, TNMK'nın tedavisi için yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [26]. Bu kapsamda birçok preklinik ve klinik çalışmada spesifik hedefe yönelik tedavi stratejilerine odaklanılmaktadır. Hedefli tedavi seçenekleri arasında anjiyogenez inhibitörleri, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörleri, memeli hedefi rapamisin (mTOR) inhibitörleri, Src onkogen yolağı ve androjen reseptörü inhibitörleri yer almaktadır [23,29].

Sonuç olarak, kemoterapi ve cerrahi yöntemler TNMK tedavisinde birincil basamak tedavi olarak kabul edilmekle birlikte hedefe yönelik tedavi araştırmaları devam etmektedir. Buna rağmen, hedefe yönelik tedavilerin yoksunluğu veya yetersiz kalması, kemoterapinin neden olduğu ciddi yan etkiler ve gelişen ilaç direncinden dolayı TNMK tedavisine yönelik yenilikçi tedavi araştırmaları dikkat çekmektedir [30].

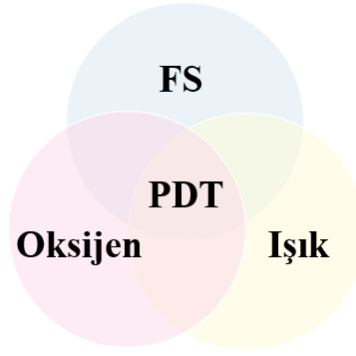
2.2. Fotodinamik Tedavi (FDT)

Fotodinamik tedavi (FDT), hedef dokuda spesifik bir şekilde hücre ölümüne yol açarak çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olan, nispeten düşük yan etkiye sahip modern ve invaziv olmayan terapötik bir tedavi yöntemidir [5,31]. FDT'nin klinikte ilk kullanımı 1903 yılında von Tappeiner ve Jesionek tarafından bazal hücreli karsinomlara ısıtma öncesi eozin uygulanmasıdır. Daha sonra von Tappeiner ve Jodlbauer tarafından FDT ışık, ışığa duyarlı bir ajan ve doku yıkımına neden olan oksijen arasındaki etkileşim olarak tanımlanmıştır [32]. Kısacası, FDT belirli bir dalga boyundaki ışıkla uyarılıp oksijenle reaksiyona giren ve hedef dokularda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak hücrenin ölümüne yol açan fotoduyarlı maddelerin etkisine dayanmaktadır [6].

FDT'nin her bir bileşeni tek başına zararsızdır ancak bileşenler bir araya geldiğinde hücrelerde sitotoksik etki göstermektedir ve bu nedenle hedef dokuda daha fazla seçicilik sağlamaktadır [33]. Fotoduyarlı maddeler (FS), kendilerine uygun dalga boyundaki ışığı soğurarak hedeflenen hücrelerin seçici olarak yok edilmesine yol açan bir aktivasyon başlatmaktadır ve hedef hücrede ROS üretimine neden olmaktadır [5,31]. FDT'nin etki mekanizmasının temelinde hücredeki nükleik asitler, lipidler ve proteinler dahil olmak üzere farklı biyomoleküllerin oksidasyonu, hücre sinyal kaskadlarında veya gen ekspresyon düzenlenmesindeki önemli değişiklikler yer almaktadır [6]. Ayrıca, FDT sistemik bir tedavi değildir çünkü sadece ışığın uygulandığı yerde etkin olmaktadır. Bu nedenle, kanser hastalarında sistemik tedavi yerine lokal tedavi gerçekleştirildiğinden daha az yan etkiye yol açmakta ve uygulaması ağrısız ve basit olduğu için ayakta uygulanması kolaydır. Bu kapsamda, FDT diğer tedavi yöntemleriyle eş zamanlı olarak kolayca uygulanabildiği için çeşitli tıbbi alanlarda örneğin dermatoloji, jinekoloji, üroloji ve onkoloji vb. kullanımı dikkat çekmektedir [5,34,35].

2.2.1. FDT'nin bileşenleri

FDT'nin etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için bileşenlerinin tanımlanması gerekmektedir. FDT'nin 3 ana bileşeni vardır; FS, ışık ve oksijen (Şekil 2.2) [36]. FDT'de temel olarak FS ajanının ışık ile aktifleşmesi sonucunda aktifleşen FS oksijen varlığında fotokimyasal reaksiyona neden olabilir. Böylece, hedef dokuda etki meydana gelmektedir [37].



Şekil 2.2. FDT'nin bileşenleri: FS, ışık ve oksijen [36].

2.2.1.1. Fotoduyarlı maddeler (FS)

FDT'nin en önemli unsurlarından biri fotoduyarlı maddelerdir. FS; belirli dalga boyuna sahip ışığı absorbe edebilen ve bunun sonucunda fotokimyasal veya fotofiziksel reaksiyonları tetikleyebilen maddelerdir [6]. FS, ışık enerjisini ısı enerjisi ve kimyasal enerji gibi diğer enerji çeşitlerine dönüştürmektedir. Bu süreçte aktif haldeki FS veya neden olduğu enerji salınımı ile ortamdaki maddeler arasında meydana gelen etkileşim sonucunda hem ışık hem de FS'nin ulaşabileceği alanlarda sitotoksik etki sergilemektedir. FDT için FS olarak kullanılabilen doğal ve sentetik birçok madde bulunmaktadır. Kullanılacak olan FS'nin temel özelliği, hedef dokuda seçici birikme ve daha sonra hedeflenen biyolojik etkiyi indüklemek için sitotoksik etki sergileme yeteneğidir [31,35].

Bir boyayı FS olarak kullanma fikri Profesör H. Tappeiner'in öğrencisi Oscar Raab'ın akrinin boyalarla yürüttüğü bir deney esnasında boyalara maruz kalması sonucunda ısıtılmış protozoalarda floresan meydana geldiğini fark etmesi ile ortaya çıkmıştır. Bunun akabinde protozoada oksijen tüketiminin ve ölüme yol açan toksik etkinin meydana geldiğini belirlemiştir. Raab bu gözlemlerini, daha önce bu fenomeni fotodinamik etki olarak açıklayan Profesör Tappeiner'e sunduktan kısa bir süre sonra bu uygulama eozin boyası kullanılarak cilt kanseri tedavisi için denenmesine rağmen bu tedavi geniş bir kitleye ulaşamamıştır [5,34].

FDT'de kullanılan FS'ler tarihsel ve kavramsal yaklaşımlara göre birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon olarak sınıflandırılmaktadır. En yaygın kullanılan FS tipi olan photofrin gibi hematoporfirin türevleri 1. jenerasyon FS'lerdir [35]. 1970'lerde Dr. Thomas Dougherty vd. yürüttükleri çalışmada "Hematoporfirin türevi" (HpD) olarak adlandırılan, suda çözünür bir porfirin karışımını test ederlerken porfirinin saflaştırılması ve kimyasal modifikasyonu sonucu ilk FS, hematoporfirini elde

etmişlerdir ve ticari olarak ilk FS'i tedavi amaçlı tanıtmışlardır [5, 38]. HpD'ye göre hematoporfirin daha iyi doku seçiciliği ve ciltte daha az fotoduyarlılık potansiyeli gösterdiği için HpD'den elde edilen bu porfirin dimerlerin ve oligomerlerin bir karışımı olan 'Photofrin' ticari olarak kullanıma sunulmuştur. Günümüzde porfimer sodyumu olarak da bilinen Photofrin FDT'de geniş uygulamalara sahip olmasına rağmen düşük kimyasal saflık ve nispeten kısa dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermesi nedeniyle zayıf doku penetrasyonuna neden olması, uzun süre uygulanmasıyla ciltte fotoduyarlılığa neden olması ve 630 nm dalga boyunda düşük absorpsiyon sergilemesi gibi sınırlamalara sahiptir. 1. jenerasyon FS'lerin dezavantajları sonucunda yeni bileşiklerin araştırılması ihtiyacını ortaya çıkmış ve böylece 2. jenerasyon FS'ler geliştirilmiştir [5,39].

1980'lerde yeni jenerasyon FS'ler için çalışmalar başlamıştır ve bunun sonucunda 2. jenerasyon FS'ler ortaya çıkmıştır. 2. rejenerasyon FS'lerin üretilmesinde daha yüksek dalga boylarında absorpsiyona sahip, ışık kaynağının daha derine nüfuz etmesine imkan veren FS'lerin üretilmesine odaklanılmıştır [6]. Bu amaçla FS kullanımı için yüzlerce madde önerisi olsa da yalnızca birkaç tanesi klinik olarak kullanılmakta ve antikanser çalışmaları için kullanılan FS'lerin sayısı daha da azdır. Günümüzde kullanılmakta olan 2. jenerasyon FS'ler 5-ALA, verteporfin, kurkumin, metilen mavisi ve ftalosiyaninler gibi sentetik FS'leri ve hematoporfirin türevlerini kapsamaktadır [5, 38]. 2. jenerasyon FS'ler; yüksek kimyasal saflık, daha yüksek singlet oksijen oluşturma, 650-800 nm arasındaki dalga boylarında maksimum absorpsiyon ve buna bağlı olarak dokulara daha iyi nüfuz etme, kanserli dokular için yüksek seçicilik ve vücuttan hızlı atılım gibi avantajlara sahiptir. Bunlara rağmen suda zayıf çözünürlükleri kullanımlarını sınırlamaktadır ve bu önemli bir dezavantajdır [5]. Ayrıca, güneş ışığından kaçınılmazsa hastanın cildinde fotoduyarlılığa yol açarak, özellikle geç evre maligniteleri olan hastalarda dezavantaj oluşturmaktadır [6,35]. Bu bileşiklerin fonksiyonelliklerini korumak ve hedef bölgeye daha doğrudan dağıtımlarını geliştirmek için yeni bileşikler geliştirilmektedir [38].

3. jenerasyon FS'ler ise antikor yönlendirmeli FS ve FS yüklü nano taşıyıcılar gibi stratejileri hedeflemek amacıyla ortaya çıkmıştır. 3. jenerasyon FS'lerin temelinde tümör dokusuna daha yüksek afinite gösteren maddelerin sentezlenmesi vardır ve bu sayede çevredeki sağlıklı dokuda daha az hasar meydana gelmektedir. Bu FS'ler 2. jenerasyon FS'lerin antikor, karbonhidratlar, amino asitler, peptitler gibi hedeflenen

parçalar ile konjuge olabilmesi için veya hedeflenen tümör bölgelerinde FS birikimini iyileştirmek için taşıyıcılarla karakterizedir. 3. jenerasyon FS'lerin temel hedefi çevre dokularda FS'nin neden olduğu olumsuz etkilerini azaltıp, biyokonjugasyonu teşvik ederek FS'nin hem farmakokinetiğini hem de spesifik birikimini iyileştirmektedir [6,35,38].

In vivo FDT için en kullanışlı FS türleri porfirinler, klorinler ve bakterioklorinlerdir. Buna ek olarak ftalosiyaninler ve teksafirinler gibi diğer porfirinoid sınıfları da FS olarak kullanılabilir. Porphirinler, klorinler ve bakterioklorinler elektromanyetik spektrumda kırmızı bölgede maksimum absorpsiyon gösteren, verimli singlet oksijen yaratıcılarıdır. Kırmızı ışık için maksimum absorpsiyon, FS'nin aktif olmasını sağlayan ışığın daha derin dokulara nüfuz etmesine olanak sağlamaktadır. Böylece, koyu kırmızıda güçlü absorbans sergileyen FS ajanları tümör kontrolünde iyileşme sağlamaktadır [32,39]. Kanser çalışmalarında kullanılan FS tipleri Tablo 2.3'de listelenmektedir.

Tablo 2.3. Kanser FDT'sinde kullanılan FS türleri.

Fotoduyarlı madde	Etkin dalga boyu	Kullanım alanları	Kaynakça
Porfimer Sodyum (Photofrin)	550 nm	Özofagus, akciğer, mesane, baş ve boyun, meme, mide, rahim ağzı, bağırsak yumurtalık, cilt ve beyin kanseri	5-7,33,39-42
5- ALA	550-555 nm	Cilt, akciğer, gırtlak, gastrointestinal, mesane, beyin, özofagus ve meme kanseri; bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom	5-7,33,38-42
Temoporfin	564 nm	Baş ve boyun, pankreas, prostat, safra, meme, özofagus, mide, akciğer ve beyin kanseri	5-7,33,39-42

Tablo 2.3. (Devamı) Kansere FDT’inde kullanılan FS türleri.

Fotoduyarlı madde	Etkin dalga boyu	Kullanım alanları	Kaynakça
Talaporphin (NPe6)	576 nm	Akciğer, özofagus, mide, safra kanalı, karaciğer, kolorektal, kolon, beyin, meme ve cilt kanseri; malign gliomalar	5-7,33,39-42
Padoporphin	754 nm	Prostat, özofagus kanseri	6,37,39,41,42
Rostaporphin (SnEt ₂ , Puryltin)	572 nm	Prostat, cilt ve meme kanseri, bazal hücreli kanser	5,6,33,39
Motexafin lutetium	733 nm	Beyin, meme, boyun, prostat, cilt kanseri ve süperfisyal kanserler	6,7, 39-42
HPPH	657 nm	Özofagus, meme, boyun ve baş, akciğer, cilt, ağız ve gırtlak kanseri	5-7,39,40,42
Hiperisin	510 nm	Pankreas, rahim ağzı, prostat, mesane, tiroid, meme, cilt ve kolorektal kanseri, T hücreli lenfoma	33,42,44
Ftalosiyenin	592 nm	Mide, cilt, dudak ve meme kanseri, T hücreli lenfoma	5,33,38,41,42
İndosiyenin yeşili (ICG)	Yakın kızılötesi (>800 nm)	Mide ve meme kanseri, lösemi, melanoma	7,42,43
Metilen mavisi	520-657 nm	Bazal hücreli karsinom	7, 37
Kurkumin	300-420 nm	Akciğer, kolon, böbrek, yumurtalık ve karaciğer kanseri, Süperfisyal kanserler	7,37,44,45

Tablo 2.3. (Devamı) Kanser FDT'sinde kullanılan FS türleri.

Fotoduyarlı madde	Etkin dalga boyu	Kullanım alanları	Kaynakça
Metil Aminolevulinat (Metvix)	550 nm	Bazal hücreli karsinom, cilt kanseri	6,7,40,41
Verteporfin	610 nm	Mide, pankreas, göz, cilt ve meme kanseri, bazal hücreli karsinom,	6,7,33,39-41
Heksil Aminolevulinat (Hexvix/Cysview)	600-362 nm	Mesane, prostat, kolon ve cilt kanseri, bazal hücreli kanser	6,7,39-41
Tiyofen	225-400 nm	Cilt ve rahim ağzı kanseri	44

İdeal bir FS'in bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler şu şekilde sıralanmaktadır;

- Kimyasal olarak yüksek oranda saf olmalıdır.
- Oda sıcaklığında stabil olmalıdır.
- Sadece belirli dalga boyundaki ışıktaki etki göstermelidir [6,31,38].
- Yüksek fotokimyasal aktivite sergilemelidir. FS'nin maksimum ışık absorpsiyonu için dalga boyu 600-800 nm arasında olmalıdır. 800 nm üzerindeki dalga boyları singlet oksijen ve diğer ROS ürünlerinin oluşumu için yeterli enerji sağlamamaktadır.
- Singlet oksijen ve ışığa bağlı olarak hedef dokuda yüksek toksisite için yüksek kuantum verimi sağlamalıdır.
- 400-600 nm dalga boyu aralığında minimum absorpsiyon sergilemelidir. Bu özellik sayesinde gün ışığından kaynaklı sensitivite önlenmektedir.
- FS'in absorpsiyon bantları hemoglobin veya oksihemoglobin gibi vücuttaki diğer maddelerin absorpsiyon bantları ile örtüşmemelidir.
- Karanlıkta minimum sitotoksisite sergilemelidir.

- Vücut dokularında kolay çözünmelidir. FDT ajanının lokalize bir şekilde aktif olabilmesi için hedef dokuda birikmesi gerekmektedir. Bu nedenle FS'lerin biyouyumlu olması ve daha sonrasında vücuttan uzaklaştırılması için biyobozunur olması önemlidir.
- Hedefe özgüllük ve seçici olarak birikim göstermelidir. FS belirli bir süre sonra hedef bölgeden uzaklaştırılmalı ve sağlıklı dokuda hemen elimine edilerek toksik etkisi minimum hale getirilmelidir.
- Ucuz olmalı, sentezi basit olmalı ve kolay erişilebilir olmalıdır [6,31,38].

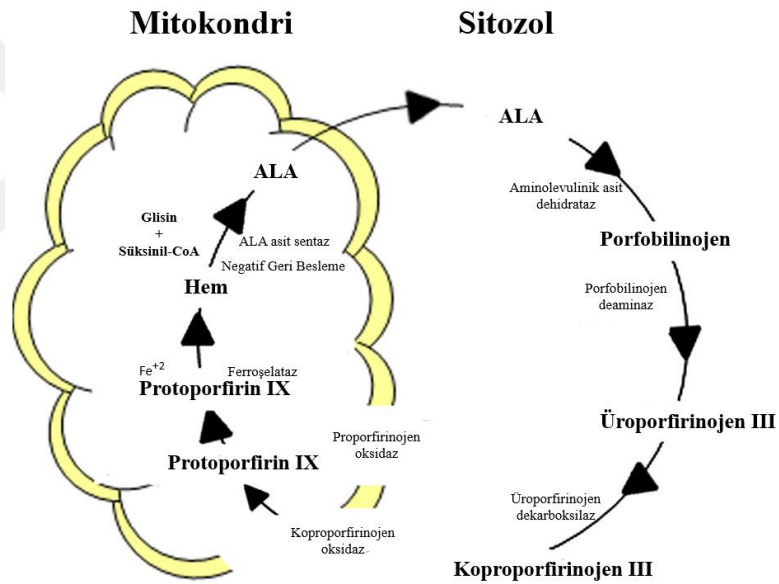
5-Aminolevulinik Asit (5-ALA)

5-Aminolevulinik Asit (5-ALA) süksinil-CoA ve glisinin yoğunlaşması sonucu oluşan, Hem biyosentezi için metabolik bir öncü görevi gören proteinojenik olmayan bir aminoasittir [46]. 5-ALA'nın kullanımı protoporfirin IX (PpIX)'un öncüsü olarak ortaya çıkmış önemli bir keşiftir. 5-ALA protoporfirine dönüştüğünde aktif bir FS olan, bir çeşit ön ilaç olduğu için 5-ALA veya esterleri birçok klinik uygulamada topikal veya oral yolla uygulanabilmektedir [5]. Hem'in öncüsü olan 5-ALA tek başına FS olmasa da intrinsik selüler Hem biyosentetik yolağıyla beraber hızla Hem'in başka bir öncüsü olan PpIX'a metabolize olmaktadır. Işığa maruz kaldıktan sonra, PpIX tümör hücrelerinin mitokondrilerine zarar veren güçlü bir FS haline gelmektedir [34].

Porfirinler ve metal kompleksleri biyolojik oksidasyon reaksiyonlarının aracılığı olarak hareket etme yetenekleri nedeniyle biyolojik açıdan öneme sahiptir. Hemoglobin, miyogloblin ve diğer hemoproteinler için prostetik bir grup ve doğal bir porfirin olan Hem, enerji üreten hücrelerde sentezlenmektedir. Protoporfirin IX demir şelatı olan Hem, bütün biyolojik oksidasyonların merkezinde yer almaktadır. Hem oksijenin taşınması ve depolanması, hücresel enerji üretimi, detoksifikasyon, steroid biyosentezi, protein sentezinin düzenlenmesi ve hücre gelişimi gibi birçok hayati fonksiyonda görev almaktadır [33,47,48].

Süksinil-CoA ve glisinin yoğunlaştırılması sonucu üretilmiş 5-ALA bir dizi enzimatik süreçten sonra önce PpIX'e ve ardından Hem'e dönüştürülmektedir (Şekil 2.3). Bu süreci serbest demir ve Hem düzenlemektedir. Hem biyosentetik yolağında iki enzim sınırlayıcıdır: 5-ALA sentaz ve ferroşelataz. 5-ALA sentazın aktivitesi Hem negatif geri besleme mekanizması ile düzenlenmektedir. PpIX'u Hem'e dönüştürmekten sorumlu enzim olan ferroşelataz geri besleme mekanizması ile verimli bir şekilde

Hem'e dönüştürülebilecek miktarda PpIX üretimine neden olmaktadır. 5-ALA eksojen olarak uygulandığında 5-ALA sentezi üzerindeki Hem'in uyguladığı doğal 5-ALA sentaz düzenlemesi atlanır ve ferroşelataz doyurularak PpIX üretimi artmaktadır. Bu adımdan sonra aşırı PpIX'in Hem'e dönüşümü için ferroşelatazın aktivitesi düşüktür [46-48]. Genel olarak FS olarak 5-ALA uygulandıktan 4-6 saat sonra hedef hücrelere ışık uygulanmaktadır. Bu sürede PpIX sentezlendiğinden, FS uyarılarak sitotoksik etkiye neden olan $^1O_2$ oluşumuna neden olmaktadır. Bununla birlikte, 5-ALA'nın tümör seçiciliğinin etkilendiği faktörler; anormal keratininin artan geçirgenliği, artan porfobilinojen deaminaz seviyeleri, azalan demir seviyeleri ve tümör hücrelerinde azalan ferroşelataz aktivitesi şeklinde sıralanmaktadır. Bu özellikler sayesinde hedef hücrelerde PpIX birikerek hedef doku seçiciliği gerçekleştirilmektedir. FS durumundaki PpIX 635 nm dalga boylarındaki ışık tarafından uyarılmaktadır [33,46].



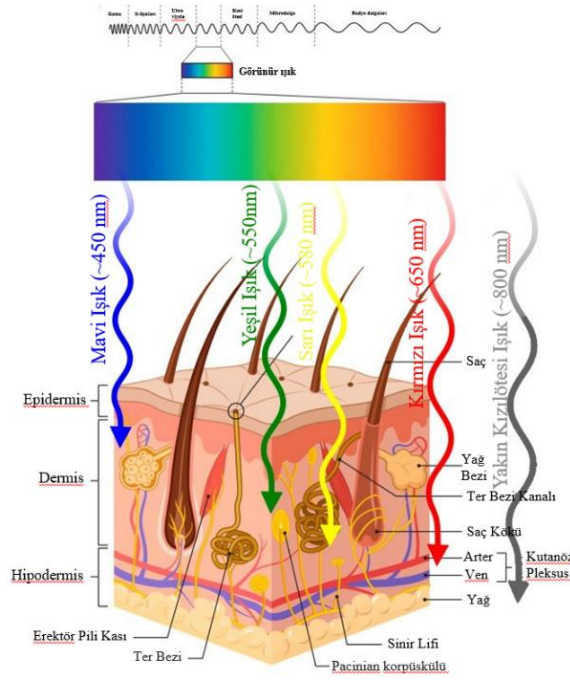
Şekil 2.3. 5-ALA'nın Hem sentez yolağı ve mekanizması [49].

2.2.1.2. Işık

FDT'de, FS'e özgü uygun dalga boyundaki ışık ile FS'in aktivasyonu sonucunda başlamaktadır. Işığın biyolojik doku ile etkileşimlerinin temelinde yansıma, kırılma, saçılma ve absorpsiyondur. Yansıma ve kırılma, kırılma indisi uyumsuzluğu olan iki ortamın sınırında gerçekleşmektedir ve Fresnel yasası ve Snell yasası ile tanımlanmaktadır. Saçılma ise, ışığın dağılmasına ve sonunda ışık yoğunluğunun azalmasına yol açmaktadır. Işık ile biyolojik dokuda istenen etki elde etmek için kilit etkileşim absorpsiyondur. Işık absorbe edildiğinde, absorbe edilen radyasyon

dokularda bulunan kromofor tarafından ısıya dönüştürülmektedir. Çoğu doku ışığı saçmasına rağmen, yüksek pigmentli alanlar ışığı soğurmaktadır. Dokuda bulunan yüksek oranda absorbands gösteren moleküller arasında su, oksihemoglobin, deoksihemoglobin, melanin ve sitokromlar bulunmaktadır [50,51].

