

**T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA FOTODİNAMİK
TEDAVİNİN POTANSİYEL TERAPÖTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge ÖZTEN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ
Ortak Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

Haziran 2021

T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA FOTODİNAMİK
TEDAVİNİN POTANSİYEL TERAPÖTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge ÖZTEN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 23/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ	BAŞARI DURUMU
Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ	Başarılı
Doç. Dr. Gamze Güney ESKİLER	Başarılı
Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ	Başarılı
Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI	Başarılı
Prof. Dr. Salih Zeki YILDIZ	Başarılı

BEYAN

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

Özge Özten

23/06/2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışmanım Doç. Dr. Fatih SÖNMEZ ve değerli ortak danışmanım Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölüm Başkanı Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a ve Tıbbi Biyoloji laboratuvarında çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan değerli ortak danışmanım Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkür ederim. Laboratuvardaki cihazlar ile ilgili teknik açıdan tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI'ya teşekkür ederim. Ayrıca Prof. Dr. Salih Zeki YILDIZ'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca deneylerim sırasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Elif SÖZEN KÜÇÜKKARA'ya teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalışmamda dahil olmak üzere hayatım boyunca her zaman arkamda olan, teşvik eden, maddi ve manevi açıdan desteklerini esirgemeyen AİLEME teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x

BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1

BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hepatosellüler Karsinom.....	3
2.2. HSK'nın Dünyadaki İnsidansı ve Epidemiyolojisi.....	3
2.3. HSK Risk Faktörleri.....	4
2.3.1. Hepatit B, hepatit C ve siroz	5
2.3.2. Non-alkolik karaciğer hastalığı ve diyabet	6
2.3.3. Alkol kullanımı	6
2.3.4. Aflatoksin.....	7
2.3.5. Diğer siroz nedenleri	7
2.4. HSK Tedavisi	7

BÖLÜM 3.	
FOTODİNAMİK TEDAVİ	9
3.1. Fotodinamik Tedavi	9
3.2. FDT'de Fotofiziksel Olaylar	10
3.3. FDT'de Fotokimyasal Olaylar	11
3.4. FDT Etki Mekanizması	12
3.4.1. Fotosensitizerler (FS).....	12
3.4.2. Işık dağıtımı	14
3.4.3. Singlet oksijen	16
3.5. Hücre Lokalizasyonu	17

3.6. FDT'de 5-ALA'nın Yeri	18
----------------------------------	----

BÖLÜM 4.

MALZEME VE YÖNTEM	22
4.1. Kullanılan Cihazlar	22
4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	22
4.3. Hücre Kültürü	23
4.3.1. Hücre hatlarının temini ve hücrelerin özellikleri	23
4.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları	23
4.3.3. Hücrelerin pasajlanması	24
4.3.4. Hücrelerin sayımı, dondurulması ve saklanması	25
4.4. Fotodinamik Tedavi Protokolü	25
4.4.1. 5-ALA uygulanması	25
4.4.2. Lazer uygulaması	26
4.5. Hücre Proliferasyon Analizi	27
4.6. Apoptozun Belirlenmesi	29
4.6.1. Annexin V analizi	29
4.6.2. Akridin oranj/Etidyum bromür boyama.....	30
4.7. İstatistiksel Analiz	32

BÖLÜM 5.

BULGULAR.....	33
5.1. HSK Hücre Hatlarında İntraselüler PpIX-floresans Miktarının Belirlenmesi..	33
5.2. HSK Hücrelerinde 5-ALA/FDT'nin Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	35
5.3. Annexin V Analizi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	37
5.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Sonuçları	39

BÖLÜM 6.