Biyolojik dokuya en az nüfuz eden ışık mavi ışıkken, kırmızı ve kızılötesi ışıklar daha derine nüfuz etmektedir. Bu nedenle 600-1200 nm arasındaki dalga boyları terapötik pencere olarak bilinmektedir [52,53]. Buna rağmen yaklaşık 800 nm dalga boyundan daha kısa dalga boyundaki ışıklarda $^1\text{O}_2$ üretilebilmektedir. Çünkü uzun dalga boylarındaki ışıklar fotodinamik reaksiyon başlatmak için yeterli enerjiye sahip değildir [39]. Dalga boyuna göre ışığın dokuya penetrasyon derinliği 500-600 nm dalga boyları arasındaki ışığın doku penetrasyonu 4 mm, 600-800 nm aralığında dalga boyuna sahip ışık için ise 8 mm'dir [52,53]. Klinikte kullanılmakta olan 630 nm dalga boyundaki kırmızı ışık 1 cm'ye kadar nüfuz edebilmektedir. Ancak klinik deneyler bu dalga boylarındaki ışığın hedeflenen dokuda birkaç santimetre derinliğe kadar penetrasyon sergilediğini göstermiştir. Bu durum penetrasyon derinliği olarak adlandırılmaktadır. Penetrasyon derinliği ile hem yüzeysel hem de derindeki tümörün ısıtılmasına imkan sağlamasına rağmen, kullanılacak FS durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Bazı FS türleri daha derin dokulara penetrasyon göstermek için daha yüksek dalga boylarında ışığa ihtiyaç duyarken daha yüzeysel uygulamalar için daha kısa dalga boyuna sahip ışıklara ihtiyaç duyabilmektedir. Işığın dokudaki penetrasyon derinliği UV'den infrarede kadarki spektral aralıkta dalga boyunun büyümesi ile artmaktadır [34,54]. Bu temel göz önüne alındığında etkin bir FDT uygulamasında kullanılacak FS'e uygun en uzun dalga boyunda uyarım avantajlı olmaktadır. FDT'de seçilen tek bir ışık kaynağı her FS için uygun değildir. Bu nedenle ışık kaynağını seçerken FS absorpsiyonu, hastalığın yeri ve büyüklüğü, hedef dokuya erişilebilirlik ve doku özellikleri, maliyet ve boyut göz önüne alınmalıdır. Ek olarak ışığın toplam dozu, uygulama süresi ve ışığın uygulanma modu da göz önüne alınmalıdır [39, 55]. 5-ALA ile FDT uygulamasında, fotonların % 50'sinin 355 nm dalga boyundaki ışıktaki doku penetrasyonu 80 μm , 694 nm dalga boyundaki ışık için ise 1200 μm 'dir (Şekil 2.4) [52,54].



Şekil 2.4. Işığın dalga boyuna göre cilde yaklaşık penetrasyon derinlikleri [54].

FDT’de çeşitli ışık kaynakları kullanılabilir. Günümüzde ışık kaynağı bir lambadan yayılan görünür bölgedeki bir ışıktan lazer ışığına kadar geniş bir alana sahiptir. Genel olarak, FDT’de FS’i aktif etmek için ışık kaynağı olarak genellikle lazerler veya bazı durumlarda ark lambaları ve floresan ışıklar tercih edilmektedir. Ark lambaları ucuzdur ve kullanım kolaylığı vardır ancak optik güçleri azaltılmadan fiberlerle eşleştirmek zordur ve çıkış gücü 1 W ile sınırlıdır. Bunlara ek olarak ısınmaya neden olabilen UV radyasyonunu ve kızılötesi emisyonu önlemek için filtreler gerekmektedir. FDT’de ışık kaynağı olarak en çok lazerler kullanılmaktadır. Bunun nedeni lazerlerin, ışık dağıtım cihazı olarak kullanılan kuvars fiberlerine yönlendirilebilen koherent ve monokromatik ışık üretmeleridir [32, 37,56].

Lambalar FDT çalışmaları için ilk kullanılan ışık kaynaklarıdır. Bilimsel ve tıbbi biyofotonik uygulamalar için sıklıkla kullanılan lambalar, çoğunlukla yüksek basınçlı gaz deşarjlı lambalar veya ark lambalarıdır. FDT’de özellikle floresan, akkor, metal halojenür, ksenon ark ve sodyum ark lambaları kullanılmaktadır. Bu tür lambalar, yüksek basınçlı bir gaz veya buhardan bir elektrik deşarjı geçtiğinde yoğun bir ışık üretimine dayanmaktadır. Ark uzunluğu genellikle sadece birkaç milimetre olduğundan, bu lambalar kısa ark lambaları olarak bilinmektedir. Genel olarak deşarj, cıva (Hg) buharının veya ksenon (Xe), argon (Ar) ve neon (Ne) gibi asal gazların iyonlaşmasıyla sürdürülmektedir. Bu ışık kaynakları, dar spektral bantlar veya

morötesinden kızılötesi bölgelere kadar uzanan geniş spektral bantlar gibi çok çeşitli çıkış özelliklerine sahiptir [51, 57]. Bu lambaların bazıları sürekli dalga (CW) modunda çalışırken diğerleri atım modunda kullanılmaktadır. Yüksek basınçlı cıva ark lambaları, UV ve görünür bölgelerde yüksek yoğunluklu çizgi tipi spektral aralığa sahiptir. Bu lambalarda spektral emisyon esas olarak 300-600 nm bölgesindedir. Çıkış güçleri, 50-500 W arasında değişebilir. Yüksek basınçlı ksenon ark lambaları da popüler ve çok yönlü radyasyon kaynaklarıdır. Bu lambalar, UV bölgesinde yaklaşık 250 nm'den yakın kızılötesinde 1000 nm'den fazlasına kadar değişen yoğun, yarı-sürekli bir spektrumda ışık yaymaktadır. Xe lambalarının emisyonu ise % 95 gün ışığına benzemektedir [57, 58].

Lambalar, prensipte, ışığı spesifik tedavi alanına odaklamak için ışık kılavuzlarına optik olarak bağlanmasına rağmen bağlantı kayıpları yüksektir. Bu nedenle, lambalar cilt veya ağız kanseri gibi yüzeysel kanserler için daha uygundur. Lambalardan üretilen ışığın geniş bantlı bir spektrumu olduğundan, uyarıcı dalga boyunu FS absorpsiyon bandıyla eşleştirmek için uygun optik filtreleme gereklidir. FDT'de lamba kullanmanın avantajları arasında basit tasarımları, düşük maliyetleri ve geniş bir aydınlatma alanı bulunmaktadır. Buna rağmen lambalar FDT sırasında istenmeyen fotodinamik etkilere neden olabilir. Bu tür lambaların yoğunluğunu ve aydınlatma süresini en aza indirmek gerekmektedir. Ayrıca, lambalar genellikle yüksek yoğunluğa sahiptir ve spektrumları FS Soret bandının önemli bileşenlerini içermektedir ve bu nedenle filtrelenmesi gerekmektedir [51,58].

Işık yayan diyotlar (LED), elektron deliği rekombinasyonunun bir sonucu olarak ışığın üretildiği yarı iletken cihazlardır. LED teknolojisinin arkasındaki teori, uygun parametrelerin düşük yoğunluklu ışık fotonlarının, hücreleri termal olmayan, ablatif olmayan bir şekilde aktiviteyi indüklemek veya inhibe etmek için aktive etmek için hücre altı kromoforlarla etkileşime girebilmesidir [51,59]. LED'den yayılan ışığın dalga boyu spektrumu UVA'dan (350 nm) yakın kızılötesine (1100 nm) kadar değişmektedir. LED'lerin bant genişliği 5-10 nm'dir ve çıkış gücü yaklaşık 20 cm²'lik bir alanda 150 mW/cm²'ye kadar ulaşabilmektedir. LED'lerin çıkış gücü, FDT'de yaygın kullanımlarda sınırlayıcı bir faktör olabilir, ancak teknolojinin gelişimiyle bu yönü iyileştirebilir [60]. LED'ler daha ucuzdur, bu nedenle geniş alanları ısıtmak için düzenlenebilirler ve LED'ler kompakttır, hafiftir ve pillerle çalıştırılabilir, bu da LED'leri kolayca taşınabilir hale getirmektedir. Buna ek olarak, istenen ışık dalga

boylarını üretmek için önemli miktarda daha az enerji gerektirmektedir. Bu nedenle LED'ler, klinikte ve laboratuvarlarda kullanım için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, LED'ler zor anatomik alanlarda kullanabilmek için farklı geometrik kombinasyonlarda düzenlenebilmektedir [51,58]. LED'de ışık üretimi, bir diyot lazerin ışık üretmesinin temel çalışma prensibine benzemektedir. Ancak LED'lerin uyarılmış emisyon için rezonans boşluğu bulunmamaktadır ve ışık kendiliğinden yayılmaktadır. Böylece, bir LED'den çıkan ışık, geniş spektral genişlik ve büyük ışın sapması nedeniyle koherent değildir. LED'ler herhangi bir renkte ışık üretebilir, ancak LED'ler diyot lazerlere kıyasla daha geniş bir spektral genişliğe sahiptir. Bu, FS tarafından daha düşük bir absorpsiyon verimliliği ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, LED'ler genellikle bir diyot lazere kıyasla daha düşük bir çıkış gücüne sahiptir [59, 60].

Lazerler

Uyarılmış radyasyon emisyonu ile ışık amplifikasyonu'nun kısaltması olan lazerler genel anlamda, ışığı üreten veya yükselten cihazlardır. Farklı lazer türleri kızılötesi bölgeden, milimetre boyutunda dalgalarla veya mikrodalgalarla birleşerek, görünür ultraviyole ve hatta X ışını bölgelerine kadar uzanan dalga boylarında radyasyonu yükseltebilir [61]. Son birkaç yılda çeşitli lazerlerin kullanımı ile biyofotonikte önemli etkiler sağlanmıştır. Lazerlerin diğer ışık kaynaklarına göre avantajları şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Lazerler monokromatik ışın üretmektedir. Böylece dalga boyları, kullanılacak malzemenin absorpsiyon bandına uyacak şekilde seçilebilir.
- Çıkan ışın yüksek oranda hizalanabilir ve böylece lazer ışığının tam olarak belirli bir noktaya yönlendirilmesi anlamına gelmektedir.
- Lazere bağlı olarak, çıkış gücü mW ile kW arasında değişebilir.
- Atım genişliğinin istenen zaman çözünürlüğü ölçümünden daha kısa olması gereken kullanım için kısa atım süreleri (örneğin birkaç femtosaniye) mümkündür [57].

Bir lazerde temel bileşenler kazanç ortamı, rezonant boşluğu ve enerji kaynağı şeklinde sıralanabilir. Kazanç ortamında kullanılan malzemeyle beraber uyarılmış emisyon sayesinde ışığın amplifikasyonu gerçekleşir. Lazerlerde katı, sıvı, gaz ve yarı iletken olmak üzere 4 çeşit kazanç ortamı bulunur. Bu kazanç ortamları lazerde

bulunan rezonant boşluk içerisinde yer alır. Rezonant boşluğunun her iki ucunda yansıtıcı aynalar bulunur ve bu aynalardan biri fotonların tamamını yansıtırken diğeri bir kısmını lazer olarak geçirirken geri kalanını yansıtmaktadır. Enerji kaynağı ise kazanç ortamını uyarmak için farklı bir dalga boyunda ışık veya elektrik akımı ile enerji iletimi sağlar. Uyarılmış kazanç ortamı spontan bir foton yayılımı sağlar. Hizalanmamış olan bu spontan fotonlar rezonant boşluğunun ucunda bulunan aynalara çarparak hizalanır. Bu şekilde aynalardan yansıyan ışın birçok kez kazanç ortamından geçerek amplifikasyona uğrar. Bu olay sayesinde uyarılmış foton emisyonu gerçekleşir ve buna bağlı olarak aynı fazda olan koherent, monokromatik ışık üretmektedir [62,63].

Lazerler kardiyoloji, diş hekimliği, dermatoloji, gastroenteroloji, jinekoloji, mikroskopi, mikrocerrahi, beyin cerrahisi, oftalmoloji, ortopedi, kulak burun boğaz, spektroskopi ve üroloji gibi birçok uygulama alanına sahiptir [64]. Bu alanlara ek olarak dar bir bant genişliği ile üretilmiş monokromatik ve koherent ışık üreterek spesifik özellik sergileyen lazerler yüzeysel ve interstisyel FDT için yaygın kullanılmaktadır. Çünkü lazerler, yüksek optik güç ve belirli bir FS'e uygun olacak şekilde kontrol edilebilen dalga boyunda ışın üretmektedir. FDT'de birçok lazer tipi kullanılmasına rağmen, argon lazerleri, boya lazerleri, metal buhar lazerleri, katı hal lazerleri (KTP: YAG ve Nd: YAG) ve diyot lazerler en yaygın kullanılan lazerlerdir [51, 57].

Argon lazerleri elektromanyetik spektrumun mavi-yeşil kısmında ışık yayan, 488 ve 514 nm'de tepe emisyonları olan sürekli dalga sistemine sahip lazerlerdir. Bu iki dalga boyu görünür bölgede olduğundan, ışık optik fiberler aracılığıyla iletilebilmektedir [65]. Argon lazerleri, 1 m uzunluğunda bir tüpe ihtiyaç duymaktadırlar ve tek frekanslı dar bir ışık demeti (1.5 mm) sağlamaktadırlar. Argon lazerlerin çıkış gücü 2-100 W arasında değişmektedir ancak bu lazerler elektrik akımının yaklaşık % 0.1'i lazer ışığına dönüştürüldüğü için verimsiz kabul edilmektedir. Argon lazerlerin ürettiği ışık esas olarak derideki hemoglobin ve melanin tarafından soğurulmaktadır. Tipik bir Argon lazerin sağladığı enerji miktarı; ana ışının fiber optiklere bağlanması için birden çok ışına dönüştürülmesi, daha eşit ışık dozimetrisi için birden çok uygulama noktası kullanılarak lazer ışığının birden çok küçük alana veya büyük boşluklara uygulanmasını sağlamaktadır. Argon lazerlerin düşük penetrasyon derinliğine sahip olması nedeniyle premalign ve malign tümörlerin tedavisinde kullanımı sınırlıdır [59,

64, 65]. Nispeten kısa atımlar (0.5 saniyeye kadar) uygulandığında, penetrasyon derinliği yaklaşık 1 mm ile sınırlı olmasına rağmen, penetrasyon derinliği, lazer gücü azaltılarak ve daha uzun maruz kalma süreleri uygulanarak, ısı iletiminin artmasıyla artırılabilir. Ek olarak, yüksek elektrik akımı beslemesi ve soğutma sistemine ihtiyaç duymaları gibi dezavantajlara da sahiptir [58, 60].

FDT’de kullanılan bir diğer lazer tipi boya lazerleridir. Lazer sisteminin modeline ve yapısına olarak farklılık gösterse de bu lazerler genel olarak 1-7 W çıkış gücüne sahip 600-650 nm dalga boyunda sürekli dalga (CW) şeklinde ışık üretmektedir [58, 60]. Boya lazerlerinin kazanç ortamında rodamin 6G (R6G), floresan, kumarin, stiben, umbelliferon, tetrasen ve malakit yeşili gibi organik floresan boya moleküllü bulunmaktadır [66]. Kullanılan boya malzemesi genelde sıvı formdadır ve aşırı ısınmayı önlemek için sirkülasyon halindedir. Bu nedenle, boyanın sadece bir kısmı boşlukta kalıcı olarak bulunur. Bu tip lazerlerde genel olarak argon, Nd: YAG, bakır buharı gibi pompa lazerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla, onlarca wattlık değerlerde pompa gücü gerekmektedir [51]. Boya lazerinin avantajı, tek boya kullanımı ile 100 nm’ye kadar geniş ayar aralığıdır [59]. Bu pompa lazerlerinin taşınabilirliği düşüktür çünkü bu sistemlerde yüksek voltajlı güç kaynakları, yüksek akım ve su soğutması gerekmektedir. Boya lazerleri ve pompa lazerlerinin olduğu sistemlerde pompa lazerlerindeki emisyon dalga boyu ile boyanın absorpsiyon dalga boyu örtüşmelidir. Boya lazerler geniş spektral aralıkta dalga boyuna sahip ışık üretmektedir. Ayarlanabilir optik filtrelerin kullanılması ve rezonant boşluğun geometrisi ile çıkış ışığının dalga boyu değişebilmektedir [51]. Boya lazerlerindeki bu ayarlanabilir dalga boyu özelliği, birçok farklı FS türü kullanımına imkan sağlamaktadır. Buna rağmen boya lazerlerinin boyutları büyüktür, taşınabilir değildirler, yüksek bakım gerektirirler ve maliyetleri yüksektir. Bu lazerler FDT amacıyla birincil akciğer kanseri, ağız kanseri, özofagus ve mesane kanserleri çalışmalarında kullanılmışlardır [58, 60].

Altın veya bakır buharlı lazerler de FDT’de ilgi çekmektedir. Argon lazerlerin tersine bu lazerler 10-50 ns arasında değişen dinlenme süresine sahip atım modunda dalgalar üretmektedir. Bu özelliğe bağlı olarak yüksek bir tekrar oranı, bu lazerlerin klinik amaçlar için yarı sürekli ışınlar üretmesini sağlamaktadır. Altın buhar lazeri FDT için yeterli güçte, 15 kHz tekrarlama frekansında atım modunda, 627.8 nm dalga boyunda ışın üretmiştir. Bu sistem argon/boya lazerlere göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Buna rağmen düzenli altın yükleme gerektirdiği için maliyeti artmaktadır ve uzun

bir ısınma, soğuma periyodu gerektirmektedir. Birkaç yüz mW/cm²'ye kadar enerji yoğunluğuna sahip ışınlar üretebilen metal buharlı lazerler optik fiberlere bağlanarak oral kanser, baş ve boyun kanseri, özofagus, akciğer ve mesane kanseri gibi endoskopik FDT protokolleri için kullanılabilir [58, 60].

FDT için önemli gelişmelerden biri 1064 nm'de ve 532 nm'de yarı-sürekli dalgalı (25 kHz) lazer ışınının kullanımına izin veren çift frekanslı fazda çalışma özelliğine sahip KTP: YAG ve Nd:YAG lazerlerin kullanılmaya başlanmasıdır. KTP lazerler, görünür spektrumun yeşil kısmında 532 nm emisyon dalga boyuna sahip, kavite içinde veya harici olarak KTP kristalleri kullanan, frekansı iki katına çıkan Nd: YAG lazerlerdir. KTP: YAG lazerlerde fiber optik kullanımı ile beraber 532 nm dalga boyundaki ışıktan 630 nm dalga boyuna sahip ışınlar üretilebilmektedir. Bu lazer sistemlerinde maksimum 3.5 W ve 7 W çıkış gücüne sahip 630 nm dalga boyunda atım modunda ışınlar üretilmektedir. KTP: YAG lazerleri taşınabilirlik, ayarlanabilirlik ve kullanım kolaylığı gibi avantajlar sunmaktadır. Buna rağmen KTP sisteminin bağımsız hareket edebilmesi dezavantaj sunmaktadır [59, 60]. Daha yüksek hızlarda ve daha kısa süreli atım çıkışlarına sahip Nd: YAG lazerleri ise yakın kızılötesi bölgede, 1064 nm'de, ışık yaymaktadırlar. Temel dalga boyu 1064.2 nm'dir. Nd: YAG lazer dört seviyeli bir sistemdir. Sürekli çalışma versiyonlarında, çıkış gücü, daha büyük modeller için birkaç watt'a kadar minyatür kurulumlar için birkaç miliwatt olabilmektedir. Atımlı versiyonlar, mikrojoule atım enerjileriyle birkaç nanosaniyelik atımlar üretebilmektedir. Ayrıca, penetrasyon derinliği, lazer gücü ve maruz kalma süresindeki değişikliklerle kontrol edilebilmektedir. Buna rağmen Nd: YAG lazerlerin genel verimliliği % 2'den az olduğu için sistemin su ile soğutulması gerekmektedir [57, 59, 65].

FDT'de önemli bir diğer gelişme 630 nm dalga boyunda ışınlar oluşturan diyot lazerlerin üretilmesidir. Diyot lazer sistemleri optik konfigürasyon gerektirmeyen yarı iletken ışık kaynaklarıdır [60]. Elektron-boşluk rekombinasyonunun ışık üretimine neden olduğu diyot lazerler, kazanç ortamını ve rezonant boşluğunu içeren katı hal birimi içermektedir. Bu lazerlerde enerji kaynağı olarak elektrik akımı kullanılmaktadır [51]. Dalga boyu, çeşitli elementler (örneğin alüminyum, indiyum) eklenerek ayarlanabilmektedir. Klinikte kullanılan diyot lazer 800-900 nm aralığında yakın kızılötesi ışık yaymaktadır. Bu lazerler ile sürekli dalgalı ışınlar veya atım modunda ışınlar üretilebilmektedir [67]. Çok yönlü olan diyot lazerlerin klinikte ve

laboratuvar ortamında kullanımları kolaydır ve taşınabilir. Optik fiberlere bağlanan diyot lazerler FDT için ideal lazerlerdir [58]. FDT’de en yaygın kullanılan lazer tipi olan diyot lazerler daha hafif, daha kompakt, daha taşınabilir, daha kararlı, daha düşük maliyetli ve otomatik dozimetre ve kalibrasyon özelliklerine ve daha uzun çalışma ömrüne sahiptir. FDT’de 415-690 nm aralığında dalga boyuna sahip lazerlerin kullanımı tercih edilmektedir. Lazer diyotlar, % 60'a varan elektrik akımından ışığa dönüşüm ile çok verimlidir. Bu nedenle, çok güçlü oldukları (100 W'a kadar), küçük cihazlar oldukları ve dalga boyunda esnek oldukları için tıbbi uygulamalar için çok uygundur ancak çıkış güçleri 2-2.5 W ile sınırlıdır [51,59, 60].

2.2.1.3. Oksijen

FDT’deki üçüncü önemli parametre oksijendir. FDT’nin terapötik etkinliği hedef dokularda bulunan moleküler oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. FDT’de ROS üretimi için kritik olan oksijenin dokulardaki konsantrasyonu FDT etkinliğini düzenlemektedir. Kansere hücrelerinde hızlı büyümeleri sonucunda yetersiz damar yapıları ve artan oksijen difüzyon mesafeleri nedeniyle oksijen yoksunluğu bulunmaktadır. Oksijen konsantrasyonu kanser türüne ve bazen aynı kanserin farklı bölgelerine göre değişebilmektedir. Kansere dokusu yüksek akış oranına sahip ışık ile uygulamaya maruz kaldığında, dokuda geçici bir lokal oksijen tüketimi gözlemlenebilmektedir. Bunun sonucunda ROS üretimi kesintiye uğrayarak tedavi etkinliğinde azalma görülmektedir. Kansere hipoksisinin üstesinden gelmek için perflorokarbonlar ve hemoglobin gibi oksijen taşıyıcıları kullanmak oksijenin kansere doğrudan verilmesini sağlamaktadır. Düşük oksijen konsantrasyonu sonucunda hipoksik durum oksijenin hayati bir bileşeni olduğu FDT için kritik bir problemdir. Bu problemi çözmek için, ışık dozu dikkatli bir şekilde ayarlanmalı veya ışık, tercihen atımlar halinde (fraksiyonlu) verilebilir. Ayrıca, kanser dokularında oksijen kullanılabilirliğini arttırmak için dokuya doğrudan veya dolaylı olarak oksijen verilmesi mümkündür. Diğer yandan, hücre içi hidrojen peroksidi oksijene ayrıştırmak için katalaz enziminin kullanımı da oksijen konsantrasyonunu arttırmanın bir yoludur. Kanserin hipoksik bölgeleri belirli kemoterapilere ve radyoterapiye karşı dirençlidir. Aynı zamanda kanser dokusuna oksijen erişimi engellendiğinde FDT etkinliğinde azalma meydana gelmektedir. Bu sorun da optimal FS dozunun değişimi ile çözülebilmektedir. Özetle, FDT ile indüklenmiş sitotoksik etki gözlemlenmek için moleküler oksijen temel bir unsurdur. Uygulanan ışığın akış hızı, FDT ile sitotoksik

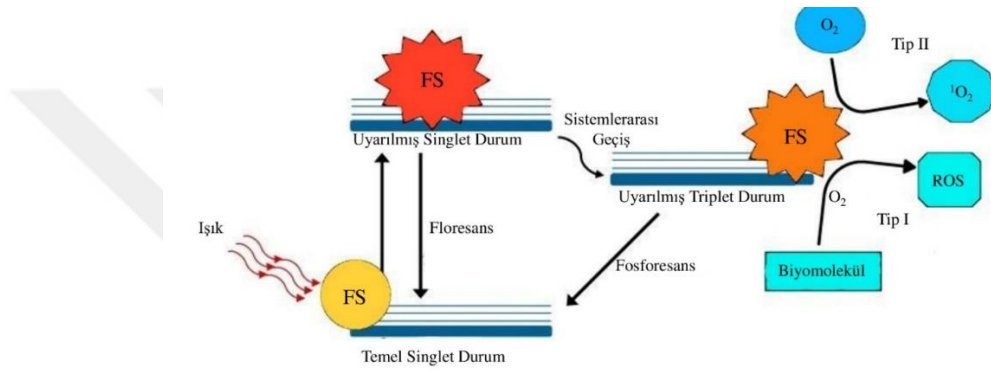
singlet oksijen üretimi sırasında fotokimyasal oksijen tükenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Düşük ışık akış hızı kanser kontrolünü desteklerken, yüksek ışık akış hızı kanser dokusunda bulunan oksijen konsantrasyonunu önemli miktarda azaltmaktadır. Sonuç olarak, FDT'de başarılı sonuçlar elde etmek için FS dozu, ışık kaynakları ve tedavi parametrelerinin optimal kombinasyonlarının seçimi çok önemlidir [54,66,68,69].

2.2.2. FDT etki mekanizması

FDT'nin moleküler mekanizması dokuda istenen etki yaratmak için 3 toksik olmayan bileşenin (FS, uygun dalga boyuna sahip ışık ve hücrelerde çözünmüş oksijen) etkileşimlerine dayanmaktadır [5]. Fotokimyasal reaksiyonunun başlama koşulu ışık kaynağının emisyon bandı ile FS absorpsiyon bandının korele olmasına bağlıdır. FS maddeler mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi ve hücre zarında lokalize olabilmektedir [35]. FDT reaksiyonunda iki temel mekanizma vardır. Her iki mekanizma da hücre içindeki oksijen molekülleri ile yakından ilişkilidir ve her iki mekanizmanın ilk aşaması benzerdir. FDT reaksiyonunun temeli FS maddelerin hücre içine girdikten sonra, FS'ye özgü absorpsiyon spektrumunda dalga boyuna sahip ışık ile ısıtılması sonucunda FS'lerin singlet temel enerji durumu S_0 'dan uyarılmış singlet durum S_1 'e dönüştürülmesidir. Bu noktada enerjinin bir kısmı kuantum spektrum formunda yayılmaktadır ve kalan enerji FS molekülünü terapötik form olan triplet durum T_1 'e yönlendirmektedir. Uyarılmış FS'nin enerjisi termal bozunma, S_1 'den floresans emisyonu ve T_1 'den fosforesans şeklinde yayılabilmektedir. FS'nin triplet durumdaki daha uzun ömrü uyarılmış FS'nin çevresindeki moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır ve FDT sırasında üretilen sitotoksik etkinin oluşmasına neden olan uyarılmış triplet durum iki farklı mekanizma ile reaksiyona girebilmektedir [5,35,70].

Tip I mekanizmasında T_1 durumunda olan FS ile hedef doku arasında bir elektron veya hidrojen aktarımı gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda FS dokuda, süperoksit ve hidroksil radikali gibi ROS'a yol açan serbest radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Daha sonrasında elektronlar temel enerji halindeki oksijen molekülleri ile etkileşime girmektedir ve başlangıçta süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) şeklinde ROS üretimi gerçekleşmektedir. Böylece hücre içinde daha fazla ROS oluşuma neden olmaktadır ve enerji, uyarılmış moleküllerden biyomoleküllere aktararak biyomoleküllerde spesifik hasarların ortaya çıkmasına veya radikal zincir reaksiyonları başlamasına neden olmaktadır (Şekil 2.5) [5,6, 34,35,70,71].

Tip II mekanizması ise FS'nin uyarılmış triplet durumu ile singlet oksijen üreten temel durumdaki moleküler oksijen arasında meydana gelen enerji transferinden kaynaklanmaktadır [33]. FS'nin uyarılmış triplet duruma geçişinin sonucunda enerji doğrudan temel triplet durumdaki oksijen molekülüne aktarılmaktadır. FS molekülünden O_2 molekülüne doğrudan enerji transferi aynı spinlere sahip olduğundan dolayı mümkündür [5]. Böylece, son derece güçlü oksitleyici özelliklerle karakterize edilen ve oksidatif süreçte kanser hücrelerinde toksik etkiye neden olan singlet oksijen sitotoksik uyarılmış oksijen parçaları üretmektedir (Şekil 2.5) [6,35,70,71].



Şekil 2.5. FDT etki mekanizması, Tip I ve Tip II reaksiyonlarının karşılaştırılması[71].

2.2.3. FDT'de singlet oksijen oluşumu

Singlet oksijen, moleküler oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu olmuş ürün olan ROS'dur. FDT'de üretilen sitotoksik ajan singlet oksijen, en dışta bulunan elektronlarından birinin spin yönünü tersine çevirerek üretilmiş bir oldukça reaktif oksijen formudur [32]. Günümüzde kullanılan FS'lerin çoğu, elektron transfer reaksiyonları için singlet oksijen üretimini hedeflemektedir. Bununla birlikte, biyolojik substratların mevcudiyetindeki bu elektron transfer proseslerinin, FDT'nin nihai biyolojik sonuçlarını önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Singlet oksijen, iki elektronun 2p bağönlere orbitallerinden birine eşleşmesi sonucu aşırı reaktivite göstermektedir. Hizalanmış spinlere sahip elektronlarda kuantum sayıları aynıdır ve bu nedenle ayrı orbitallere yerleşmek zorunda kalırlar. Uyarılmış FS ile etkileşimde elektronun spin yönü tersine dönmektedir ve özgün kuantum sayıları ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda FS molekülü, dengesizliğe neden olan bağönlere orbitaline gelmelerini sağlamaktadır. Singlet oksijen oldukça polarize bir zwitteriondur [72].

Singlet oksijenin organik çözücülerde 10-100 ms arasında değişen bir ömre sahip olacak kadar reaktif olması nedeniyle, faaliyeti 10 nm çapa sahip küresel bir hacimle sınırlıdır. Buna rağmen singlet oksijenin su içindeki ömrü 2 ms kadar düşüktür. Bunun nedeni su moleküllerinde uzayan oksijen-hidrojen enerjisinin singlet oksijenin uyarılmış durum enerjisine neredeyse eşit olmasıdır. Bu enerji, su moleküllerinin genleşme ve titreşim hareketleri sonucunda ısı olarak dağılmaktadır. Singlet oksijen içeren oksidasyon reaksiyonlarının farklı sonuçları olabilir. Boş π^*2p orbitalinden dolayı singlet oksijen, elektronca zengin bileşiklere karşı oldukça reaktiftir. Bu nedenle singlet oksijen, lipid hidroperoksitleri veren lipid oksidasyonuna yol açmasıyla bilinmektedir. Bu hidroperoksitler; radikallerin, yüksek sıcaklıkların veya geçiş metallerinin varlığında kararsızdır ve peroksidasyon zincir reaksiyonunu başlatmaktadır. Bunun yanı sıra singlet oksijen, bazı amino asitler ve azotlu bazlar gibi azot veya kükürt içeren moleküllerle de reaksiyona girebilir. Karbonhidratların singlet oksijene karşı daha az reaktif olduklarına inanılmaktadır. Ancak karbonhidratların sadece singlet oksijen varlığında oksidasyonu ile ilgili literatür hala çok azdır. Singlet oksijen, yüksek reaktivite nedeniyle çok hızlı reaksiyona girmektedir. Bu özelliği ile FDT’de neden olduğu oksidatif hasar, hücre zarından daha küçük çaplı bölgelere lokalizedir. Bu sebeple fotodinamik hasar, çoğu PS’nin hidrofobik karakter sergilemesi nedeniyle hücrenin hidrofobik bölgelerine yakın veya içindeki hedeflerle sınırlıdır [72-74].

2.2.4. FDT’de dozimetri

FDT’de optimal ışık ve FS dozlarını ayarlamak için dozimetri kritik bir araçtır. Dozimetrenin genel amacı, kombin tedavi dozuyla yakından ilişkili olan, entegre bir parametre sağlayabilen tüm ilgili parametreleri ölçmektir [75]. FDT’de ışık iletimini ve dozimetriyi ölçmek için lineer difüzör ve izotropik difüzör olarak adlandırılan iki fiber optik cihaz kullanılmaktadır. Çoğunlukla dağınık ışığı ölçmek için kullanılan izotropik difüzörler her yönden gelen ışığa eşit şekilde duyarlıdır. Lineer difüzörler daha yaygın olarak kullanılmaktadır. FDT’de dozimetri, FS ve oksijen arasındaki etkileşimlere dayandığı için karmaşıktır [63]. Genel olarak FDT’de etkinlik; FS konsantrasyonu, ışığa maruz kalma süresi, uygulama yöntemi, fraksiyonasyon ve dozimetri tipi gibi parametrelere bağlıdır. FS konsantrasyonu farmakokinetik nedeniyle bölgeden bölgeye ve hastadan hastaya değişebilmektedir ve ışığın hedefe nüfuzu doku optik özelliklerine bağlıken doku oksijenasyonu dikkate alınmamaktadır

[64,65]. FDT uygulamasında parametrelerin miktarı değişebilir. Işık akışının ölçülmesi önemli bir adımdır ve bu adımın optimizasyonu hedef dokunun hacmindeki ışık akış oranının doğru hesaplanmasına bağlıdır [66]. Bu nedenle FDT'nin sonuçlarını tahmin edebilmek için dozimetri önem arz etmektedir. FDT'de hedefe etki eden doz miktarı kritik öneme sahiptir ve doku hasarına neden olduğu varsayılan tekli oksijenin kümülatif dozuna bağlı olarak direkt dozimetri, dahili dozimetri ve net dozimetri olmak üzere üç farklı dozimetri stratejisi geliştirilmiştir [75].

Direkt dozimetri ile FDT'deki sitotoksik ajan olarak ROS ölçülmektedir. Bu yöntem kendi fosforesans emisyonu veya singlet oksijene duyarlı kromoforlar ile singlet oksijenin saptanmasını temel almaktadır. Bunun nedeni singlet oksijenin yakın kızılötesi lüminans emisyonunun zayıf ve kısa ömürlü olmasıdır. Singlet oksijen üretimi ile biyomoleküller oksitlenir veya 1270 nm'de ışımsal olarak bozunmaktadır. Böylece fosforesans yayılmasına rağmen, düşük kuantumu nedeniyle luminesans ölçümü zordur. Bu amaçla singlet oksijen lüminesans dozimetrisi (SOLD) ile aralıklı ölçüm sonucu doku oksijenasyonu ve birikmiş FDT dozu belirlenmektedir. Bu yöneme ek olarak spektrofotometre ile de singlet oksijen miktarı tespit edilebilmektedir. Spektroskopi ile singlet oksijen tespitinin temelinde 355 nm'deki absorbansta meydana gelen azalmanın singlet oksijen ile ilişkili olması bulunmaktadır. Bu yöntemde yüksek duyarlılık gerektiği için kullanımı sınırlıdır. Singlet oksijen miktarını belirlemek için kullanılan diğer bir yöntem floresan problarıdır. Bu problar singlet oksijen veya ROS tespiti için yüksek hassasiyet ve özgüllük sergiledikleri için spektrofotometriye göre avantajlıdır [64,65,76].

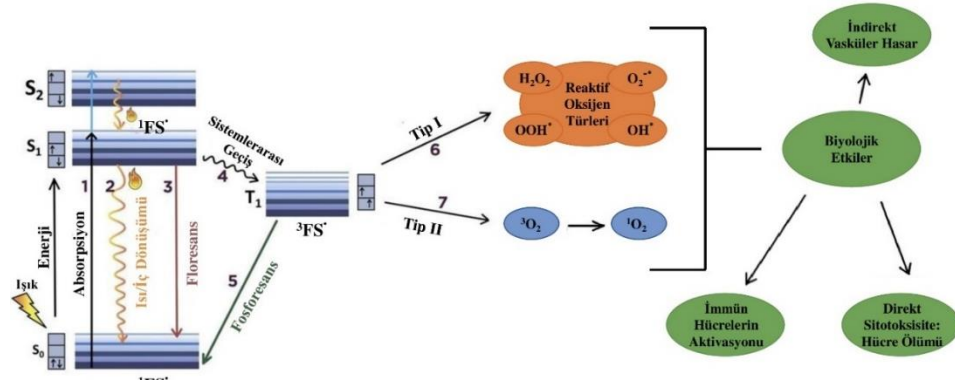
Dahili (implicit) dozimetride FDT parametrelerini ayrı ayrı ölçmeye gerek olmaksızın tek bir parametreden yararlanılmaktadır. Bu yöntemde singlet oksijen üretiminin tahmini olarak FS'nin floresan ışıkla ağartılması kullanılmaktadır. FDT'de fotoağartma temel durumdaki FS'nin geri dönüşümsüz fotoağartmaya maruz kalması ve bunun sonucunda floresan yoğunluğunda ölçülebilir bir azalma meydana gelmektedir. Bu azalma ışık, FS ve oksijenin etkileşimlerine bağlıdır ve bunların bir sonucudur. Bu nedenle fotoağartma ile FDT'de etkili doz ölçümü sağlanmaktadır. Doz oranı ve fraksiyonu, FS mikro lokalizasyonuna karşı tümör parankimi, hücresel organel lokalizasyon etkileri veya lokal FDT hasarına karşı tüm vücut bağışıklık tepkisi gibi doğrusal olmayan yollarla katkı sağlamaktadır. Bu yöntemle yaşam

süresinin doğrudan ölçümü ile FDT sonucu biriken ürün dozunun tahmini sağlanabilmektedir [63-65,76].

Net (explicit) dozimetride FDT'nin üç bileşeninin her biri ayrı ayrı ölçülür ve ROS miktarının tahmini için dinamik bir modele dahil edilmektedir. Bu yöntemdeki ana hedeflerden biri invaziv prosedürler olmadan ölçülebilir parametreleri belirlemektir. Net dozimetrimin gerçekleştirilebilmesi için FS konsantrasyonu, temel durumdaki oksijen ve iletilen ışık miktarı bilinmelidir. Bu yöntemdeki ilk kritik adım dokudaki ışık dağılımını belirlemektir. Işık akış hızı izotropik bir dedektör kullanımı ile doğrudan ölçülebilir. FDT'de toplam ışık akış oranını belirlemek için doku optik özelliklerini göz önüne almak gerekmektedir. Bu yöntemde ikinci adım FS konsantrasyonunun ve dokudaki dağılımının ölçülmesidir. FS birikimi dokudan dokuya ve hastadan hastaya değişim göstermektedir. Bu nedenle FS konsantrasyonunun gerçek zamanlı izlenmesi en iyi terapötik FDT dozunun ayarı için kritiktir. Çoğu FS floresan olduğu için yaydıkları floresan ölçülerek konsantrasyonları belirlenebilmektedir. Floresan olmayan FS'lerin konsantrasyonlarını belirlemek için absorban spektroskopisi kullanılabilir. Bu yöntemdeki son adım doku oksijen seviyesinin ölçümüdür. Doku oksijen konsantrasyonu fotokimyasal oksijen tüketimi ve FDT sonucu vasküler yanıtı bağlı olarak zamana ve konuma göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle FDT'de yeterli oksijen sağlanabilmesi için doku oksijenasyonu gerçek zamanlı olarak izlenmelidir [63-65,76].

2.2.5. Kanserde FDT'nin etki mekanizması

Kanser tedavisinde kullanılan klinik olarak onaylanmış ilaçların sayısı son derece azdır. Bu nedenle yeni nesil FS maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. FDT'de kullanılan FS'ler çeşitli hücresel mekanizmalarla (reseptör aracılı fagositoz/endositoz, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü bağlanması, lipid bağlanması, tirozin kinaz/epidermal büyüme faktörü reseptörü yoluyla alım, difüzyon, biyolojik dağılım vb.) anti-kanser etki sağlamaktadır [37,39]. Bu kapsamda, FDT'nin anti-kanser etkisinde 3 temel mekanizma bulunmaktadır (Şekil 2.6) [77].



Şekil 2.6. Kanserde FDT ve ölüme neden olduğu mekanizmalar [77].

Bu mekanizmalar;

- a. FDT sonucu üretilmiş ROS'un kanser hücrelerini doğrudan etkisi: Bu etkide membranlar ve organeller gibi belirli hedeflerde geri dönüşümü olmayan bir hasar meydana gelmektedir. FDT'de kanser hücrelerinde yıkım programlanmış (apoptotik) veya programlanmamış (nekrotik) ölüm ile gerçekleşebilir. FDT'de yüksek ışık dozu uygulanması sonucu kanser hücrelerinde hızlı bir şekilde ablasyon görülmektedir. Selüler ve subselüler membran yıkımı hızlı bir şekilde gerçekleşirken hücre fonksiyonuyla uyumlu olmayan kalsiyum ve metabolik yan ürünler salınarak onarım fonksiyonu baskılanmaktadır. Bu olaya bağlı olarak mitokondriden sitokinlerin ve toksik kimyasalların salınması gibi çevre hücrelerde ölümcül etki veya bölgesel ve sistematik bir reaksiyon oluşabilmektedir. Ancak bu mekanizma ile FS'nin kanser hücreleri içinde homojen dağılmaması etkinliğini sınırlayabilir. Bunun yanı sıra doğrudan hedef hücrelerin ölümünü kısıtlayan bir diğer parametre hedef hücrelerdeki oksijen mevcudiyetidir. Çünkü FDT sırasında oksijenin fotokimyasal tüketiminden ve mikrovaskülatür üzerindeki ani etkisinden dolayı oksijen yoksunluğu meydana gelebilmektedir. Ek olarak, bu mekanizmada oluşan hasarın kapsamı ve hücre ölüm mekanizması FS tipine, FS konsantrasyonuna, FS subselüler lokalizasyonuna, uygulanan enerjiye ve kanser hücrelerinin direncine bağlı olarak değişmektedir [6,37,76].
- b. Anjiyogenez üzerine etkisi: Tümör hücrelerindeki canlılık damarlar tarafından sağlanan besin miktarına bağlı olduğundan kan damarlarının oluşumu kanser hücrelerinin veya konak hücrelerin ürettiği büyüme faktörlerine bağlıdır. Bu yüzden kanser hücrelerini besleyen damarların hedeflenmesi umut vaat eden bir tedavi yöntemidir. FDT kanser hücrelerine oksijen ve temel besinlerin

iletilmesine engel olarak vasküler hasara yol açmaktadır. Daha önce yapılmış çalışmalarda hematorporfirin türevlerinin ve porfirinin vasküler daralmaya, trombus oluşumuna ve tümör büyümesinde inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Bu etkilerin FDT'nin neden olduğu ROS oluşumuna ve hipoksiye bağlı olduğu düşünülmektedir [6,76].

- c. Kanser hücrelerine karşı bağışıklık sisteminin aktivasyonu: FDT inflamatuvar ve immün yanıtı indükleyerek bağışıklık sisteminin aktivasyonuna neden olmaktadır. 21. yüzyılın başlarında yapılmış olan çalışmalarda FDT ile hedef dokularda lenfosit, lökosit ve makrofaj infiltrasyonu olduğu ortaya konulmuştur. Sağlıklı ve kanserli dokular arasındaki inflamatuvar yanıt düzeyinde farklılıklar FDT'nin neden olduğu doku hasarı seçiciliğine katkıda bulunabilmektedir. İnflamatuvar oluşum sürecine vazoaktif maddeler, kompleman ve pıhtılaşma kaskadlarının bileşenleri, akut faz proteinleri, proteinazlar, peroksidazlar, ROS, lökosit kemoatraktanları, sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer immün düzenleyiciler gibi çeşitli faktörler aracılık etmektedir [6,76].

Bu mekanizmaların kanser hücrelerinde etkisinin temeli FS tipi ve dozu, FS uygulaması ve ışıma süresi, toplam ışık dozu, kanser hücrelerinin oksijen konsantrasyonu gibi bileşenlere bağlıdır. FS'leri uyarmak için uygulanan ışık dalga boyu, maksimum 10 mm kadar derinliğe etki ederek kanser dokusunda fotokimyasal olayları indüklemektedir. Bu nedenle FDT'nin endikasyonu küçük ve yüzeysel tümörlerle sınırlı olmasına rağmen, penetrasyon sağlıklı dokuyu fototoksisiteden korumaktadır. Günümüzde FDT, daha büyük palyatif tedaviler için cerrahi işlemler ve kemoterapi ile beraber kullanılabilir ve FDT, FDA tarafından onaylanan ilk ilaç-cihaz kombinasyonu olmasına rağmen klinikte kullanımı sınırlıdır [35, 39].

2.3. FDT ve Kemoterapi Kombin Tedavisi

FDT, kanser dahil olmak üzere birçok alanda umut vaat eden terapötik bir alandır. Kanser tedavisinde diğer geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında FDT bir dizi avantaj sunmaktadır [59,77]. Fotodinamik tedavinin avantajları şu şekilde sıralanmaktadır;

- Düşük yan etkiler
- Non-invaziv özellikte olma

- Kısa tedavi süresi
- Ayakta tedavi yöntemi
- Seçici hedefleme
- Aynı yerde birden fazla uygulama imkanı
- Daha düşük maliyetli olması
- Düşük sistemik toksisite
- Hasta tarafından iyi tolere edilebilme.

FDT, birçok hastalık için umut verici ve faydalı bir tedavi stratejisi olmasına rağmen, aşılması gereken sınırlamalara da sahiptir [59,77]. Bu sınırlamalar;

- Tedavi sonrası fotoduyarlılık
- Doku oksijenasyonu yetersizliği
- Mevcut teknoloji ile metastatik kanserleri tedavi etme zorluğu
- FS'lerin suda zayıf çözünürlüğü ve sınırlı penetrasyon derinliği.

Bu sınırlamaların üstesinden gelmenin bir yolu diğer tedavi yöntemleriyle kombin tedavi şeklinde uygulanmasıdır. Kanser tedavisinde farklı etki mekanizmalarına sahip kombin tedavilerinin kullanılması, tek bir tedaviye göre potansiyel avantajlar sunabilir. Bu amaçla, normal hücrelerde daha az yan etkiye neden olarak tek bir tedaviye kıyasla kanser hücrelerinde daha etkin bir tedavi seçeneği sağlanmasında kombin tedavi stratejileri önem kazanmaktadır. Kanser tedavisinde kemoterapinin dezavantajlarını azaltmak ve FDT'nin sınırlamalarının üstesinden gelmek için bu iki tedavi yöntemi kombin halinde uygulanabilmektedir [59,77].

Tablo 2.4.'te farklı kanser tiplerinin tedavisine yönelik kemoterapi ile FDT kombin çalışmaları özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Kaynakça
Hepatoselüler karsinoma (Hep-G2)	Doksorubisin	Laktobionik asit modifiyeli fikosiyenin	650 nm lazer, 1 W/cm ² , 5 dk	78
Oral skuamöz hücreli karsinoma	Dosetaksel, Sisplatin, Fluorourasil	5-ALA	635 nm LED, 100 J/cm ² , 100 mW/cm ²	79
Nazofarenks kanser hücreleri (CNE1, HNE1)	Sisplatin	Feoforbit	670 nm lazer, 0.3 W, 0.75 J, 2 dk	80
İnsan baş ve boyun kanseri hücreleri (AMC-HN3)	Karboplatin	Radaklorin	670 nm lazer, 0.9 J/cm ² , 0.5 W, 15 dk	81
Hepatoselüler karsinoma (Hep-G2)	Doksorubisin	Hemayoporfirin dihidroklorür	630 nm, 400 mW/cm ² , 100 ve 200 J/cm ² , 250 ve 500 sn	82
Rahim ağzı karsinom ve keratinosit hücreleri (SiHa, C33A, HaCat)	Sisplatin	Sodyum porfimeri (Photogem) ve MB	630 nm LED, 1.39 veya 2.76 J/ cm ² ve 660 nm LED ile 1.29, 2.56, 5.11 veya 12.9 J/cm ²	83
Melanom Hücreleri (UCT Mel-1, A375)	Dakarbazin	Hiperisin	561 nm lazer, 5 J/cm ² , 20 mW, 40 dk	84
Fare meme kanseri hücreleri (4T1)	Doksorubisin	Alüminyum klorür ftalosiyenin	630 nm lazer, 50 J/cm ² , 60 mW	85
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Doksorubisin	Klorin e6	670 nm lazer, 0.25 W/cm ² , 5 dk	86

Tablo 2.4. (Devamı) Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Kaynakça
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Doksorubisin	5-ALA	633 nm lazer, 0.25 W, 4 dk	87
Melanom hücreleri (Mel-Rm)	Fluorourasil	5-ALA	630 nm LED, 44.8 ± 2.7 mW/cm ² , 13 ve 26 J/cm ² , 5 ve 10 dk	88
Melanom hücreleri (SK-MEL-3)	Doksorubisin	Çinko ftalosiyanın	675 nm lazer, 5 J/cm ² ve 10 J/cm ² , 12 ve 50 sn	89
Primer akciğer kanserine sahip fareler	Gefitinib	5-ALA	660 nm lazer, 100 mW, 30 ve 60 sn	90
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Daunorubisin	Temoporfirin	630 nm lazer, 0.2 W/cm ² , 25 dk	91
Meme kanseri hücreleri (MCF-7, 4T1)	Banoxantrone (AQ4N)	Klorin e6	635 nm, 50 mW/cm ² , 5 dk	92
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Sisplatin	Indosiyanin yeşili (ICG)	805 nm lazer, 0.65 W, 25 J/cm ²	93
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (NCI-H1299)	Sisplatin	Sodyum porfimeri	510-590 nm halojen lamba, 6 mW/cm ² , 0.18-0.54 J/cm ²	94
Cilt karsinom hücreleri (SCC13, A431)	Metotreksat	5-ALA	395 nm LED, 4 mJ/cm ² , 0.1 mW/cm ²	95

Tablo 2.4. (Devamı) Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Referans
Fare sarkom kanser hücreleri (J774)	Siklofosamid	Verteporfin	690 nm LED, 100 mW/cm ² , 150 J/cm ² , 15 dk	96
Rahim ağzı kanseri hücreleri (NIH:OVCAR5)	Karboplatin	Verteporfin	690 nm lazer, 40 mW/cm ² ile 0.1, 1.0, 2.5 veya 5.0 J/cm ²	97
Adenokarsinom hücreleri (KB hücresi)	Paklitaksel	Sodyum porfimeri	671 nm lazer, 10 J/cm ² , 20 mW/cm ² , 500 s	98
Glioblastom ve akciğer kanseri hücreleri (U87MG, A549, 293T)	Doksorubisin	HPPH	671 nm lazer, 100 mW/cm ² , 5 dk	99
Pankreas kanseri hücreleri (AsPC-1, MIA PaCa-2)	Nab-paklitaksel	Verteporfin	690 nm lazer, 100 mW/cm ² , 50 J/cm ²	100
Fare meme kanseri hücreleri (4T1)	Dosetaksel	Alüminyum klorür ftalosiyanın	630 nm, 60 mW, 100, 500 ve 1000 mJ/cm ²	101
Küçük olmayan hücreli akciğer kanseri hücreleri (H1299, A549)	Gefitinib	5-ALA	630 nm lazer ile 2, 4, 6 ve 8 J/cm ²	102
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Gemsitabin	Porfirin	605 nm lazer, 18.75 J/cm ² , 10 dk	103
Fare melanom hücreleri (B16-F10)	Doksorubisin	Klorin e6	655 nm lazer, 1.0 W/cm ² , 10 dk	104

Tablo 2.4. (Devamı) Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Kaynakça
Meme kanseri hücreleri (MCF-7, MDA-MB-231)	Doksorubisin	Çinko ftalosiyanın	700 nm LED, 0.5 W/cm ² , 34 dk	105
İnsan karsinom hücre hatları (A427, BHY, KYSE70, RT4, SISO)	Sisplatin, karboplatin, oksiplatin	Temoporfin	640–660 nm LED, 1.8 J/cm ² , 3.0 mW/cm ²	106
Yumurtalık kanseri hücreleri (SKOV3)	Sisplatin	Klorin e6	660 nm lazer, 100 mW/cm ² , 10 dk	107
Karaciğer kanseri hücreleri (MH-22A)	Doksorubisin	Temoporfin	660 nm LED, 10 W/m ² , 12 kJ/m ² , 20 dk	108
Pankreas kanseri hücreleri (AsPC1, BxPC3, Capan1, Capan2 ve PANC1)	Gemsitabin	Verteporfin	690 nm lazer, 100 mW/cm ²	109
Pankreas kanseri hücreleri (PANC-1, MIA PaCa-2, and BXPC-3)	Gemsitabin	HPPH	665 nm lazer, 0.5 W/cm ² , 60 J/cm ² , 2 dk	110
Fare skuamöz hücreli karsinom hücreleri (SSC7)	Tirapazamin	Feoforbit	671 nm lazer, 0.637 W/cm ²	111

Tablo 2.4. (Devamı) Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Kaynakça
Pankreas kanseri hücreleri (PANC-1, MIA PaCa-2, and BXPC-3)	Gemcitabin	HPPH	665 nm lazer, 0.5 W/cm ² , 60 J/cm ² , 2 dk	110
Fare skuamöz hücreli karsinom hücreleri (SSC7)	Tirapazamin	Feoforbit	671 nm lazer, 0.637 W/cm ²	111
Fare melanom hücreleri (B16)	Doksorubisin	Klorin e6	690 nm lazer, 0.5 W/cm ² , 30 s	112
Adenokarsinom hücreleri (HeLa)	Karboplatin	Sodyum porfimeri	630 nm lazer, 2.5 mW/cm ² ile 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1,000 sn	113
Pankreas kanseri hücreleri (Capan2)	Gemcitabin	Hiperisin	20 W/30 floresan lamba, 3.15 mW/cm ² , 1 s	114
Adenokarsinom hücreleri (KB hücresi)	Paklitaksel	Porfirin	671 nm lazer, 10 J/cm ² , 20 mW/cm ² , 500 s	115
Hepatoselüler karsinoma (Hep-G2)	Paklitaksel	Toluidin mavisi	540 nm lazer, 100 mW/cm ² , 3 dk	116
Adenokarsinom hücreleri (HeLa)	Paklitaksel	Toluidin mavisi	Beyaz ışık, 100 mW/cm ² , 20 dk	117

Tablo 2.4. (Devamı) Farklı kanser tiplerinde farklı FS temelli FDT ve kemoterapinin kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar.

Hücre/Hasta Tipi	Kemoterapi Ajanı	PS	Işık Parametreleri	Kaynakça
Yumurtalık kanseri hücreleri (SKOV3)	Paklitaksel	Silikon ftalosiyanın	690 nm lazer, 5.6 mW/cm ² , 10 J/cm ² , 30 dk	118
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Doksorubisin	Klorin e6	660 nm lazer, 100 mW/cm ² , 10 dk	119
İnsan karsinom hücreleri (HeLa, PC3)	Doksorubisin	Porfirin	650 nm lazer, 0.2 W/cm ² , 30 dk	120
İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7)	Doksorubisin, apatinib	5-ALA	635 nm lazer, 10 mW/cm ² , 5 dk	121
İnsan pankreas kanseri hücreleri (SW1990)	Gefitinib	Sodyum porfimeri	630 nm lazer, 120 J/cm ² , 20 dk	122
Adenokarsinom hücreleri (HeLa)	Fluorourasil	Indosiyanın yeşili	808 nm lazer, 1.5 W/cm ² , 10 dk	123

Tablo 2.4'te özetlenen çalışmalar incelendiğinde farklı kanser tiplerinde farklı kemoterapi ajanları ile farklı FS'lerin kombin etkisi araştırıldığı ve tek başına uygulamaya göre daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında tedavi seçenekleri sınırlı olan ve agresif bir kanser türü olan TNMK'de, ilk kez kemoterapötik ajan olarak sisplatin ve 5-ALA/FDT'nin kombin etkisi araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sisplatin ve 5-ALA'nın birlikte kombin etkisinin incelenmesi mevcut tez çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- -80 °C derin dondurucu dolap (Haier, Çin)
- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Countless hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD)
- Distile su cihazı (Nüve, Türkiye)
- Diyot lazer (Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Türkiye)
- ELISA okuyucu cihazı (Allsheng, Çin)
- EVOS FL cell imaging system (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fiber optik kablo (Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Türkiye)
- İnkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- İnverted mikroskop (Best Scope, Çin)
- Muse cell analyzer cihazı (Millipore, Almanya)
- Orbital çalkalayıcı (Allsheng, Çin)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Sınıf II biyogüvenlik kabini (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.1.2. Kullanılan kimyasal sarf malzemeleri

- 5-ALA (Sigma Aldrich, ABD)
- Akridin orange (Sigma Aldrich, ABD)
- DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) boyası (Sigma Aldrich, ABD)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

- DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Millipore, Almanya)
- EGF (Epidermal büyüme faktörü) (Sigma Aldrich, ABD)
- FBS (Fetal sıgır serumu) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Hidrokortizon (Sigma Aldrich, ABD)
- İnsülin (Sigma Aldrich, ABD)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, ABD)
- MitoTracker (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Muse Anneksin V reaktifi (Millipore, Almanya)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- PBS (Fosfat tamponlu salin) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Penisilin/streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Sisplatin (Biovision, ABD)
- Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Tripsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- WST-1 reaktifi (Suda çözünen formazan 1) (Biovision, ABD)

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada gerçekleştirilen yöntemler başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

3.2.1. Hücre kültürü

Sisplatin ve FDT'nin kombin etkisinin belirlenmesi için triple negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri (ATCC, ABD, HTB-26) ve sağlıklı meme epitel hücre hattı MCF-10A hücreleri (ATCC, ABD, CRL-10317) kullanıldı. MDA-MB-231 hücreleri için 2 mM L-glutamin, % 10 Fetal sıgır serumu (FBS), % 1 penisilin ve streptomisin içeren DMEM; MCF-10A hücreleri için 1 mg/mL hidrokortizon, 100 mg/mL EGF, 10 mg/mL insülin, % 10 FBS, % 1 penisilin ile streptomisin içeren DMEM F-12 (Gibco) besiyeri kullanıldı.

MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A meme epitel hücreleri -80 °C derin dondurucudan alınarak 37 °C su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücreler 1200 rpm 5 dakika santirfuj edildikten sonra besiyeri içeren 75 cm²'lik flasklara ekildi ve 37

°C’de, % 5 CO₂’de inkübe edildi. Hücreler konfluens durumuna gelene kadar her gün inverted mikroskop ile gözlemlendi ve besiyerleri değiştirildi.

Hücreler konfluens durumuna ulaştıklarında flasktan besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Adhere hücrelerin yüzeyden kaldırılması için her bir flaska Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C’de 5 dk inkübe edildi. Inverted mikroskop ile kontrol edilen adhere hücreler yüzeyden kalktıktan sonra besiyeri eklenerek pipetör yardımıyla hücreler toplandı ve 15 mL falkonlara aktarıldı. Hücreler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellete yeni besiyeri eklenerek pipetaj işlemi uygulandı. Bu solüsyondan 10 µL alınarak, 10 µL tripan mavisi ile birlikte endopurfa eklendi ve Countless hücre sayım cihazı ile hücre sayısı belirlendi. Kalan hücrelerin stoklanması için 900 µL süspanse hücreye 100 µL DMSO eklenerek kroyotüplerde -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.2. İlaç uygulamaları

3.2.2.1. Sisplatin uygulaması

Sisplatin (Biovision, ABD) uygulaması için hücreler plakalara ekildikten sonra 24 saat boyunca 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 100 mg sisplatin stoğu 1 mL DMSO’da çözülürerek ana stok hazırlandı. 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin besiyeri değiştirildi ve ana stok besiyeri ile dilüe edilerek 1, 2.5 ve 5 µM konsantrasyonlardaki sisplatin eklendi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.2. 5-ALA/FDT uygulaması

FDT uygulaması için FS ajanı olarak 5-ALA (Sigma Aldrich, ABD) kullanıldı. 5-ALA distile suda çözülerek ana stok hazırlandı. Hücre plakalarına ekilen hücreler 24 saat boyunca 37 °C, % 5 CO₂’de inkübe edildikten sonra besiyeri FBS içermeyen besiyeri ile değiştirildi ve her kuyucuğa 1 mM 5-ALA eklenerek inkübasyona bırakıldı [123]. 4 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak FBS içeren besiyeri ile değiştirildi ve ısıtma protokölüne geçildi.

Bu çalışmada FDT uygulaması için 635 nm ± 3 nm dalga boyuna sahip diyot lazer (Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi) kullanıldı. DC'den 20 MHz'e kadar çeşitli darbe frekanslarında çalışabilen bu lazer ışık kaynağı ile 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluğuna sahip sürekli dalga uygulayan lazer ile ısıtma gerçekleştirildi. Uygulama süreleri sırasıyla 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye olarak belirlendi. Isıtma sonrası hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.

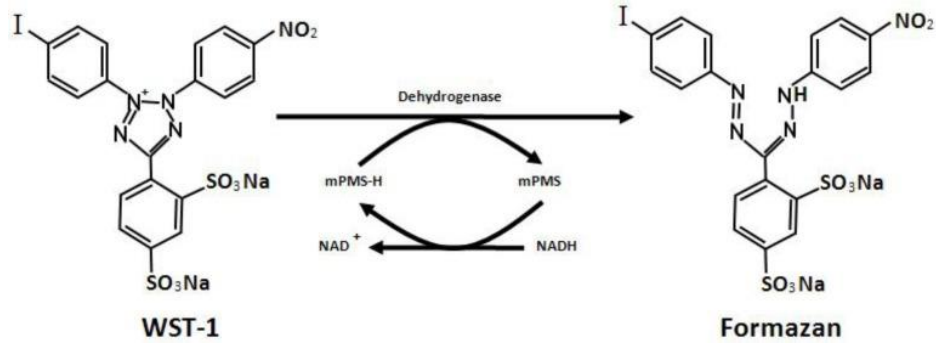
3.2.2.3. Kombin tedavi uygulaması

Sisplatin ve 5-ALA'nın kombin etkisinin belirlenmesi için iki deney grubu oluşturuldu. Birinci grupta 5-ALA ve sisplatin birlikte uygulandıktan sonra ışıma protokolüne geçildi. İkinci grupta ise, 5-ALA uygulanıp hücreler ısıtıldıktan sonra sisplatin uygulaması gerçekleştirildi. 5-ALA ve sisplatinin eş zamanlı uygulandığı grupta kombin tedavi uygulaması için hücreler plakalara ekilerek 37 °C, % 5 CO₂'de inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonunda hücrelerin besiyeri FBS'siz besiyeri ile değiştirildi ve 1 mM 5-ALA ile birlikte 2.5 ve 5 µM sisplatin eklenerek hücreler 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyeri FBS içeren besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluğuna sahip ışık ile sırasıyla 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye ısıtıldı. Işıtma sonrası hücrelere yeniden 2.5 ve 5 µM sisplatin uygulandı ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.

5-ALA ve sisplatinin sıralı uygulandığı grupta ise 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin besiyeri FBS'siz besiyeri değiştirilerek 1 mM 5-ALA uygulandı. 4 saat inkübasyon sonrasında besiyeri ortamı FBS içeren besiyeri ile değiştirildi ve hücreler 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluğundaki ışığa 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye maruz bırakıldı. Işıtma sonrası hücrelere 2.5 ve 5 µM sisplatin eklenerek hücreler 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3. WST-1 analizi ile hücre canlılığının belirlenmesi

Sisplatin ve FDT'nin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlenmesi için WST-boyası kullanıldı. WST-1 testi, (2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfofenil) -2 H tetrazolyum monosodyum tuzu) hücrelerin proliferasyon ve canlılık miktarını ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir analiz yöntemidir (Şekil 3.1). Bu testte tetrazolyum tuzları, bir elektron alıcısının varlığında mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından formazana dönüştürülür. Reaksiyon, inkübasyon süresi boyunca hücre kültüründeki mitokondriyal dehidrojenaz miktarı ile doğru orantılı bir renk değişikliği üretmektedir. Bu nedenle, WST-1 boyası hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmektedir [124-126].



Şekil 3.1. WST-1 boyasının formazana dönüşümü [126].

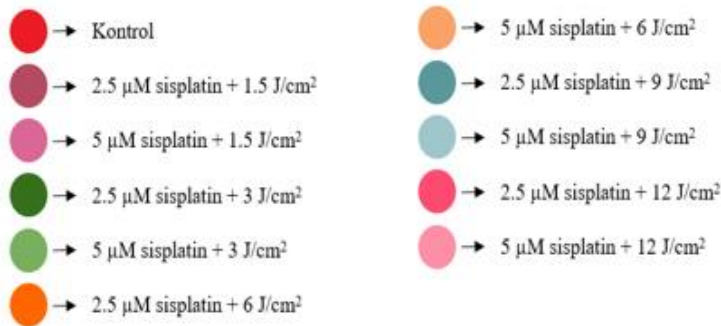
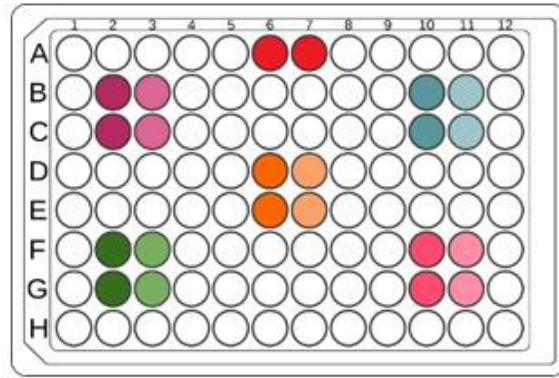
Sisplatinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek için 96 kuyucuklu plakaya 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelere belirlenen dozlarda sisplatin uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücrelere 10 μL WST-1 reaktifi (Biovision, ABD) eklenerek 45 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından, hücreler ELISA okuyucu cihazı (Allsheng, Çin) ile 450 nm absorbans ile ölçüm alınarak hücrelerdeki canlılık miktarı tayin edildi.

5-ALA'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu plakaya 2×10^4 hücre/kuyucuk ekildi ve bir gece 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatöre bırakıldı. Hücrelere 5-ALA uygulamadan önce besi yerleri FBS'siz besiyeri ile değiştirildi ve 1 mM 5-ALA uygulandı. 4 saat 5-ALA ile inkübe edilen hücrelerin besiyeri FBS içeren besiyeri ile değiştirildikten sonra 635 nm dalga boyundaki ışık 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunlukları ile 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye ısıtma protokolü gerçekleştirildi. Isıtma sonrasında hücreler 24 saat inkübe edildi ve hücrelere 10 μL WST-1 eklendi ve 45 dakika karanlıkta inkübasyondan sonra 450 nm'de ELISA okuyucu cihazı ile ölçüm alındı.

Sisplatin ile 5-ALA'nın kombin etkisini belirlenmesi için 96 kuyucuklu plakaya 2×10^4 hücre/kuyucuk ekim yapıldı. Sisplatin ve 5-ALA'nın eş zamanlı uygulandığı grup için 24 saat inkübe edilen hücrelerin besiyeri FBS içermeyen besiyeri ile değiştirilerek 1 mM 5-ALA ve 2.5, 5 ve 10 μM sisplatin uygulandı. 4 saat boyunca 37°C ve % 5 CO_2 'de inkübasyon tamamlanınca hücrelerin besiyeri FBS içeren taze besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki 635 nm dalga boyuna sahip lazer ışığı ile 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye ısıtıldı. Isıtma sonrası hücrelere yeniden sisplatin eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi

tamamlandığında hücrelere 10 µL WST-1 reaktifi eklenerek 45 dakika karanlıkta inkübe edildi ve 450 nm absorbansta ölçüm gerçekleştirildi.

Sisplatin ve 5-ALA'nın sıralı uygulandığı kombin grupta için ise hücrelere 1 mM 5-ALA uygulandı ve 4 saat inkübasyon sonrası besiyeri FBS içeren besiyeri ile tekrar değiştirildi. Hücrelere sırasıyla 50, 100, 200, 300 ve 400 saniye boyunca 635 nm dalga boyunda 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluklarındaki ışık uygulandı. Işıtma sonrası hücrelere 2.5, 5 ve 10 µM dozlarındaki sisplatin eklenerek inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücrelere 10 µL WST-1 reaktifi eklenerek 45 dakika 37 °C, % 5 CO₂ ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ELISA okuyucu cihaz kullanılarak 450 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Kombin tedavide kullanılan plakaların düzeneği Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

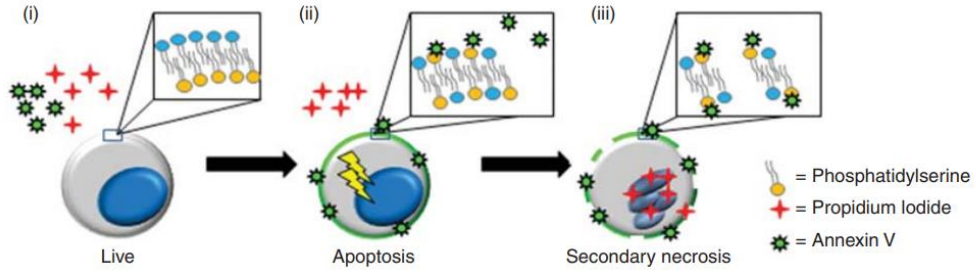


Şekil 3.2. 1 mM 5-ALA ile 2.5 ve 5 µM sisplatinin kombin etkisinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin şematize edilmesi.

3.2.4. Anneksin V yöntemi ile apoptozun belirlenmesi

Hücrelerde meydana gelen apoptotik ölümün belirlenmesi için anneksin V boyama yöntemi kullanıldı. Anneksin V, hücre zarının sitoplazmik kısmında bulunan fosfatidilserine sıkıca bağlanan kalsiyum bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir.

Hücre apoptoza uğradığında fosfatidilserin hücre zarının dışına çıkmaktadır ve Annexin V fosfatidilserine bağlanmaktadır (Şekil 3.3). Daha sonra FTIC gibi floresan maddeler kullanılarak Annexin V işaretlenmektedir ve ölçüm alınmaktadır. Hücrelerin boyanmasına göre erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz miktarı tayin edilmektedir [127-129].



Şekil 3.3. Annexin V çalışma prensibi [129].

Annexin V protokolü için 12 kuyucuklu plakaya 1×10^5 hücre/kuyucuk hücre ekildikten sonra 37°C , % 5 CO_2 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen sadece sispaltin ($2.5 \mu\text{M}$), sadece 5-ALA (1 mM, 6 ve 9 J/cm^2) ve kombin grup (eş zamanlı $2.5 \mu\text{M}$ sispaltin ve 1 mM 5-ALA, 6 ve 9 J/cm^2) uygulamaları ilaç uygulama prosedürlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Hücre pelletlerine 1 mL PBS eklenip hücreler tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonrası PBS atılarak sonra 100 μL Muse Annexin V (Millipore, Almanya) boyası eklendi. 30 dakika karanlıkta inkübe edilen hücrelerin apoptoz miktarı Muse Cell Analyzer (Millipore, Almanya) cihazı kullanılarak tayin edildi.

3.2.5. Akridin orange (AO) boyaması

Hücrelerde meydana gelen apoptotik ölümün görüntülenmesi için AO boyaması yapıldı. AO nükleik asitlere bağlanan florokromotik bir boya türüdür. AO RNA ve tek sarmallı DNA'yı turuncuya boyarken çift sarmallı DNA'yı yeşil boyamaktadır [130,131].

AO boyaması için 12 kuyucuklu plakaya her bir kuyu için 5×10^5 hücre ekildi. 24 saat inkübasyon sonrası WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen sadece sispaltin ($2.5 \mu\text{M}$), sadece 5-ALA (1 mM, 6 ve 9 J/cm^2) ve kombin grup (eş zamanlı $2.5 \mu\text{M}$ sispaltin ve 1 mM 5-ALA, 6 ve 9 J/cm^2) uygulamaları ilaç uygulama prosedürlerinde belirtildiği

şekilde gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler % 4 paraformaldehit eklenerek fikse edildi. Sonrasında hücreler 5 dakika arayla 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 100 mg/mL AO (Sigma Aldrich) eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve ardından PBS ile 3 kere yıkandı. Daha sonra hücreler EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile görüntülendi.

3.2.6. Mitokondri boyaması

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin mitokondrilerin morfolojik olarak görüntülenmesi için MitoTracker kullanıldı. 12 kuyucuklu plakaya her bir kuyu için 5×10^5 hücre ekildi. 24 saat inkübasyon sonrası WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen sadece sisplatin ($2.5 \mu\text{M}$), sadece 5-ALA (1 mM, 6 ve 9 J/cm^2) ve kombin grup (eş zamanlı $2.5 \mu\text{M}$ sisplatin ve 1 mM 5-ALA, 6 ve 9 J/cm^2) uygulamaları ilaç uygulama prosedürlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Hücreler 37°C ve % 5 CO_2 'de 24 saat inkübe edildikten sonra, hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelere 100 nM MitoTracker (Thermo Fisher Scientific, ABD) solüsyonu eklendi, 45 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücreler % 4 paraformaldehid ile fikse edilerek PBS ile yıkandı. Nükleuslar DAPI boyası ile boyandıktan sonra, EVOS FL Cell Imaging System kullanılarak görüntülendi.

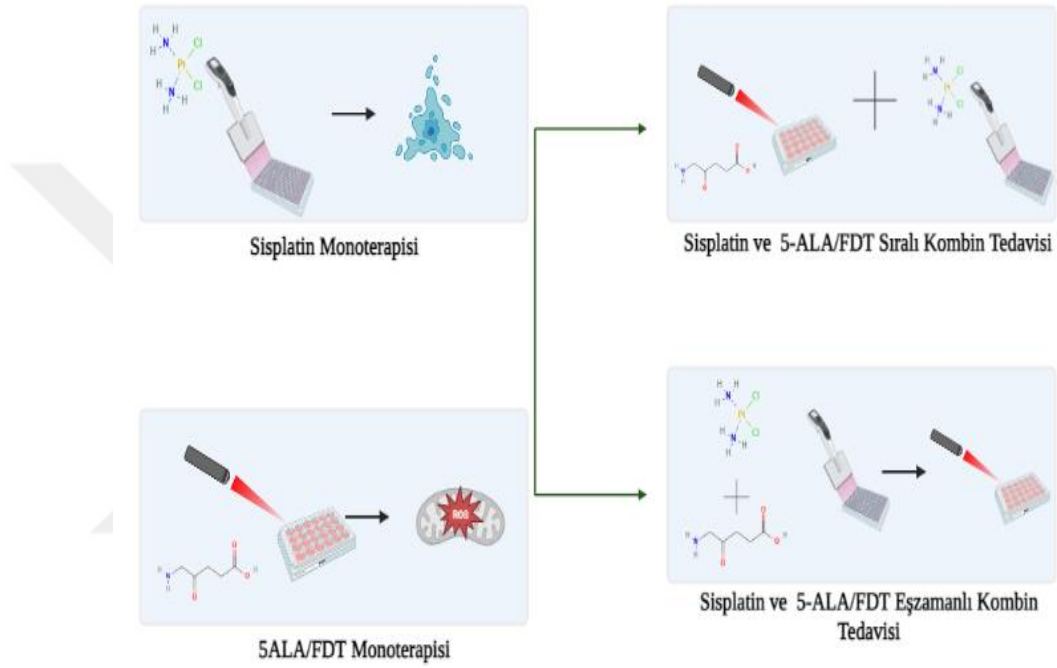
3.2.7. DAPI boyaması

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve kombin tedavi sonrası meydana gelen nükleer hasarı görüntülemek için DAPI boyaması gerçekleştirildi. Inkübasyon sonrası WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen sadece sisplatin ($2.5 \mu\text{M}$), sadece 5-ALA (1 mM, 6 ve 9 J/cm^2) ve kombin grup (eş zamanlı $2.5 \mu\text{M}$ sisplatin ve 1 mM 5-ALA, 6 ve 9 J/cm^2) uygulamaları ilaç uygulama prosedürlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler % 4 paraformaldehid ile 30 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler 5 dakika aralıklarla 3 kere olacak şekilde PBS ile yıkandı ve hücreler 5 dakika boyunca 5 mg/mL yoğunluğundaki DAPI boyası (Sigma Aldrich) ile inkübe edildi. Boyama sonrası hücreler tekrardan PBS ile yıkandı ve EVOS FL Cell Imaging System ile görüntülendi.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Bu çalışmada istatistiksel analiz için SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ve GraphPad Prism 6 (La Jolla, ABD) kullanıldı. Bütün deneylerde 3 tekrar

gerçekleştirildi ve ortalama standart sapma hesaplandı. Ayrıca, çoklu karşılaştırmalar için Post-hoc Tukey testi ile tek yönlü ANOVA analizi kullanıldı, $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Kombin etkinin istatistiksel değerlendirilmesi için CompuSyn programı kullanıldı [132]. Bu analiz sonucunda kombinasyon indeksi (CI) < 1 olanlar sinerjik etkili, CI = 1 bağımlı, CI > 1 olanlar antagonist etkili kabul edildi. Tez çalışmasında gerçekleştirilen deney grupları Şekil 3.4’te özetlenmiştir.

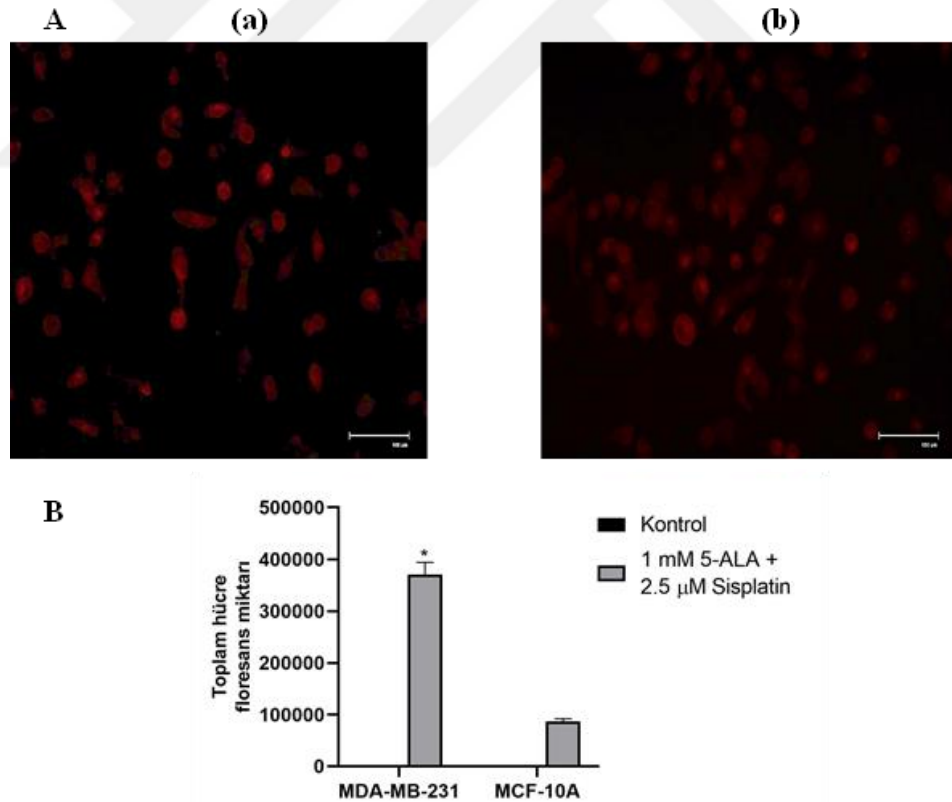


Şekil 3.4. Sisplatin ve 5-ALA/FDT’nin kombin uygulama protokolü (Created in BioRender.com).

4. BULGULAR

4.1. MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücrelerindeki İntraselüler PpIX Miktar Tayini

Eş zamanlı 2.5 μ M sisplatin ve 1 mM 5-ALA uygulanan hücrelerde intraselüler PpIX miktarı 628 $\pm$ 40 nm kırmızı filtrede görüntülenmiştir. Şekil 4.1’de gösterildiği üzere kontrol grubu ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücrelerinde (Şekil 4.1.A (a)) ve MCF-10A hücrelerinde (Şekil 4.1.A (b)) biriken intraselüler PpIX miktarında artış belirlenmiştir. Ayrıca, floresans intraselüler PpIX miktarı kontrol grubuna göre kıyasla 2.5 μ M sisplatin ve 1 mM 5-ALA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 370.559 $\pm$ 233.151 iken, MCF-10A hücrelerinde 86.404 $\pm$ 55.206 olarak belirlenmiştir ($p<0.05^*$, Şekil 4.1.B).



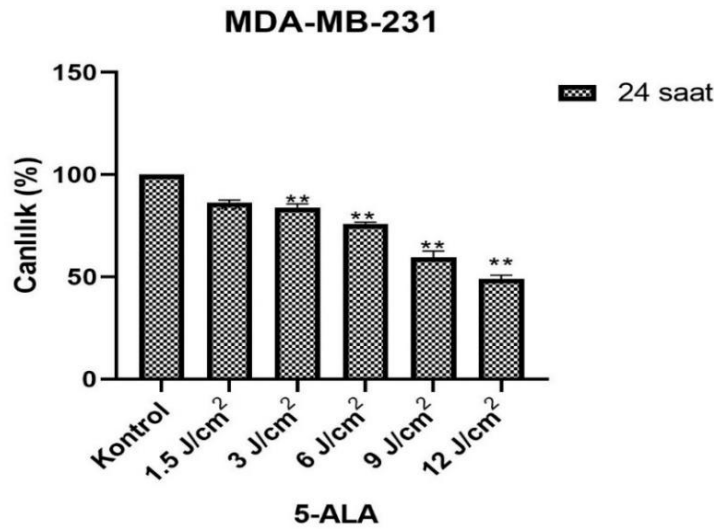
Şekil 4.1. (A) Eş zamanlı 2.5 μ M sisplatin ve 1 mM 5-ALA uygulanan hücrelerde intraselüler PpIX miktarlarının mikroskop görüntüsü (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-10A hücreleri. (B) Hücrelerde intraselüler floresans PpIX miktarının istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.05^*$).

4.2. 5-ALA/FDT, Sisplatin ve Kombin Tedavi Uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücrelerinde Neden Olduğu Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

5-ALA/FDT ve sisplatin monoterapisinin ve kombin uygulamasının sitotoksik etkisini belirlemek için WST-1 analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. 5-ALA/FDT'nin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi

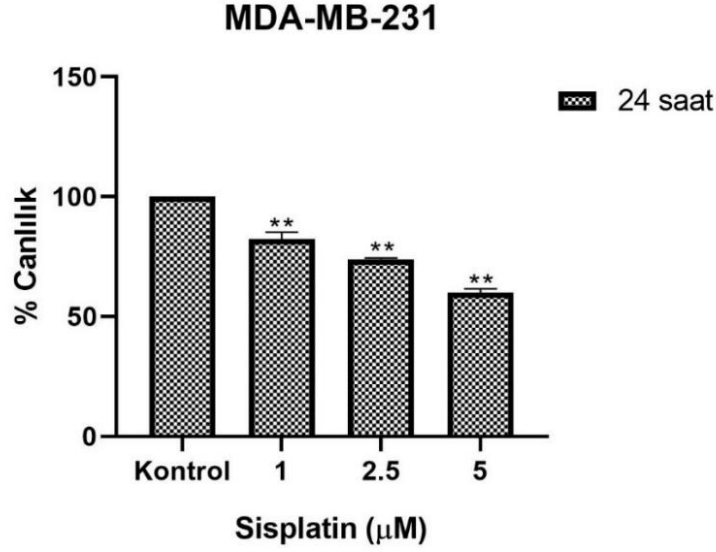
5-ALA/FDT monoterapisinin MDA-MB-231 üzerinde sitotoksik etkilerini belirlemek için hücrelere 1 mM 5-ALA uygulanıp 4 saat inkübe edildikten sonra hücreler 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğuna sahip 635 nm diyot lazer ile ısıtıldı. FDT uygulaması sonrası gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda MDA-MB-231 hücrelerindeki canlılık oranı sırasıyla % 86.47±1.12, % 83.93±1.80, % 75.97±0.86, % 59.55±3.13 ve % 48.96±1.79 olarak belirlenmiş olup, hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdiği saptanmıştır (p<0.01**, Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücrelerinde 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).

4.2.2. Sisplatinin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi

24 saat boyunca 1 µM, 2.5 µM ve 5 µM konsantrasyonlarında sisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık oranları sırasıyla % 82.25±2.89, % 73.96±0.48 ve % 59.96±1.54 olarak belirlenmiştir. WST-1 analizi sonucunda elde edilen verilere göre sisplatin konsantrasyonunun artmasıyla hücrelerdeki canlılık oranının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (p<0.01**, Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$).

4.2.3. 5-ALA/FDT ve sisplatin kombin tedavisinin MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi

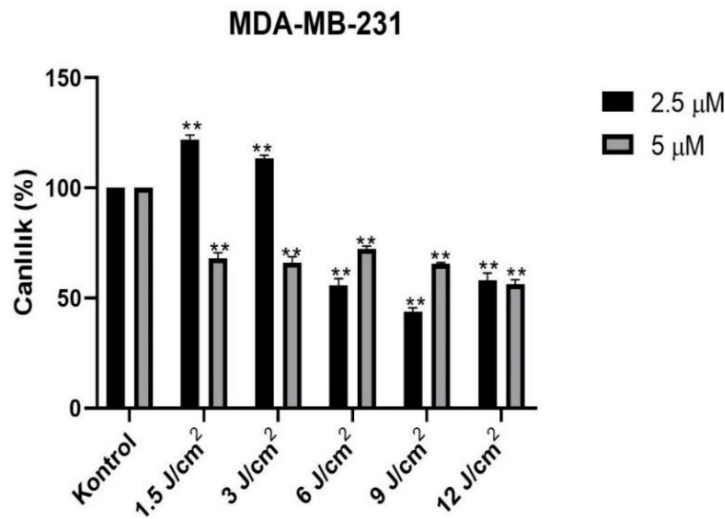
4.2.3.1. 5-ALA/FDT ışıması sonrasında sisplatin sıralı uygulamasının sitotoksik etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinde 5-ALA/FDT ışıması sonrasında sisplatin sıralı uygulamasının sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.4'te sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerine 1 mM 5-ALA uygulanıp 4 saat inkübasyon sonrasında 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğundaki lazer ile ışıma gerçekleştirilip hücrelere 2.5 µM ve 5 µM sisplatin uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2.5 µM sisplatin monoterapisi uygulanan grupta canlılık miktarı % 73.96±0.48 iken, 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğundaki ışıma sonrasında 2.5 µM sisplatin uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla % 128.05±2.60, % 128.12±0.12, % 90.99±3.84, % 77.80±0.99 ve % 76.51±2.57 olarak belirlenmiştir. Sıralı kombin tedavide kontrol grubu ile kıyaslandığında 5-ALA uygulanan hücrelerde 1.5 J/cm² ve 3 J/cm² enerji yoğunluğunda FDT ışıması sonrasında 2.5 µM sisplatin sıralı tedavisi uygulandığında hücre canlılık oranlarında artış gözlemlenirken, 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğundaki ışıma yapılan hücrelerde 2.5 µM sisplatin sıralı tedavisi uygulandığında hücre canlılığında istatistiksel olarak azalma tespit edilmiştir ($p<0.01^{**}$). Ancak, sisplatin ve 5-ALA/FDT monoterapi uygulamalarının, 5-

ALA/FDT sonrası sisplatin sıralı kombin uygulamasına kıyasla hücrelerde daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, 5-ALA uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğundaki ışırma sonrasında 5 µM sisplatin sıralı tedavisi uygulandığında canlılık oranları sırasıyla % 128.23±2.68, % 127.35±1.74, % 107.61±1.36, % 91.12±1.30 ve % 87.39±1.09 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırma sonrası 5 µM sisplatin sıralı tedavisi uygulanan hücrelerde canlılık artmasına rağmen, 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırmanın gerçekleştirildiği hücrelerde canlılığının istatistiksel olarak anlamlı azaldığı analiz edilmiştir (p<0.01**). Ancak, sıralı kombin tedavinin 5 µM sisplatin ve 5-ALA/FDT monotetapi uygulamalarına göre MDA-MB-231 hücrelerinde etkin olmadığı tespit edilmiştir.



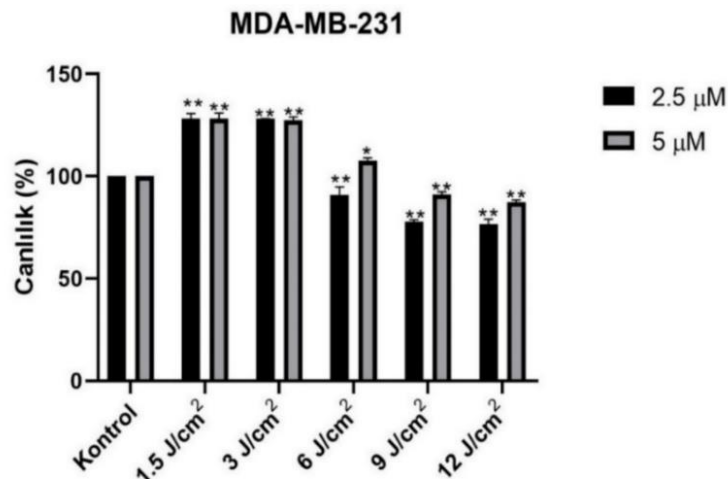
Şekil 4.4. 5-ALA/FDT uygulaması sonrasında sıralı sisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi (p<0.01**).

4.2.3.2. 5-ALA/FDT ve sisplatin eş zamanlı kombin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisi

5-ALA/FDT ve sisplatin eş zamanlı kombin uygulamasının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği WST-1 analizi ile belirlenmiştir ve elde edilen bulgular Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücreleri 1 mM 5-ALA ve 2.5 µM veya 5 µM sisplatin ile 4 saat boyunca inkübe edildikten sonra, 1.5 J/cm², 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm² ve 12 J/cm² enerji yoğunluklarındaki 635 nm dalga boyuna sahip ışık ile ışırma gerçekleştirilmiş olup,

sonrasında 24 saat boyunca 2.5 ve 5 μM sisplatin uygulaması ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gerçekleştirilen WST-1 analiziyle 2.5 μM sisplatin ile birlikte 5-ALA uygulanan hücrelerde 1.5 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 6 J/cm^2 , 9 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki ışıma sonrasında canlılık yüzdeleri sırasıyla % 121.89 $\pm$ 2.03, % 113.34 $\pm$ 1.46, % 55.77 $\pm$ 3.00, % 43.83 $\pm$ 1.72 ve % 58.02 $\pm$ 3.23 olarak belirlenmiştir. 2.5 μM sisplatin ile 1.5 J/cm^2 ve 3 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışıma sonrasında hücre canlılığında artış gözlemlenmesine rağmen, 6 J/cm^2 , 9 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki ışıma sonrasında kontrol grubuna kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.01^{**}$). MDA-MB-231 hücrelerinde en düşük hücre canlılık oranı 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde 9 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki ışıma sonucunda analiz edilmiştir. Sonuç olarak, TNMK hücrelerinde 5-ALA/FDT ve sisplatinin eş zamanlı kombin tedavisinin 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluklarında ışıma sonrasında sisplatin ve 5-ALA/FDT monoterapilerine kıyasla daha etkin olduğu analiz edilmiştir. Ayrıca, 5 μM sisplatin ile birlikte 5-ALA uygulanan hücrelerde 1.5 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 6 J/cm^2 , 9 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki ışıma sonrasında canlılık yüzdeleri sırasıyla % 67.93 $\pm$ 2.68, % 66.01 $\pm$ 2.65, % 72.9 $\pm$ 1.33, % 65.50 $\pm$ 0.60 ve % 56.16 $\pm$ 2.14 olarak analiz edilmiştir ($p<0.05^*$). Kontrol grubuna kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı 5 μM sisplatin ile birlikte 12 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki ışıma sonrasında tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Eş zamanlı 5-ALA/FDT ve Sisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).

Ayrıca, 5-ALA/FDT ve sisplatin eş zamanlı kombin tedavisinin MDA-MB-231 hücrelerinde kombin etki düzeyinin değerlendirilmesi için Compusyn yazılımı (ComboSyn Inc, ABD) ile kombinasyon indekslerini (CI) belirlenmiş ve elde edilen CI değerleri Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1.’de belirtildiği üzere, 2.5 μM sisplatin ile 5-ALA uygulanan hücrelerde 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluklarında gerçekleştirilen FDT’nin sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlenmesine rağmen ($\text{CI}<1$), 2.5 μM sisplatin ile 5-ALA uygulanan hücrelerde 1.5 J/cm^2 , 3 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki ışırma sonrasında antagonistik etkinin olduğu tespit edilmiştir ($\text{CI}>1$). 5 μM sisplatin ile eş zamanlı gerçekleştirilen FDT kombin tedavisinin ise bütün enerji yoğunluklarında MDA-MB-231 hücrelerinde antagonistik etkiye neden olduğu analiz edilmiştir.

Tablo 4.1. Sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisi sonucu elde edilen CI değerleri.

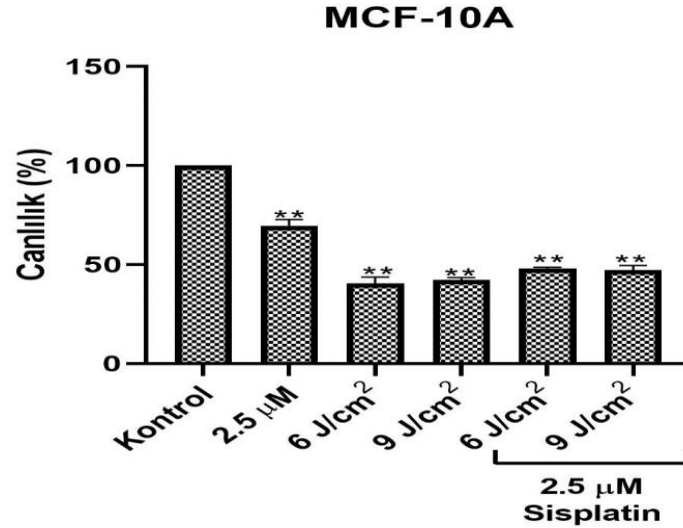
Sisplatin	2.5 μM	5 μM
CI at 1.5 J/cm^2	762.92	1.68
CI at 3 J/cm^2	957.64	1.74
CI at 6 J/cm^2	0.93	2.97
CI at 9 J/cm^2	0.71	2.52
CI at 12 J/cm^2	1.62	1.91

4.2.3.3. 5-ALA/FDT ile sisplatin eş zamanlı kombin uygulanmasının MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi

MDA-MB-231 hücreleri için WST-1 analizi sonucunda belirlenen etkin dozların kontrol hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, WST-1 analizi ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

MCF-10A hücrelerindeki 2.5 μM sisplatin monoterapisi uygulanan grupta canlılık oranı % 69.64 $\pm$ 3.15 iken, 5-ALA uygulanan hücrelerde 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki ışırma sonrasında sırasıyla canlılığın % 40.54 $\pm$ 3.19 ve % 42.22 $\pm$ 1.23’e azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01^{**}$). 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 1 mM 5-ALA uygulanan hücrelerde 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluklarındaki FDT ışırması sonrasında hücre canlılığının sırasıyla % 48.10 $\pm$ 0.55 ve % 47.25 $\pm$ 2.52 azaldığı analiz

edildi ($p<0.01^{**}$). Sonuç olarak, MCF-10A hücrelerinde 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 ışına sonrasında, 5-ALA/FDT monoterapi protokolüne göre canlılık oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Eş zamanlı 5-ALA/FDT ve sisplatin uygulanan MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$).

4.3. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Eş Zamanlı Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Apoptozun Değerlendirilmesi

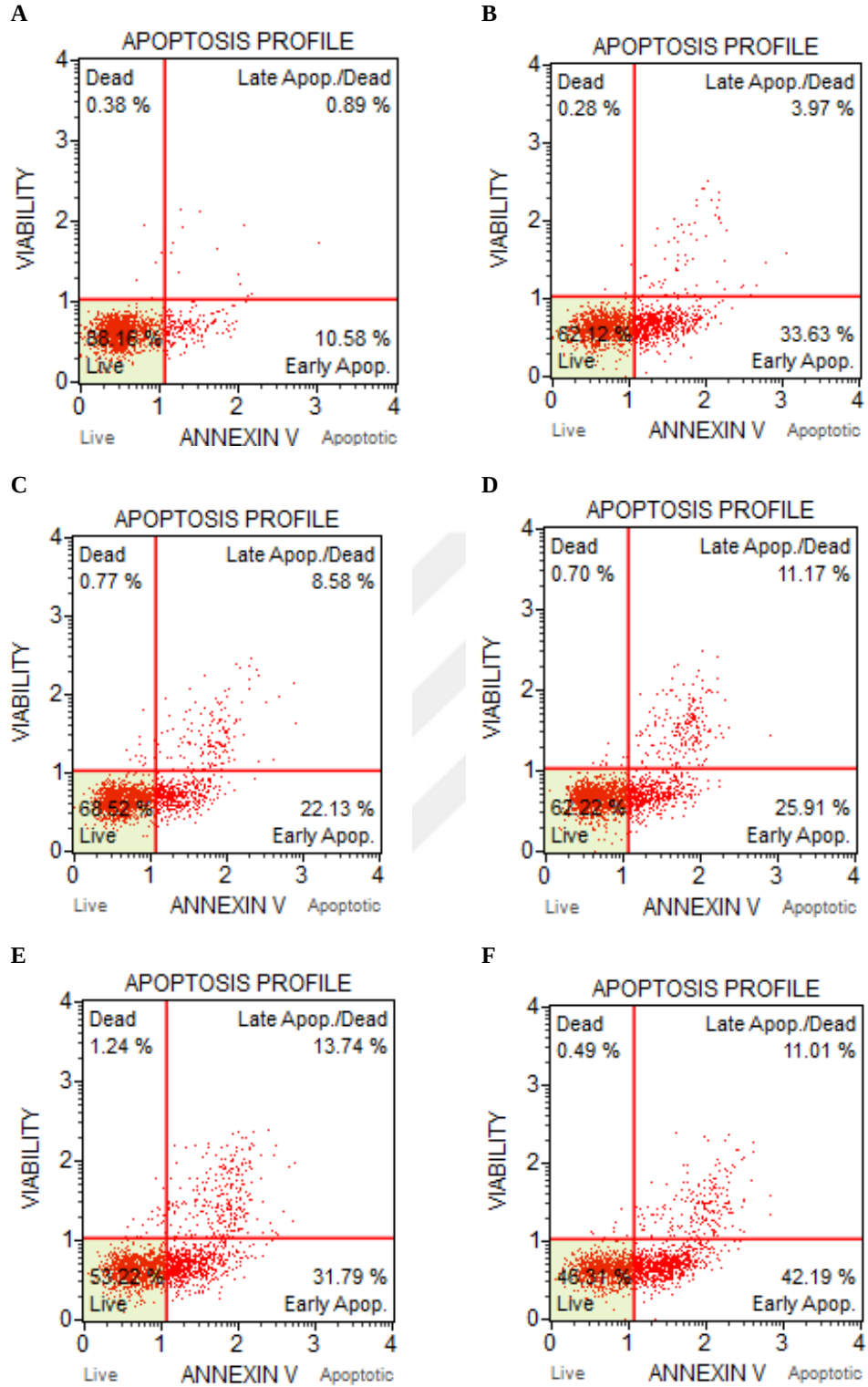
MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde sadece sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin uygulamasının neden olduğu apoptoz miktarını tayin etmek amacıyla gerçekleştirilen Annexin V analizinin sonuçları Şekil 4.7 - 4.9'da sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerinde 2.5 μM sisplatin monoterapisi (% 37.88) ve 5-ALA/FDT monoterapisi uygulaması sonrasında 6 J/cm^2 (% 31.48) ve 9 J/cm^2 (% 37.78) enerji yoğunluklarındaki FDT uygulamasına göre, eş zamanlı 2.5 μM sisplatin ile 5-ALA uygulaması sonrasında 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluklarında ışına uygulanan hücrelerde toplam apoptotik hücre miktarının sırasıyla % 46.78 ve % 53.6'a arttığı analiz edilmiştir (Şekil 4.7). Kontrol grubuna kıyasla sadece sisplatin ve 5-ALA/FDT uygulanan hücelere göre kombin sisplatin ve 5-ALA/FDT uygulanan hücrelerde daha fazla apoptotik ölüme yol açtığı tespit edilmiştir ($p<0.01^{**}$, Şekil 4.9).

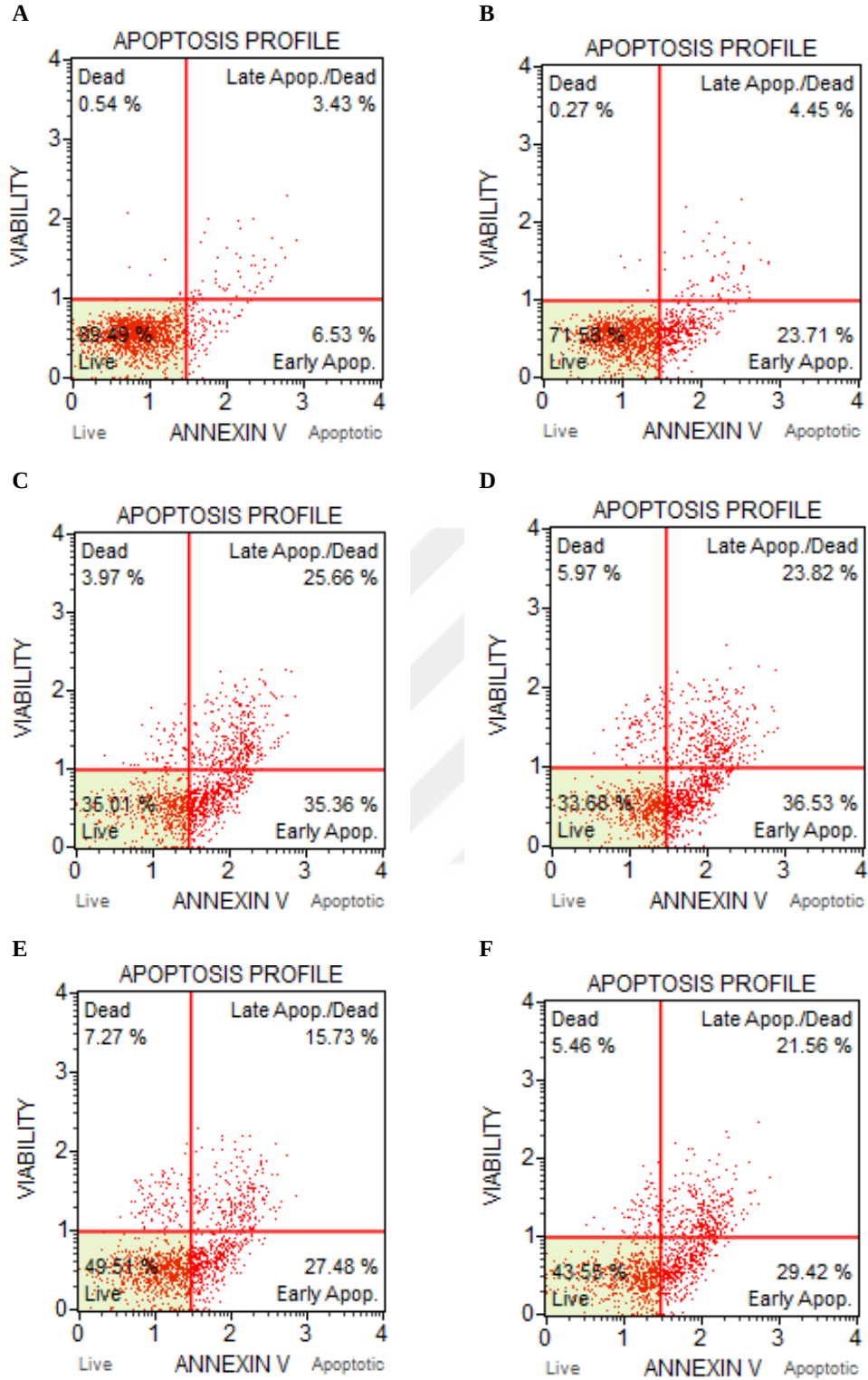
MCF-10A hücrelerinde 2.5 μM sisplatin monoterapisi uygulanan hücrelerde toplam apoptoz miktarı % 28.42 iken, 5-ALA/FDT uygulanan hücrelerde 6 J/cm^2 ve 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışına sonrasında apoptoz miktarı sırasıyla % 64.99 ve % 66.32

olarak analiz edilmiştir. Kombin tedavi grubunda ise 2.5 μ M sisplatin ile eş zamanlı 6 J/cm² ve 9 J/cm² enerji yoğunluğundaki ısıtma ile gerçekleştirilen 5-ALA/FDT sonucunda toplam apoptotik hücre miktarı sırasıyla % 50.49 ve % 56.45 olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.8). Kontrol grubuna kıyasla tedavi uygulanan hücrelerde apoptoz miktarı artarken, sisplatin monoterapisi ve kombin tedavi uygulanan hücrelerde apoptoz miktarının 5-ALA/PDT monoterapi grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir (p<0.01**, Şekil 4.9).

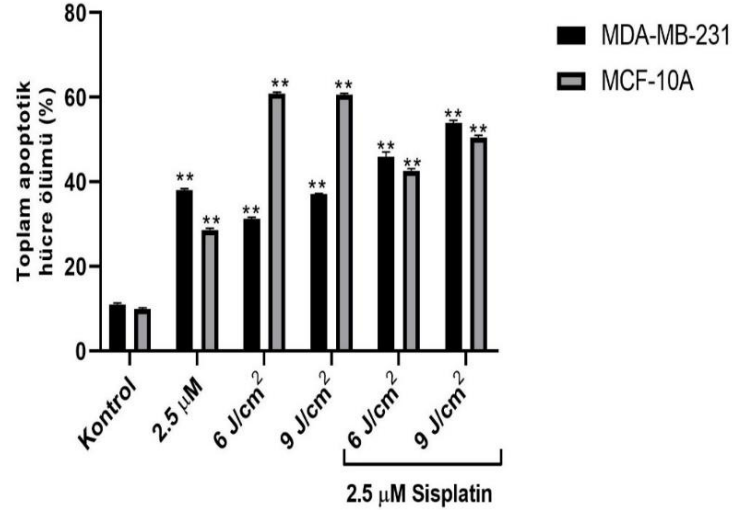




Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücrelerinde sadece sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda apoptoz miktarının değerlendirilmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μ M sisplatin monoterapisi, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırma, 2.5 μ M sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırma sonrasında canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre oranları.



Şekil 4.8. MCF-10A hücrelerinde sadece sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda apoptoz miktarının değerlendirilmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μ M sisplatin monoterapisi, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 μ M sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma sonrasında canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre oranları.



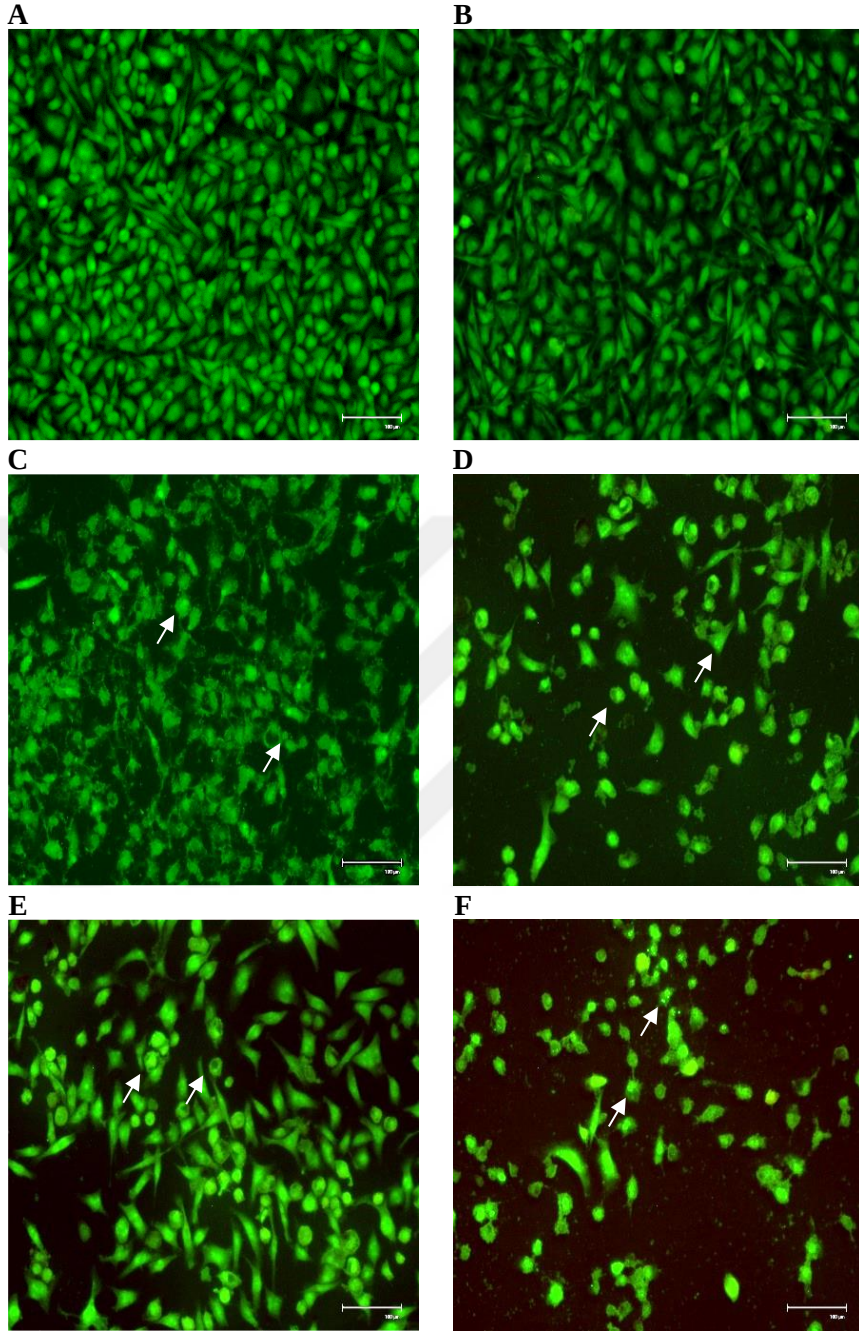
Şekil 4.9. Sisplatin monoterapisi, 5-ALA/FDT monoterapisi ve eş zamanlı kombin uygulama sonrasında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde toplam apoptotik hücre ölümünün istatistiksel karşılaştırılması ($p < 0.01^{**}$).

4.4. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Eş Zamanlı Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Değerlendirilmesi

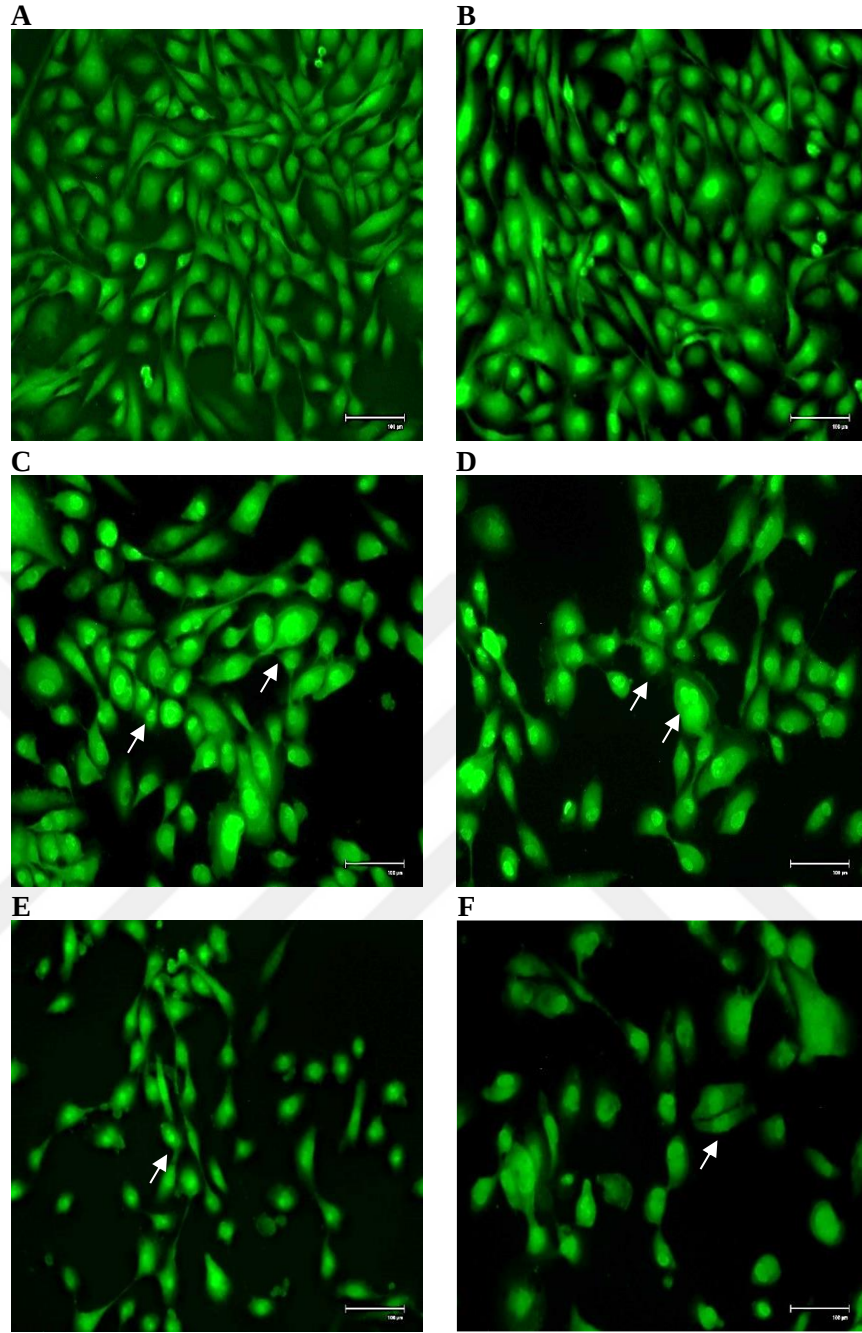
Sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavinin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki morfolojik etkisini belirlemek için gerçekleştirilen AO boyamasının sonuçları Şekil 4.10 ve 4.11’de sunulmuştur.

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki kontrol grubu ile kıyaslandığında sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulanan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve nükleer parçalanma gözlemlenmiştir. Ancak, MDA-MB-231 hücrelerinde sadece 5-ALA ve sisplatin uygulanan hücrelere göre özellikle 2.5 µM sisplatin ile 5-ALA uygulaması sonrasında 9 J/cm² enerji yoğunluklarında ışıma uygulanan hücrelerde daha belirgin nükleer parçalanma, hücre-hücre bağlantılarında kopma ve hücre hacminde azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).

MCF-10A hücrelerinde sisplatin veya 5-ALA/FDT monoterapileri uygulanan hücrelere göre eş zamanlı kombin tedavi uygulanan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve nükleer parçalanmanın daha az olduğu belirlenmiştir. Ancak, 5-ALA/FDT monoterapisi, sisplatin monoterapisi veya kombin uygulamasının hücrelerde nükleer hasara neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücrelerinde cisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μM cisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm^2 , D) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışık, 2.5 μM cisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm^2 ve F) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışık.



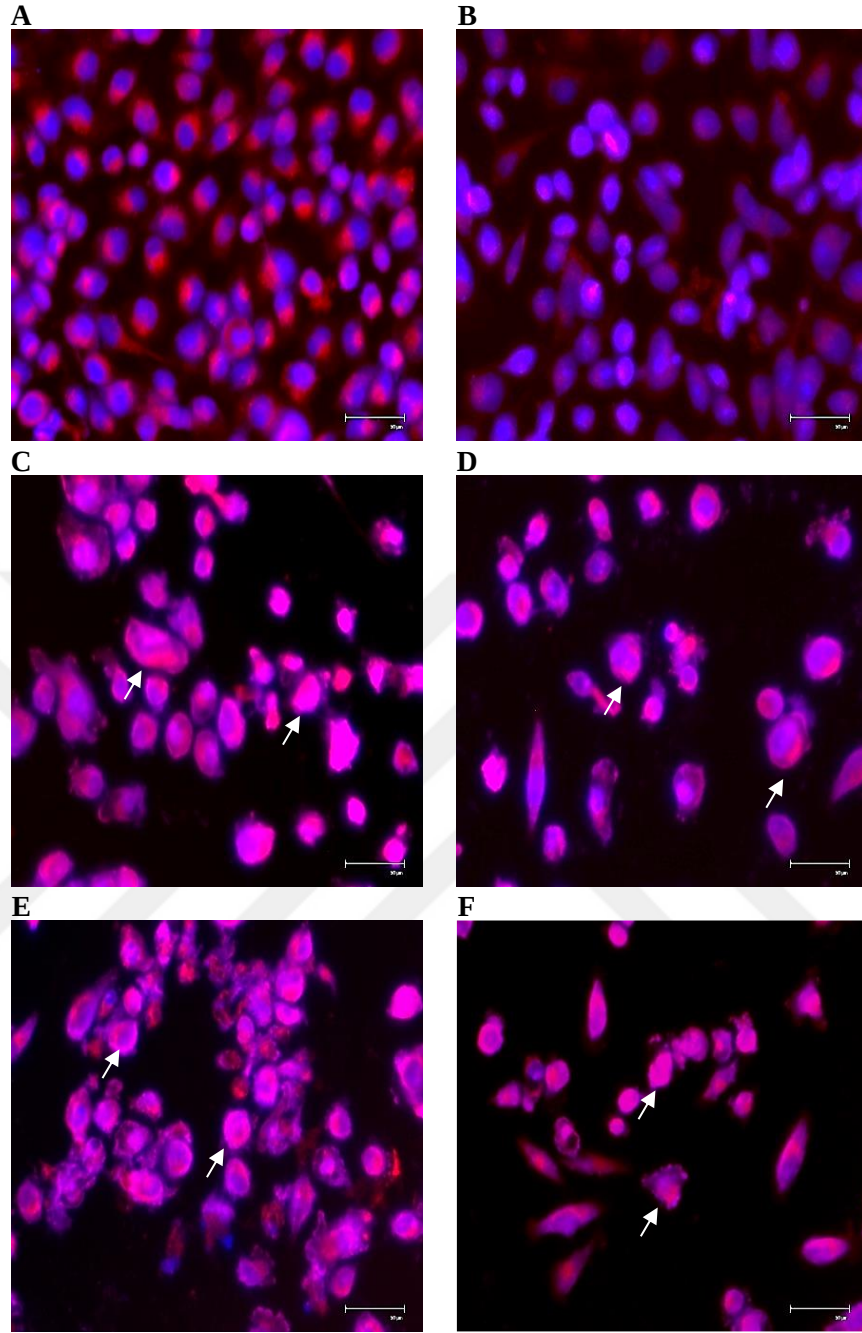
Şekil 4.11. MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen morfolojik değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm^2 , D) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışırma, 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm^2 ve F) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışırma.

4.5. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Eş Zamanlı Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Mitokondriyal Değişimlerin Değerlendirilmesi

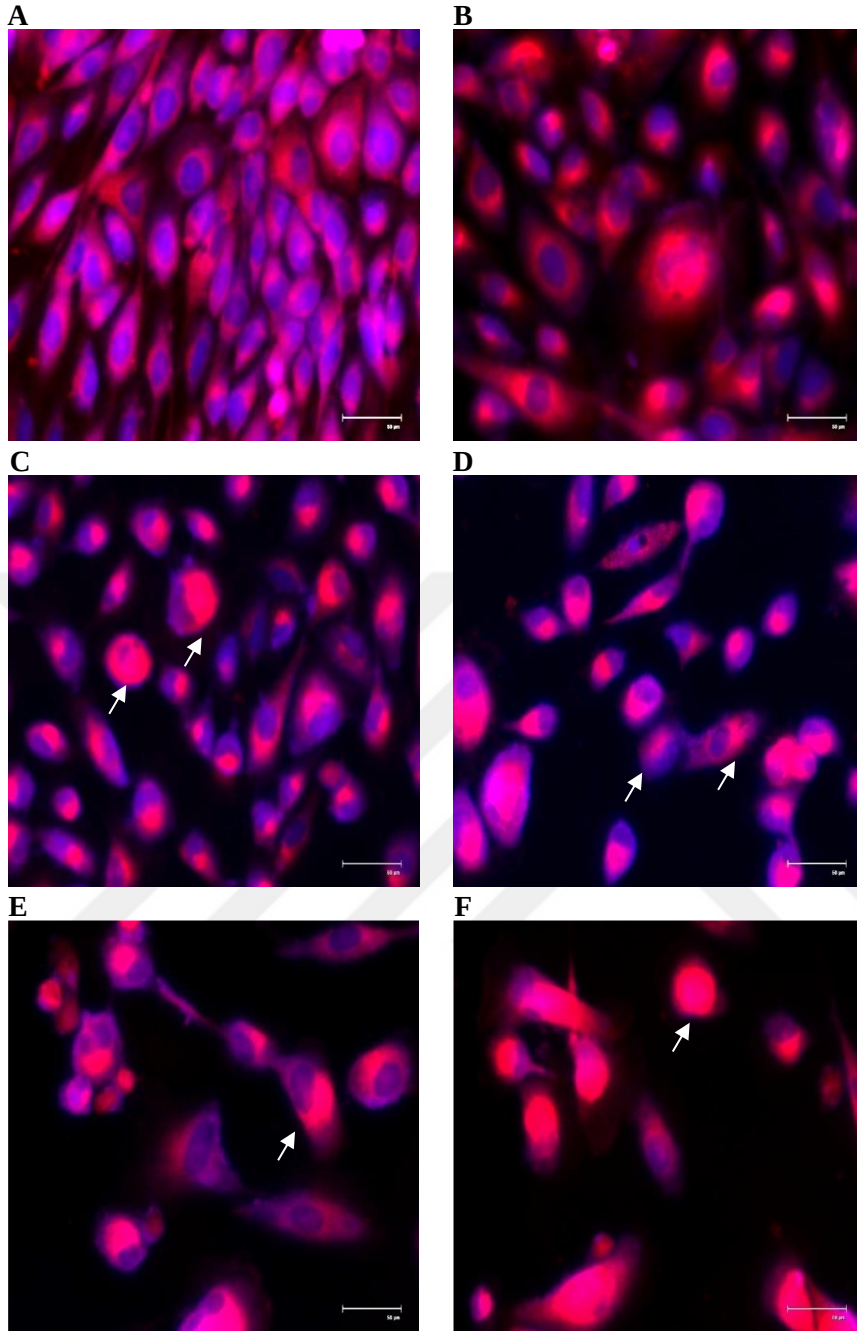
Sisplatin monoterapisi, 5-ALA/FDT monoterapisi ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin mitokondrilerinde meydana gelen değişimleri gözlemlemek için MitoTracker boyaması yapılmış ve elde edilen görüntüler Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sisplatin monoterapi uygulanan hücrelerde mitokondriyal floresan yoğunluklarda azalma gözlemlenirken, 5-ALA/FDT monoterapi ve kombin tedavi uygulanan hücrelerde artan enerji yoğunluğuna bağlı olarak mitokondrilerde artmış floresan yoğunluğu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde, özellikle kombin tedavi uygulanan grupta, enerji yoğunluğunda artış ile hücre içi mitokondriyal floresan yoğunlukların arttığı ve buna bağlı olarak çok sayıda parçalanmış mitokondriler görüntülenmiştir (Şekil 4.12).

MCF-10A hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla, sisplatin monoterapisi uygulanan hücrelerde mitokondriyal floresan yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmesine rağmen, 5-ALA/FDT monoterapisi ve kombin tedavi uygulanan hücrelerde mitokondriyal floresan yoğunlukların arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, MCF-10A hücrelerinde, 5-ALA/FDT monoterapi grubunda kombin tedavi grubuna kıyasla daha fazla sayıda parçalanmış mitokondriler görüntülenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücrelerinde cisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen mitokondriyel değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μ M cisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 μ M cisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma.



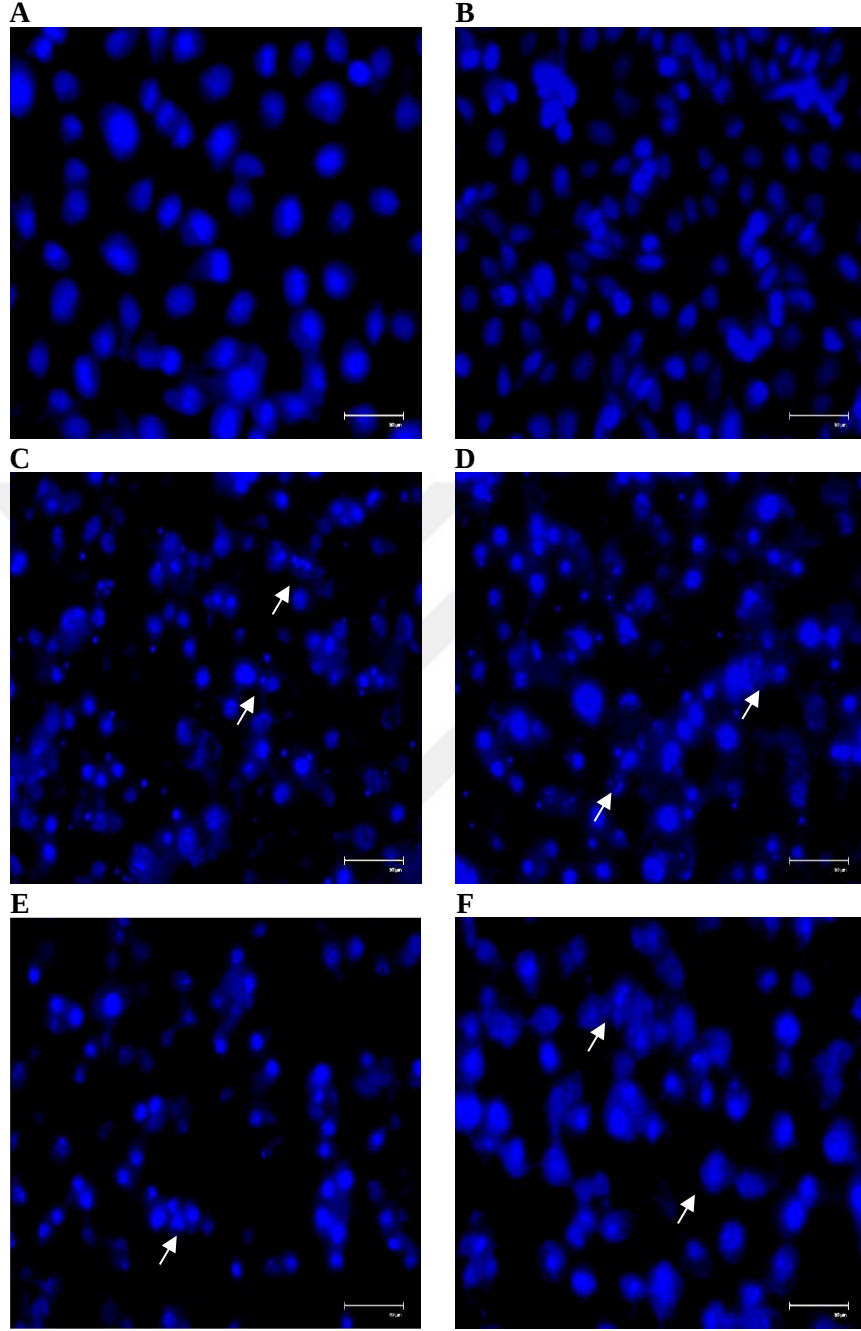
Şekil 4.13. MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen mitokondriyel değişimlerin görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm^2 , D) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışıma, 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm^2 ve F) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışıma.

4.6. 5-ALA/FDT ve Sisplatin Eş Zamanlı Kombin Uygulamasının Hücrelerde Neden Olduğu Nükleer Hasarın Görüntülenmesi

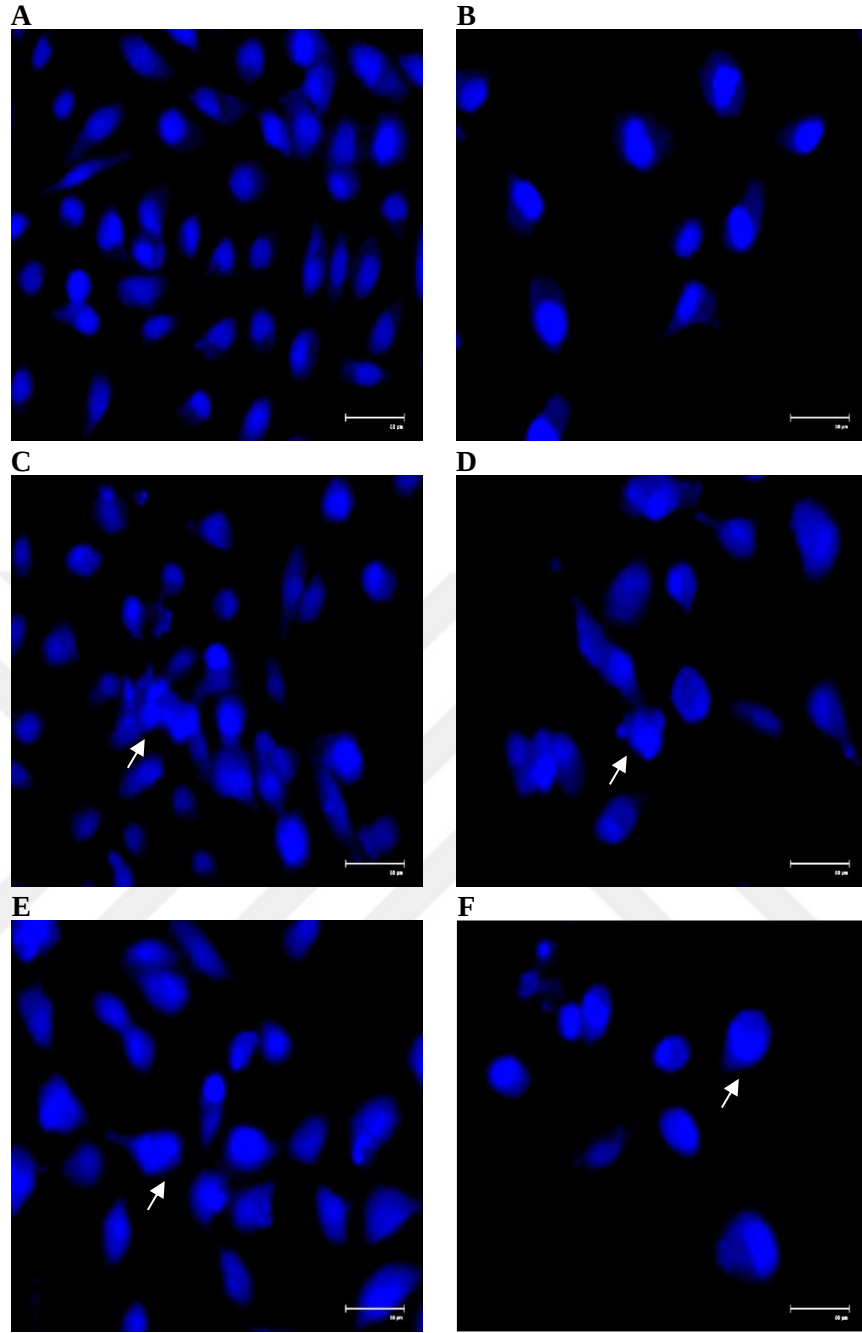
Sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonrasında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde meydana gelen apoptozun belirleyicisi olan nükleer hasarın görüntülenmesi amacıyla DAPI boyaması gerçekleştirilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.14 ve 4.15'te sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol hücrelerinde intak nükleer yapı görüntülenmesine rağmen, sisplatin veya 5-ALA monoterapileri uygulaması sonrasında 6 J/cm² ile 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıma gerçekleştirilen hücrelerde nükleer parçalanma ve yoğunlaşmış kromatin gözlemlenmiştir. Ayrıca, kombin tedavi uygulamalarında enerji yoğunlukları arttıkça nükleer büzülme, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler sisplatin ve 5-ALA/FDT monoterapi uygulamalarına göre daha fazla gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).

MCF-10A hücrelerinde ise, sisplatin monoterapisi uygulanan hücrelere göre 5-ALA/FDT monoterapi ve kombin tedavi uygulanan hücrelerde daha belirgin nükleer parçalanma ve kromatin yoğunlaşması gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. MDA-MB-231 hücrelerinde cisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen nükleer hasarın görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μ M cisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm², D) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırma, 2.5 μ M cisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm² ve F) 9 J/cm² enerji yoğunluğunda ışırma.



Şekil 4.15. MCF-10A hücrelerinde sisplatin, 5-ALA/FDT ve eş zamanlı kombin tedavi uygulaması sonucunda meydana gelen nükleer hasarın görüntülenmesi. A) kontrol grubu, B) 2.5 μM sisplatin, 5-ALA uygulanan hücrelerde C) 6 J/cm^2 , D) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışırma, 2.5 μM sisplatin ile eş zamanlı 5-ALA uygulanan hücrelerde E) 6 J/cm^2 ve F) 9 J/cm^2 enerji yoğunluğunda ışırma.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında, sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisinin MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A meme kontrol hücre hatlarında anti-kanser etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgularda, sisplatin ile 5-ALA/FDT eş zamanlı kombin tedavisinin TNMK hücrelerinde sisplatin ve 5-ALA/FDT monoterapi uygulamalarına göre daha fazla sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği ve bu nedenle daha etkin bir tedavi stratejisi olabileceği belirlenmiştir.

Meme kanserinin agresif alt tiplerinden biri olarak TNMK'nın tedavisinde birincil tedavi olarak dosetaksel gibi taksan bazlı ilaçlar, doksorubisin gibi antrasiklin bazlı ilaçlar ve sisplatin gibi platin bazlı ilaçlar kullanılmaktadır. Sisplatin kanser hücrelerinin pürin bazları arasında çapraz bağlar oluşturarak hücre döngüsünü G2 fazında durmasını sağlayarak, DNA hasarına yol açmakta ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Sisplatin TNMK dahil olmak üzere testis, over, kolorektal, rahim ağzı, akciğer, mide, baş ve boyun kanserleri gibi farklı kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, kanser hücrelerinde sisplatine karşı gelişen direnç ve nefrotoksisite, ototoksisite, hepatotoksisite gibi yan etkileri etkinliğini sınırlamaktadır [133-135]. Bu nedenle, kanserin tedavisinde farklı moleküler hedefleri temel alan kombin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi potansiyel avantajlar sağlayabilir [136,137].

FDT, FS olarak adlandırılan ışığa duyarlı ve toksik olmayan maddelerin uygun dalga boyuna sahip bir ışığın enerjisini absorbe etmesi sonucunda aktifleşerek ROS üretimiyle kanser hücrelerinde farklı ölüm tiplerine neden olan bir tedavi yöntemidir. FS uygun dalga boyundaki ışık ile aktive olduğunda dokuda bulunan oksijen molekülleri ile etkileşime girerek toksik ürünlerin doğrudan veya dolaylı üretimine yol açan kimyasal reaksiyonları başlatmaktadır ve böylece hedeflenen kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır [138-140]. FDT non-invazivlik, kısa sürede uygulanması ve tekrarlanabilirliği, daha az yan etkiye sahip olması ve seçicilik gibi avantajlara sahip olmasına rağmen, kullanılan FS için uygun dalga boyuna sahip ışığın penetrasyon derinliğindeki sorunlar ve hücrelerdeki oksijen konsantrasyonu FDT tedavisinin kanser tedavisinde kullanımını kısıtlamaktadır [54,71,141]. Bu çerçevede kanser

tedavisinde kemoterapide ve FDT belirtilen sorunların aşılabilmesi için kemoterapi ve FDT kombin tedavi yaklaşımları dikkat çekmektedir [142,143]. Gerçekleştirilen çalışmalarda FDT ve kemoterapi kombin tedavilerinin, FDT'nin hücre zarında geçirgenliği etkileyerek sitotoksik ajanların daha etkili olmasını sağlamasının yanı sıra bazı kemoterapi ilaçlarının belirli dalga boyunda uyarıldıkları zaman FS gibi davranarak sinerjik etki gösterebildiği belirlenmiştir [144]. Sonuç olarak, FDT ve kemoterapi kombin uygulamaları ile kemoterapinin normal hücrelerde neden olduğu yan etkiler azaltılabilir ve kanser hücrelerinde kemoterapiye karşı ilaç direnç gelişmesinin önüne geçilebilir [142,143,145]. Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında sisplatin ile birlikte 5-ALA/FDT'nin TNMK hücrelerinde kombin anti-kanser etkisi araştırılmıştır.

Hem sentezi için gerekli bir doğal aminoasit olan 5-ALA, FDT tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir FS türüdür. Kanserli dokularda hem sentez yolağının aktivitesinin değişmesi ile hücrelerde PpIX birikmektedir [146]. Floresan bir molekül olan PpIX kanser hücrelerinde biriktikten sonra ışık ile uyarıldığında ROS üretimine yol açarak kanser hücrelerinde ölüme neden olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, farklı kanser hücre hatlarında antikanser aktivitesi belirlenen 5-ALA/FDT'nin intraselüler PpIX miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir [123,147]. Eskiler ve vd. (2020)'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde iki farklı dozda (1 ve 2.5 mM) ve iki farklı inkübasyon süresinde (2 ve 4 saat) 5-ALA'nın 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluğunda ışıması sonrasında hücre canlılığı ve biriken intraselüler PpIX miktarında etkisini inceledikleri çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerinde ve 5-ALA dozu ve inkübasyon süresinin arttıkça intraselüler PpIX miktarının arttığı belirlenmiştir [123]. Morita vd. (2019) yaptıkları çalışmada 1 mM 5-ALA ile 4 saat inkübe edilen MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler PpIX miktarının arttığını ve bu artışın MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir [147]. Mevcut tez çalışmasında MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5-ALA/FDT ile sisplatin kombin tedavisinin 5-ALA/FDT monoterapi uygulamasına göre daha fazla intraselüler PpIX miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Literatürde, PpIX'in kanser hücrelerinde ışık sonrasında ROS üretemine neden olarak mitokondriyal ve sitoplazmik proteinlere zarar verdiği ve böylece apoptozu indüklediği belirtilmiştir [148]. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre 5-ALA/FDT monoterapisine kıyasla kombin tedavide intraselüler

PpIX'in daha fazla olması kombin tedavinin TNMK hücrelerinde daha etkin olması ile ilişkilendirilebilir.

Literatürde çeşitli kanser türlerinde farklı kemoterapi ilaçlarının FDT ile birlikte kombin etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır [87, 136, 149-151]. Jouni ve vd. (2022) tarafından yürütülen çalışmada rahim ağzı kanseri hücrelerinde sisplatin ile FDT'nin kombin etkisinin belirlenmesi için, A2780 ve A2780-CP hücrelerine FS olarak 20 μ M metilen mavisi eklenerek 2 saat inkübe edilmiş ve 4 J/cm² enerji yoğunluğunda 630 nm dalga boyundaki lazerle ısıtılmıştır. Işıma sonrası hücrelere farklı dozlarda sisplatin uygulanıp hücre canlılığında etkisi analiz edilmiştir. Sonuç olarak, kombin tedavinin monoterapilere kıyasla ve sisplatin dozundaki artışla birlikte hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir [149].

Zakaria vd. (2014) tarafından doksorubisin ile 5-ALA/FDT'nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki *in vitro* etkisini belirlemeyi hedefleyen çalışmada, MCF-7 hücrelerine 9.925 μ M doksorubisin ve 0.55 μ M 5-ALA uygulanmıştır. Sonrasında, hücreler 633 nm dalga boyundaki lazerle 4 dakika boyunca ısıtılarak, düşük dozların kullanıldığı kombin tedavinin yüksek konsantrasyonda uygulanan kemoterapi ve FDT monoterapilerine göre hücre canlılığında daha fazla azalmaya neden olduğu analiz edilmiştir [87].

Chul Ahn vd. (2014) insan baş ve boyun skuamöz karsinom hücreleri üzerinde sisplatin, FDT ve kombin etkilerini araştırmak için yürüttükleri çalışmada, AMC-HN3 hücrelerine 6.25 μ g/mL sisplatin uygulanıp 24 saat inkübe edikten sonra, 5-ALA hücrelere uygulanmış ve 632 nm dalga boyundaki lazer ışığı 6 J/cm² enerji yoğunluğunda ısıma yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, insan baş ve boyun skuamöz karsinom hücrelerinde üzerinde sisplatin ve 5-ALA kombin uygulamasının monoterapilere kıyasla daha etkin olduğu bulunmuştur [150].

TNMK hücrelerinde kemoterapi ile FDT'nin kombin etkisine yönelik gerçekleştirilen çalışmada, Sadeghloo vd. (2020) tarafından MDA-MB-231 hücrelerine 15 μ g/mL metilen mavisi uygulanıp 2 saat inkübe edildikten sonra 3 J/cm² enerji yoğunluğundaki 660 nm dalga boyundaki ışık ile uygulamaya tabi tutulmuştur. Uygulama sonrasında hücrelere farklı dozlarda doksorubisin eklenerek farklı sürelerde inkübe edilmiştir. Ayrıca, MDA-MB-231 hücrelerine farklı dozlarda ve inkübasyon sürelerinde

doksorubisin uygulandıktan sonra metilen mavisi eklenerek de FDT'nin anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, MDA-MB-231 hücrelerinde önce FDT uygulayıp sonra doksorubisin uygulamasının en etkin kombin tedavi seçeneği olduğu belirlenmiştir [151].

Mevcut tez çalışmasında MDA-MB-231 hücrelerinde ilk kez sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin kombin etkisi belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin eş zamanlı kombin tedavisinin sisplatin veya 5-ALA/FDT monoterapilerine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan araştırmalarda kemoterapi ve FDT kombin tedavisinin farklı kanser tiplerinde monoterapiye göre daha etkin olduğu belirlenmesine rağmen [101], eş zamanlı veya sıralı kombin tedavi uygulamalarının, seçilen FS veya kemoterapötik ajan tipinin, uygulama süresi ve konsantrasyonunun kanser hücrelerinde moleküler düzeyde farklı etkilere neden olabileceği tespit edilmiştir. Bu kapsamda, mevcut tez çalışmasında TNMK hücrelerine sisplatin ve 5-ALA/FDT sıralı ve eş zamanlı olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin eş zamanlı uygulamasının sıralı uygulamaya kıyasla daha etkin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, FDT'nin etkinliğinde uygulanan enerji yoğunluğun FS'lerin anti-kanser etkisinde farklılıklar içerdiği analiz edilmiştir [87,101,123,147,151-153]. Mevcut tez çalışmasında TNMK hücrelerinde sisplatin ile 5-ALA/FDT tedavisinin en etkin 9 J/cm² ışıma sonrasında etkin olduğu analiz edilmiştir. Bu nedenle, farklı kanser tiplerinde her bir FS özgü farklı enerji yoğunluklarında ışmanın ve farklı kemoterapi ilaçları ile kombin etkisinin belirlenmesine yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diğer yandan, WST-1 analizinin sonuçlarına göre, 5-ALA/FDT monoterapisinin sağlıklı hücrelerde toksik etkisi olduğu analiz edilmiştir. 5-ALA'nın hücrelerde toksik etkisinin azaltılması için nanopartiküler taşıyıcı sistemler ile kanser hücrelerinin spesifik bir şekilde hedeflenmesi ve böylece FS birikimini azaltarak ışığa duyarlılığın olumsuz etkilerini azaltılmasına veya sisplatinin neden olduğu yan etkilerin azaltılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir [71].

Kanser hücrelerinde FDT'nin temel etki mekanizmalarından biri mitokondriyal apoptotik yolak aktivasyonudur. FDT sonucunda artan ROS miktarı hücre canlılığını ve işlevini kontrol eden sinyal iletim yollarını etkileyerek apoptozun başlamasına neden olmaktadır. Ayrıca, FDT hücrelerdeki ROS miktarını arttırarak apoptozu

düzenleyebilen ve indükleyen Ca^{+2} konsantrasyonunu değiştirerek apoptoza neden olmaktadır. 5-ALA/FDT'nin ise sitokrom c'nin mitokondriden salınımına, Bcl-2 seviyesinde azalmaya, kaspaz 3'ün aktive olmasına ve endoplazmik retikulum stresinin yanı sıra mitokondriden apoptoz indükleyici faktörün salınımı ile de kaspaz bağımsız apoptozu indüklediği literatürde belirtilmektedir [54,142,145,154-156].

Sadeghloo vd. (2014) tarafından doksorubisin ve metilen mavisi kombin tedavisi sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde yaklaşık % 40 oranında apoptoz analiz edilmiştir [151]. Mevcut tez çalışmasında, MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin tedavisinin 5-ALA/FDT ve sisplatin monoterapilerine göre daha fazla apoptotik ölüme, nükleer hasara ve mitokondriyal hasara neden olduğu belirlenmiştir. Elde ölüm oranı FS olarak kullanılan 5-ALA'nın toksisitesinden, sisplatinin moleküler düzeyde etki mekanizmasından, kullanılan ilaçların sinerjistik etkileşiminden veya sisplatinin ışığa duyarlı yapısının olmasından kaynaklanabilir [157]. Bu nedenle, MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ile birlikte 5-ALA/FDT'nin neden olduğu apoptotik ölümün RT-PCR ve western blot gibi ileri analizler ile moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, 5-ALA/FDT uygulanan TNMK hücrelerinde belirgin mitokondriyal hasar ışına sonrasında artan ROS miktarı ile ilişkili olabilir. Thomas ve vd. tarafından 2017 yılında yapılmış bir çalışmada FDT'nin mitokondri yıkımına neden olduğu bildirilmiştir [158]. Bu kapsamda, intraselüler ROS miktarının ölçülmesine yönelik ileri analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin TNMK hücreleri üzerindeki kombin etkisi ilk kez araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda eş zamanlı sisplatin ile 5-ALA/FDT'nin TNMK hücrelerinde sinerjistik etki göstererek monoterapiden daha etkin olduğu ve TNMK hücrelerinde daha fazla apoptotik ölüme yol açtığı analiz edilmiştir. Böylece, sisplatin ile 5-ALA/FDT kombin uygulaması sonucunda sisplatinin konsantrasyonu veya 5-ALA'nın uyarılması için enerji yoğunlukları azaltılarak sağlıklı hücrelerde neden oldukları yan etkilerin önüne geçilebilir. Diğer yandan, MDA-MB-231 hücrelerinde sisplatin ile 5-ALA/FDT eş zamanlı kombin tedavisi sinerjik etki göstermesine rağmen, normal hücre hattı MCF-10A hücrelerinde toksik etkisi analiz edilmiştir. Bu nedenle, sisplatin ile 5-ALA'nın toksik etkisini azaltmak için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak hedef dokuda seçicilik artırılıp çevredeki sağlıklı dokudaki hasar azaltılabilir. Ayrıca, FDT

uygulama protokolünün optimize edilmesine ve her bir FS'nin ışıma sonrasında kanser hücrelerinde aktivitesinin belirlenmesine yönelik, moleküler biyolojik yöntemler ve modern görüntüleme teknikleri kullanımı ile ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir. Son olarak, farklı FS türleri ile sispaltinin farklı kanser tiplerinde kombin etkisinin belirlenmesine yönelikte ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Griffiths, C. L., & Olin, J. L. (2012). Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. *Journal of pharmacy practice*, 25(3), 319-323.
- [2] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [3] Anders, C., & Carey, L. A. (2008). Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*, 22(11), 1233.
- [4] Yeh, J., Chun, J., Schwartz, S., Wang, A., Kern, E., Guth, A. A., ... & Schnabel, F. (2017). Clinical characteristics in patients with triple negative breast cancer. *International journal of breast cancer*, 2017.
- [5] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., ... & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 106, 1098-1107.
- [6] dos Santos, A. F., De Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment—an update review. *Journal of cancer metastasis and treatment*, 5, 25.
- [7] Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2021). Photodynamic therapy—an up-to-date review. *Applied Sciences*, 11(8), 3626.
- [8] Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast cancer in Turkey; an analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141.
- [9] Tan, T., & Dent, R. (2018). Triple-negative breast cancer: clinical features. *Triple-Negative Breast Cancer: A Clinician's Guide*, 23-32.
- [10] Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *cancer*, 109(9), 1721-1728.
- [11] Boyle, P. (2012). Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of oncology*, 23, vi7-vi12.
- [12] Seer.cancer.gov. 2020. SEER*Explorer Application. [online] Available at: <https://seer.cancer.gov/statistics>

- [13] Scott, L. C., Mobley, L. R., Kuo, T. M., & Il'yasova, D. (2019). Update on triple-negative breast cancer disparities for the United States: A population-based study from the United States Cancer Statistics database, 2010 through 2014. *Cancer*, 125(19), 3412-3417.
- [14] Ismail-Khan, R., & Bui, M. M. (2010). A review of triple-negative breast cancer. *Cancer control*, 17(3), 173-176.
- [15] Howard, F. M., & Olopade, O. I. (2021). Epidemiology of triple-negative breast cancer: a review. *The Cancer Journal*, 27(1), 8-16.
- [16] Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 293, 247-269.
- [17] Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell biochemistry and biophysics*, 72, 333-338.
- [18] Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research*, 13(15), 4429-4434.
- [19] Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22, 1-13.
- [20] Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *International journal of oncology*, 57(6), 1245-1261.
- [21] Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The lancet oncology*, 8(3), 235-244.
- [22] Wang, C., Kar, S., Lai, X., Cai, W., Arfuso, F., Sethi, G., ... & Kumar, A. P. (2018). Triple negative breast cancer in Asia: An insider's view. *Cancer treatment reviews*, 62, 29-38.
- [23] Sharma, S., Barry, M., Gallagher, D. J., Kell, M., & Sacchini, V. (2015). An overview of triple negative breast cancer for surgical oncologists. *Surgical Oncology*, 24(3), 276-283.
- [24] Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O. B., & Minko, T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug delivery and translational research*, 8, 1483-1507.
- [25] Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- [26] Wahba, H. A., & El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer biology & medicine*, 12(2), 106.
- [27] Irvin Jr, W. J., & Carey, L. A. (2008). What is triple-negative breast cancer?. *European journal of cancer*, 44(18), 2799-2805.
- [28] de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P., van Engeland, M., & Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137, 183-192.

- [29] Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández Hernández, J. M., Rotello, V. M., & Ramirez, J. T. (2020). Triple-negative breast cancer: a review of conventional and advanced therapeutic strategies. *International journal of environmental research and public health*, 17(6), 2078.
- [30] Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(11), 674-690.
- [31] Zhou, Z., Zhang, L., Zhang, Z., & Liu, Z. (2021). Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(6), 668-686.
- [32] Macdonald, I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of porphyrins and Phthalocyanines*, 5(02), 105-129.
- [33] Sharman, W. M., Allen, C. M., & Van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today*, 4(11), 507-517.
- [34] Abdel-Kader, M. H. (2016). *Photodynamic therapy*. Springer-Verlag Berlin An.
- [35] Ostanska, E., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2021). The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111302.
- [36] Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., & Klajnert-Maculewicz, B. (2020). Nanocarriers in photodynamic therapy—in vitro and in vivo studies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), e1509.
- [37] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clinical endoscopy*, 46(1), 24-29.
- [38] Mfouo-Tynga, I. S., Dias, L. D., Inada, N. M., & Kurachi, C. (2021). Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 34, 102091.
- [39] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- [40] Xiao, Q., Wu, J., Pang, X., Jiang, Y., Wang, P., Leung, A. W., ... & Xu, C. (2018). Discovery and development of natural products and their derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 25(7), 839-860.
- [41] Zhu, T. C., & Finlay, J. C. (2008). The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical physics*, 35(7Part1), 3127-3136.
- [42] Zhao, X., Liu, J., Fan, J., Chao, H., & Peng, X. (2021). Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application. *Chemical Society Reviews*, 50(6), 4185-4219.
- [43] Wang, H., Li, X., Tse, B. W. C., Yang, H., Thorling, C. A., Liu, Y., ... & Liang, X. (2018). Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics. *Theranostics*, 8(5), 1227.

- [44] Foresto, E., Gilardi, P., Ibarra, L. E., & Cogno, I. S. (2021). Light-activated green drugs: How we can use them in photodynamic therapy and mass-produce them with biotechnological tools. *Phytomedicine Plus*, 1(3), 100044.
- [45] Mansoori, B., Mohammadi, A., Doustvandi, M. A., Mohammadnejad, F., Kamari, F., Gjerstorff, M. F., ... & Hamblin, M. R. (2019). Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 26, 395-404.
- [46] Traylor, J. I., Pernik, M. N., Sternisha, A. C., McBrayer, S. K., & Abdullah, K. G. (2021). Molecular and metabolic mechanisms underlying selective 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in gliomas. *Cancers*, 13(3), 580.
- [47] Nokes, B., Apel, M., Jones, C., Brown, G., & Lang, J. E. (2013). Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *Journal of surgical research*, 181(2), 262-271.
- [48] Keltly, C. J., Brown, N. J., Reed, M. W., & Ackroyd, R. (2002). The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(3), 158-168.
- [49] Zhang, L. W., Fang, Y. P., & Fang, J. Y. (2011). Enhancement techniques for improving 5-aminolevulinic acid delivery through the skin. *Dermatologica sinica*, 29(1), 1-7.
- [50] Niemz, M. H. (2007). *Laser-tissue interactions* (Vol. 322). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [51] Kim, M. M., & Darafsheh, A. (2020). Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 96(2), 280-294.
- [52] Alexiades-Armenakas, M. (2006). Laser-mediated photodynamic therapy. *Clinics in dermatology*, 24(1), 16-25.
- [53] Douplik, A., Saiko, G., Schelkanova, I., & Tuchin, V. V. (2013). The response of tissue to laser light. In *Lasers for Medical Applications* (pp. 47-109). Woodhead Publishing.
- [54] Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic therapy—current limitations and novel approaches. *Frontiers in Chemistry*, 9, 691697.
- [55] Kamanli, A. F., Yildiz, M. Z., Arslan, H., İetinel, G., Lim, N. K., & Lim, H. S. (2020). Development of a new multi-mode NIR laser system for photodynamic therapy. *Optics & Laser Technology*, 128, 106229.
- [56] Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H., & Stewart, F. A. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist*, 11(9), 1034-1044.
- [57] Keiser, G., & Keiser, G. (2016). Light-tissue interactions. *Biophotonics: Concepts to applications*, 147-196.
- [58] Brancalion, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*, 17, 173-186.
- [59] Raulin, C., & Karsai, S. (Eds.). (2011). *Laser and IPL technology in dermatology and aesthetic medicine* (p. 432). Heidelberg: Springer.
- [60] Mang, T. S. (2004). Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1), 43-48.

- [61] Hunsperger, (1994). *Lasers* (pp. 9-60). *Photonic Devices and Systems (1st ed.)*. Routledge.
- [62] Williams, D. (2008). Laser basics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 9(12), 550-552.
- [63] Silfvast, W. T. (2004). *Laser fundamentals*. Cambridge university press.
- [64] Peng, Q., Juzeniene, A., Chen, J., Svaasand, L. O., Warloe, T., Giercksky, K. E., & Moan, J. (2008). Lasers in medicine. *Reports on Progress in Physics*, 71(5), 056701.
- [65] Karrer, S., Szeimies, R. M., Hohenleutner, U., & Landthaler, M. (2001). Role of lasers and photodynamic therapy in the treatment of cutaneous malignancy. *American journal of clinical dermatology*, 2, 229-237.
- [66] Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, 13(9), 1332.
- [67] Gupta, S. K., Jangam, H., & Sharma, N. (2018). Study and Applications of Laser Light. *Res J Opt Photonics* 2: 2. of, 11, 2.
- [68] Wei, F., Rees, T. W., Liao, X., Ji, L., & Chao, H. (2021). Oxygen self-sufficient photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 432, 213714.
- [69] Shen, Z., Ma, Q., Zhou, X., Zhang, G., Hao, G., Sun, Y., & Cao, J. (2021). Strategies to improve photodynamic therapy efficacy by relieving the tumor hypoxia environment. *NPG Asia Materials*, 13(1), 39.
- [70] Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., & González, S. (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10, 148-154.
- [71] Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. *Molecules*, 21(3), 342.
- [72] Dąbrowski, J. M. (2017). Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. In *Advances in inorganic chemistry* (Vol. 70, pp. 343-394). Academic Press.
- [73] Bacellar, I. O., Tsubone, T. M., Pavani, C., & Baptista, M. S. (2015). Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20523-20559.
- [74] Pibiri, I., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A., & Pace, A. (2018). Photochemically produced singlet oxygen: applications and perspectives. *ChemPhotoChem*, 2(7), 535-547.
- [75] Pogue, B. W., Elliott, J. T., Kanick, S. C., Davis, S. C., Samkoe, K. S., Maytin, E. V., ... & Hasan, T. (2016). Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success. *Physics in Medicine and Biology*, 61(7), R57-R89.
- [76] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*, 3(5), 380-387.

- [77] Alzeibak, R., Mishchenko, T. A., Shilyagina, N. Y., Balalaeva, I. V., Vedunova, M. V., & Krysko, D. V. (2021). Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(1).
- [78] Liu, X., Du, J., Xie, Z., Wang, L., Liu, X., Hou, Z., ... & Tang, R. (2021). Lactobionic acid-modified phycocyanin nanoparticles loaded with doxorubicin for synergistic chemo-photodynamic therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 206-217.
- [79] Wang, X., Li, N., Meng, J., & Wen, N. (2021). The use of topical ALA-photodynamic therapy combined with induction chemotherapy for locally advanced oral squamous cell carcinoma. *American Journal of Otolaryngology*, 42(6), 103112.
- [80] Zhou, B., Ma, Y., Li, L., Shi, X., Chen, Z., Wu, F., ... & Wang, S. (2021). Pheophorbide co-encapsulated with Cisplatin in folate-decorated PLGA nanoparticles to treat nasopharyngeal carcinoma: Combination of chemotherapy and photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112100.
- [81] Hwang, H., Biswas, R., Chung, P. S., & Ahn, J. C. (2013). Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 70-77.
- [82] Chang, J. E., Yoon, I. S., Sun, P. L., Yi, E., Jheon, S., & Shim, C. K. (2014). Anticancer efficacy of photodynamic therapy with hematoporphyrin-modified, doxorubicin-loaded nanoparticles in liver cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 49-56.
- [83] de Freitas, L. M., Soares, C. P., & Fontana, C. R. (2014). Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: A novel approach for cervical cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 365-373.
- [84] Biteghe, F. N., & Davids, L. M. (2017). A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 18-27.
- [85] Cabral, Á. S., Leonel, E. C. R., Candido, N. M., Piva, H. L., de Melo, M. T., Taboga, S. R., ... & Calmon, M. F. (2021). Combined photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin nanoemulsions in breast cancer model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 218, 112181.
- [86] He, Z., Jiang, H., Zhang, X., Zhang, H., Cui, Z., Sun, L., ... & Huang, J. (2020). Nano-delivery vehicle based on chlorin E6, photodynamic therapy, doxorubicin chemotherapy provides targeted treatment of HER-2 negative, $\alpha\beta 3$ -positive breast cancer. *Pharmacological research*, 160, 105184.
- [87] Zakaria, S., Gamal-Eldeen, A. M., El-Daly, S. M., & Saleh, S. (2014). Synergistic apoptotic effect of Doxil® and aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on human breast adenocarcinoma cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(2), 227-238.

- [88] Tahmasebi, H., Khoshgard, K., Sazgarnia, A., Mostafaie, A., & Eivazi, M. T. (2016). Enhancing the efficiency of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using 5-fluorouracil on human melanoma cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13, 297-302.
- [89] Doustvandi, M. A., Mohammadnejad, F., Mansoori, B., Tajalli, H., Mohammadi, A., Mokhtarzadeh, A., ... & Baradaran, B. (2019). Photodynamic therapy using zinc phthalocyanine with low dose of diode laser combined with doxorubicin is a synergistic combination therapy for human SK-MEL-3 melanoma cells. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 28, 88-97.
- [90] Zhang, T., Bao, J., Zhang, M., Ge, Y., Wei, J., Li, Y., ... & Jin, Y. (2020). Chemo-photodynamic therapy by pulmonary delivery of gefitinib nanoparticles and 5-aminolevulinic acid for treatment of primary lung cancer of rats. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101807.
- [91] Zhao, P., Tang, Z. W., Lin, H. C., Djuanda, D., Zhu, Z., Niu, Q., ... & Fu, B. (2021). VEGF aptamer/i-motif-based drug co-delivery system for combined chemotherapy and photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 36, 102547.
- [92] Huang, X., Chen, T., Mu, N., Lam, H. W., Sun, C., Yue, L., ... & Wang, R. (2021). Supramolecular micelles as multifunctional theranostic agents for synergistic photodynamic therapy and hypoxia-activated chemotherapy. *Acta biomaterialia*, 131, 483-492.
- [93] Crescenzi, E., Varriale, L., Iovino, M., Chiaviello, A., Veneziani, B. M., & Palumbo, G. (2004). Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(5), 537-544.
- [94] Crescenzi, E., Chiaviello, A., Canti, G., Reddi, E., Veneziani, B. M., & Palumbo, G. (2006). Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 776-785.
- [95] Anand, S., Honari, G., Hasan, T., Elson, P., & Maytin, E. V. (2009). Low-dose methotrexate enhances aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research*, 15(10), 3333-3343.
- [96] Castano, A. P., Mroz, P., Wu, M. X., & Hamblin, M. R. (2008). Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5495-5500.
- [97] Rizvi, I., Celli, J. P., Evans, C. L., Abu-Yousif, A. O., Muzikansky, A., Pogue, B. W., ... & Hasan, T. (2010). Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. *Cancer research*, 70(22), 9319-9328.
- [98] Chang, E., Bu, J., Ding, L., Lou, J. W., Valic, M. S., Cheng, M., ... & Zheng, G. (2021). Porphyrin-lipid stabilized paclitaxel nanoemulsion for combined photodynamic therapy and chemotherapy. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 1-15.

- [99] Wang, S., Yu, G., Yang, W., Wang, Z., Jacobson, O., Tian, R., ... & Chen, X. (2021). Photodynamic-chemodynamic cascade reactions for efficient drug delivery and enhanced combination therapy. *Advanced Science*, 8(10), 2002927.
- [100] Pigula, M., Mai, Z., Anbil, S., Choi, M. G., Wang, K., Maytin, E., ... & Hasan, T. (2021). Dramatic reduction of distant pancreatic metastases using local light activation of verteporfin with nab-paclitaxel. *Cancers*, 13(22), 5781.
- [101] Candido, N. M., De Melo, M. T., Franchi, L. P., Primo, F. L., Tedesco, A. C., Rahal, P., & Calmon, M. F. (2018). Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(5), 994-1008.
- [102] Postiglione, I., Chiaviello, A., Aloj, S. M., & Palumbo, G. (2013). 5-aminolaevulinic acid/photo-dynamic therapy and gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines: a potential strategy to improve gefitinib therapeutic efficacy. *Cell proliferation*, 46(4), 382-395.
- [103] Aggad, D., Jimenez, C. M., Dib, S., Croissant, J. G., Lichon, L., Laurencin, D., ... & Durand, J. O. (2018). Gemcitabine delivery and photodynamic therapy in cancer cells via porphyrin-ethylene-based periodic mesoporous organosilica nanoparticles. *ChemNanoMat*, 4(1), 46-51.
- [104] Chen, Y., Gao, Y., Li, Y., Wang, K., & Zhu, J. (2019). Synergistic chemo-photodynamic therapy mediated by light-activated ROS-degradable nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(3), 460-468.
- [105] Dag, A., Cakilkaya, E., Omurtag Ozgen, P. S., Atasoy, S., Yigit Erdem, G., Cetin, B., ... & Gurek, A. G. (2021). Phthalocyanine-conjugated glyconanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy. *Biomacromolecules*, 22(4), 1555-1567.
- [106] Lange, C., & Bednarski, P. J. (2018). Evaluation for synergistic effects by combinations of photodynamic therapy (PDT) with temoporfin (mTHPC) and Pt (II) complexes carboplatin, cisplatin or oxaliplatin in a set of five human cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3183.
- [107] Chen, Y., Zhang, L., Li, F., Sheng, J., Xu, C., Li, D., ... & Liu, W. (2021). Combination of chemotherapy and photodynamic therapy with oxygen self-supply in the form of mutual assistance for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3679.
- [108] Kirveliėne, V., Grazeleėne, G., Dabkeviėiene, D., Micke, I., Kirvelis, D., Juodka, B., & Didziapetriėne, J. (2006). Schedule-dependent interaction between Doxorubicin and mTHPC-mediated photodynamic therapy in murine hepatoma in vitro and in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 57(1), 65-72.
- [109] Celli, J. P., Solban, N., Liang, A., Pereira, S. P., & Hasan, T. (2011). Verteporfin-based photodynamic therapy overcomes gemcitabine insensitivity in a panel of pancreatic cancer cell lines. *Lasers in surgery and medicine*, 43(7), 565-574.

- [110] Sun, G., Anderson, M. A., Gorospe, E. C., Leggett, C. L., Lutzke, L. S., Wong Kee Song, L. M., ... & Wang, K. K. (2012). Synergistic effects of photodynamic therapy with HPPH and gemcitabine in pancreatic cancer cell lines. *Lasers in Surgery and Medicine*, 44(9), 755-761.
- [111] Lee, D., Jang, S. Y., Kwon, S., Lee, Y., Park, E., & Koo, H. (2021). Optimized combination of photodynamic therapy and chemotherapy using gelatin nanoparticles containing tirapazamine and pheophorbide a. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(9), 10812-10821.
- [112] Li, T. F., Xu, H. Z., Xu, Y. H., Yu, T. T., Tang, J. M., Li, K., ... & Chen, X. (2021). Efficient Delivery of Chlorin e6 by Polyglycerol-Coated Iron Oxide Nanoparticles with Conjugated Doxorubicin for Enhanced Photodynamic Therapy of Melanoma. *Molecular Pharmaceutics*, 18(9), 3601-3615.
- [113] Choi, Y., Chang, J. E., Jheon, S., Han, S. J., and Kim, J. K. (2018). Enhanced Production of Reactive Oxygen Species in HeLa Cells under Concurrent Low-dose C-irradiation and Photofrin® Photodynamic Therapy. *Oncol. Rep.* 40 (1), 339–345. doi:10.3892/or.2018.6415
- [114] Sun, L., Shang, H., Wu, Y., & Xin, X. (2022). Hypericin-mediated photodynamic therapy enhances gemcitabine induced Capan-2 cell apoptosis via inhibiting NADPH level. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(4), 596-604.
- [115] Xu, J., Zheng, Q., Cheng, X., Hu, S., Zhang, C., Zhou, X., ... & Gao, Y. (2021). Chemo-photodynamic therapy with light-triggered disassembly of theranostic nanoplatfrom in combination with checkpoint blockade for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 1-20.
- [116] Yi, X., Dai, J., Han, Y., Xu, M., Zhang, X., Zhen, S., ... & Xia, F. (2018). A high therapeutic efficacy of polymeric prodrug nano-assembly for a combination of photodynamic therapy and chemotherapy. *Communications biology*, 1(1), 1-13.
- [117] Thapa, P., Li, M., Bio, M., Rajaputra, P., Nkepan, G., Sun, Y., ... & You, Y. (2016). Far-red light-activatable prodrug of paclitaxel for the combined effects of photodynamic therapy and site-specific paclitaxel chemotherapy. *Journal of medicinal chemistry*, 59(7), 3204-3214.
- [118] Hu, D., Chen, L., Qu, Y., Peng, J., Chu, B., Shi, K., ... & Qian, Z. (2018). Oxygen-generating hybrid polymeric nanoparticles with encapsulated doxorubicin and chlorin e6 for trimodal imaging-guided combined chemo-photodynamic therapy. *Theranostics*, 8(6), 1558.
- [119] Hameed, S., Bhattarai, P., Liang, X., Zhang, N., Xu, Y., Chen, M., & Dai, Z. (2018). Self-assembly of porphyrin-grafted lipid into nanoparticles encapsulating doxorubicin for synergistic chemo-photodynamic therapy and fluorescence imaging. *Theranostics*, 8(19), 5501.
- [120] Wei, X., Liu, L., Guo, X., Wang, Y., Zhao, J., & Zhou, S. (2018). Light-activated ROS-responsive nanoplatform codelivering apatinib and doxorubicin for enhanced chemo-photodynamic therapy of multidrug-resistant tumors. *ACS applied materials & interfaces*, 10(21), 17672-17684.

- [121] Xie, Q., Jia, L., Liu, Y. H., & Wei, C. G. (2009). Synergetic anticancer effect of combined gemcitabine and photodynamic therapy on pancreatic cancer in vivo. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(6), 737.
- [122] Yao, S., Jin, X., Wang, C., Cao, A., Hu, J., Chen, B., & Wang, B. (2021). ICG/5-Fu coencapsulated temperature stimulus response nanogel drug delivery platform for chemo-photothermal/photodynamic synergetic therapy. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(4), 565-578.
- [123] Eskiler, G. G., Ozkan, A. D., Kucukkara, E. S., Kamanlı, A. F., Gunoğlu, B., & Yıldız, M. Z. (2020). Optimization of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy protocol for breast cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101854.
- [124] Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- [125] Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2, 64-80.
- [126] Yin, L. M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y. D., & Yang, Y. Q. (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1), 68.
- [127] Güleş, Ö., & Ülker, E. R. E. N. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- [128] Miller, E. (2004). Apoptosis measurement by annexin v staining. In *Cancer cell culture* (pp. 191-202). Humana Press.
- [129] Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb-prot087288.
- [130] Zelenin, A. V. (1999). Acridine Orange as a Probe. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*, 117.
- [131] Bank, H. L. (1988). Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In vitro cellular & developmental biology*, 24(4), 266-273.
- [132] Guney Eskiler, G., Deveci, A. O., Bilir, C., & Kaleli, S. (2019). Synergistic effects of nobiletin and sorafenib combination on metastatic prostate cancer cells. *Nutrition and cancer*, 71(8), 1299-1312.
- [133] Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- [134] Hill, D. P., Harper, A., Malcolm, J., McAndrews, M. S., Mockus, S. M., Patterson, S. E., ... & Blake, J. A. (2019). Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: multiple mechanisms of resistance. *BMC cancer*, 19, 1-13.

- [135] Ahn, T. G., Jung, J. M., Lee, E. J., & Choi, J. H. (2019). Effects of cisplatin on photosensitizer-mediated photodynamic therapy in breast tumor-bearing nude mice. *Obstetrics & gynecology science*, 62(2), 112-119.
- [136] Zhang, Q., & Li, L. (2018). Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J. BUON*, 23(3), 561-567.
- [137] Mohammadpour, H., & Fekrazad, R. (2016). Antitumor effect of combined Dkk-3 and 5-ALA mediated photodynamic therapy in breast cancer cell's colony. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 14, 200-203.
- [138] Topaloğlu, N., Kadıköylü, G., Onak, G., & Karaman, O. (2020). The effect of indocyanine green-based photodynamic therapy on healthy fibroblast and keratinocyte cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101891.
- [139] Shi, X., Zhang, C. Y., Gao, J., & Wang, Z. (2019). Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(5), e1560.
- [140] Karuppusamy, S., Hyejin, K., & Kang, H. W. (2019). Nanoengineered chlorin e6 conjugated with hydrogel for photodynamic therapy on cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 778-788.
- [141] Spring, B. Q., Rizvi, I., Xu, N., & Hasan, T. (2015). The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochemical & photobiological sciences*, 14(8), 1476-1491.
- [142] Wan, G., Chen, B., Li, L., Wang, D., Shi, S., Zhang, T., ... & Wang, Y. (2018). Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy. *Biomaterials*, 155, 25-40.
- [143] Lee, H., Han, J., Shin, H., Han, H., Na, K., & Kim, H. (2018). Combination of chemotherapy and photodynamic therapy for cancer treatment with sonoporation effects. *Journal of controlled release*, 283, 190-199.
- [144] Luo, C., Sun, B., Wang, C., Zhang, X., Chen, Y., Chen, Q., ... & Sun, J. (2019). Self-facilitated ROS-responsive nanoassembly of heterotypic dimer for synergistic chemo-photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 302, 79-89.
- [145] VİTHANAGE, V., Jayasinghe, C. D., & RAJENDRAM, S. (2022). Photodynamic Therapy: An Overview and Insights into a Prospective Mainstream Anticancer Therapy. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 9(3), 821-848.
- [146] Harada, Y., Murayama, Y., Takamatsu, T., Otsuji, E., & Tanaka, H. (2022). 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence imaging for tumor detection: Recent advances and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6478.
- [147] Morita, M., Tanaka, H., Kumamoto, Y., Nakamura, A., Harada, Y., Ogata, T., ... & Takamatsu, T. (2019). Fluorescence-based discrimination of breast cancer cells by direct exposure to 5-aminolevulinic acid. *Cancer medicine*, 8(12), 5524-5533.

- [148] Sachar, M., Anderson, K. E., & Ma, X. (2016). Protoporphyrin IX: the good, the bad, and the ugly. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(2), 267-275.
- [149] Javani Jouni, F., Abdollahi, V., Zadehmodarres, S., Abbasinia, H., Asnaashari, M., & Zafari, J. (2022). Combination of cisplatin treatment and photodynamic therapy attenuates cisplatin-induced cell toxicity in A2780 and A2780-CP cervical cancer cell lines. *Lasers in Medical Science*, 1-6.
- [150] Ahn, J. C., Biswas, R., Mondal, A., Lee, Y. K., & Chung, P. S. (2014). Cisplatin enhances the efficacy of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy in human head and neck squamous cell carcinoma. *General physiology and biophysics*, 33(1), 53-62.
- [151] Sadeghloo, A. Y., Khorsandi, K., & Kianmehr, Z. (2020). Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 1580-1589.
- [152] Jin, F., Qi, J., Liu, D., You, Y., Shu, G., Du, Y., ... & Du, Y. (2021). Cancer-cell-biomimetic Upconversion nanoparticles combining chemo-photodynamic therapy and CD73 blockade for metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 337, 90-104.
- [153] Ding, Y., Yang, R., Yu, W., Hu, C., Zhang, Z., Liu, D., ... & Chen, D. (2021). Chitosan oligosaccharide decorated liposomes combined with TH302 for photodynamic therapy in triple negative breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-17.
- [154] Fahmy, U. A., & Fahmy, O. (2020). In vitro evaluation of cytotoxic properties of 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) on bladder cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101714.
- [155] Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer—a review of the current clinical status. *Frontiers in Chemistry*, 9, 686303.
- [156] Karmakar, S., Banik, N. L., Patel, S. J., & Ray, S. K. (2007). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neuroscience letters*, 415(3), 242-247.
- [157] Karbownik, A., Szalek, E., Urjasz, H., Głęboka, A., Mierzwa, E., & Grześkowiak, E. (2012). The physical and chemical stability of cisplatin (Teva) in concentrate and diluted in sodium chloride 0.9%. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 16(5), 435-439.
- [158] Thomas, A. P., Palanikumar, L., Jeena, M. T., Kim, K., & Ryu, J. H. (2017). Cancer-mitochondria-targeted photodynamic therapy with supramolecular assembly of HA and a water soluble NIR cyanine dye. *Chemical science*, 8(12), 8351-835.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Beyzanur ERK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği
- **Yükseklisans** : 2023, Sakarya Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği ABD, Biyomedikal Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- TÜBİTAK–2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Desteği Programı, Çinko Oksit Nanoparçacığının Antibakteriyel Fototermal Terapide Etkinliğinin Araştırılması Projesi, Araştırmacı
- TÜBİTAK 1001 TOVAG Programı, Köpek Meme Tümörü Hücrelerinde Fotodinamik Tedavi (FDT) Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Bursiyer

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

- Erk B., Eskiler G.G., Kamanlı, A.F. (2022, 17-19, Mart). Triple Negatif Meme Kanserinde Sisplatin ve Fotodinamik Tedavinin Kombin Terapötik Etkisinin Araştırılması. 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi. (pp. 36-37).

DİĞER ESERLER:

- Erk, B., Kabar, Ö., Er, H., E., Bakay, E., Büyüksökmen, Y., Karaman, D. Ş., & Topaloğlu, N. (2020, November). The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles in Antibacterial Photothermal Therapy against MRSA. In 2020 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO) (pp. 1-4). IEEE.
- Eskiler, G. G., Turna, O., Ozkan, A. D., Baykal, A., Gorgen, H. O., Erk, B., ... & Lim, H. S. (2022). The response of the canine mammary simple carcinoma and carcinosarcoma cells to 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy: An in vitro study. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 234, 112509.