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
-------------------------------	-----------

KAYNAKLAR	46
------------------------	-----------

ÖZGEÇMİŞ.....	56
----------------------	-----------

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-ALA	: 5-Aminolevulinik asit
AFB1	: Aflatoksin B1
CO₂	: Karbondioksit
CW	: Continious Mode
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
FECH	: Ferroşelataz enzimi
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Food and Drug Administration
FS	: Fotosensitizer
HBV	: Hepatit B
HCV	: Hepatit C
HSK	: Hepatosellüler Karsinom
J	: Joule
LASER	: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	: Light Emiiting Diode
MHz	: MegaHertz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ms	: Milisaniye
mW	: MiliWatt
NAFLD	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
PEI	: Perkütan etanol enjeksiyonu
PBGD	: Porfobilinojen deaminaz

PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PpIX	: Protoporfirin IX
RFA	: Radyofrekans ablasyon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TACE	: Transarteriyel kemoembolizasyon
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum-1
μL	: Mikrolitre
μs	: Mikrosaniye



TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1 : Literatürde yer alan <i>in vitro</i> FDT çalışmaları	21
Tablo 4.1 : 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin radyasyon parametreleri.....	27
Tablo 5.1: 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak Huh-7 ve SNU-449 sitotoksisite sonuçları.	36



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Dünya çapında yaşa göre standardize edilmiş HSK insidans oranları	4
Şekil 2.2: HSK risk faktörleri	5
Şekil 3.1: FDT’de olaylar dizini	10
Şekil 3.2: Jablonski diyagramı	11
Şekil 3.3: Tip I reaksiyonu	11
Şekil 3.4: Tip II reaksiyonu	12
Şekil 3.5: FDT’de kullanılan doğal ve sentetik FS’ler	14
Şekil 3.6: Dokulardan ışık yayılım	15
Şekil 3.7: Triplet ve singlet oksijen elektron dağılımını gösteren moleküler orbital diyagramları	17
Şekil 3.8 : 5-ALA kimyasal yapısı	18
Şekil 3.9 : Hem biyosentezi	19
Şekil 3.10 : 5-ALA’nın PpIX’e dönüşümü	20
Şekil 3.11 : 5 ALA ve fotodinamik terapi	21
Şekil 4.1 : (a) Huh-7 ve (b) SNU-449 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri ..	24
Şekil 4.2 : Lazer uygulamasından önce FBS içeren taze besiyeri uygulaması	26
Şekil 4.3 : Lazer cihazı	26
Şekil 4.4 : Lazer uygulaması	27
Şekil 4.5 : WST-1 mitokondriyal enzimlerle formazana indirgenir	28
Şekil 4.6 : WST-1 analizi için 96 kuyucuklu plaka düzeneği	29
Şekil 4.7 : Annexin V yöntemi ile apoptoz aşamaları	30
Şekil 4.8 : Farklı güç yoğunluklu lazer ışımaya sonrasında HSK hücrelerinde 5-ALA/FDT’nin (a) WST-1 canlılık analizi ile sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi, WST-1 analizine göre en etkin çıkan güç yoğunluklarının HSK hücrelerinde (b) AO/EB boyamasıyla morfolojik değişimlerin görüntülenmesi ve (c) Annexin V ile apoptotik etkilerin belirlenmesi	31
Şekil 5.1: 1 mM 5-ALA uygulanan Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde intraselüler PpIX miktarı (a) Kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak HCC hücrelerinde intraselüler PpIX miktarına ait görüntüler (b) Hücrelerde intraselüler PpIX floresans miktarının statiksel karşılaştırılması (p <0.01**)	34
Şekil 5.2: Farklı güç yoğunluklu lazer ışımaya sonrasında (A) Huh-7 ve (B) SNU-449 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin WST-1 analizi sonuçları (p<0.01**)....	36

Şekil 5.3: Farklı güç yoğunluklu lazer ışına sonrasında (A) Huh-7 ve SNU-449 hücre hatlarında Annexin V analizi sonuçları a) Kontrol b) 9 J/cm ² c) 12 J/cm ² (B) Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinin toplam apoptotik hücre yüzdesinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (p<0.01)	38
Şekil 5.4: Farklı güç yoğunluklu lazer ışına sonrasında Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak morfolojik değişimlerin akridin oranj boyaması a) Kontrol b) 9 J/cm ² c) 12 J/cm ²	40



HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA FOTODİNAMİK TEDAVİNİN POTANSİYEL TERAPÖTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Hepatosellüler karsinom (HSK) dünya çapında yaygın olarak gözlemlenen heterojen yapıya sahip bir kanser türüdür. Tümörün agresif yapısından dolayı HSK tedavisinde kullanılan cerrahi, kemoradyoterapi ve çeşitli kemoterapik ilaçlar sınırlı etkiye sahiptir ve bu nedenle yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Fotodinamik terapi (FDT), fotosensitizer maddelerin sistemik, lokal veya topikal olarak uygulanmasına dayanan modern ve invazif olmayan yeni bir tedavi şeklidir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA), FDT’de yaygın olarak kullanılan bir fotosensitizerdir. 5-ALA temelli FDT’nin farklı kanser tiplerinde etkisine dair çalışmalar mevcuttur. Ancak, 5-ALA’nın HSK tedavisinde terapötik etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut tez çalışmasında, hepatit B (HBV) enfeksiyonu durumuna göre iki farklı özellikte Huh-7 (HBV-) ve SNU-449 (HBV+) HSK hücrelerinde 5-ALA/FDT’nin sitotoksik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4 saat boyunca 1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde intraselüler PpIX miktarı belirlendikten sonra, farklı güç yoğunlukları (3, 6, 9, 12 J/cm²) ile hücreler ışıtarak 5-ALA sitotoksik etkisi WST-1 ve apoptotik etkisi Annexin V analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler akridin oranj/etidyum bromür floresans boyaması ile değerlendirilmiştir.

1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde kontrol grubuna göre intraselüler PpIX seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ve bu artışın SNU-449 hücrelerinde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. WST-1 analizi sonuçlarına göre HSK hücrelerinde lazer ışına sonrasında canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. SNU-449 hücre hattında 12 J/cm² güç yoğunluğunun, Huh-7 hücre hattında ise 9 J/cm² güç yoğunluğunun en yüksek sitotoksititeye neden olduğu tespit edilmiştir. 5-ALA/FDT HSK hücrelerinde özellikle erken apoptotik ölüme neden olduğu ve SNU-449 hücrelerinin 5-ALA/FDT tedavisine daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 5-ALA/FDT uygulanan HSK hücrelerinde DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, hücre boyutunda küçülme ve/veya hücre büzülmesi ve nükleer parçalanma gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışması ile ilk kez 5-ALA/FDT’nin Huh-7 ve SNU-449 HSK hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu *in vitro* olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Hepatosellüler karsinom, Fotodinamik Tedavi, 5-ALA, Apoptoz.

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL THERAPEUTIC EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a type of heterogeneous cancer that is widely observed worldwide. Due to the aggressive features of the tumor, the surgical, chemoradiotherapy and various chemotherapy drugs used in HCC treatment have a limited effect and therefore new treatment strategies are needed. Photodynamic therapy (PDT) is a modern, non-invasive new form of therapy based on systemic, local or topical application of photosensitizing agents. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is a commonly used PS in PDT. There are different studies evaluating the effect of 5-ALA based PDT on different types of cancer. However, there is no study on the therapeutic effect of 5-ALA in HCC treatment. The present thesis study aims to determine the cytotoxic and apoptotic effect of the 5-ALA/PDT on two different Huh-7 (HBV-) and SNU-449 (HBV+) HCC cells according to the status of the hepatitis B (HBV) infection.

After determining the amount of intracellular PpIX in HCC cells treated with 1 mM 5-ALA for 4 hours, the cells were irradiated with different power densities (3, 6, 9, 12 J/cm²). The cytotoxic and apoptotic effect of 5-ALA were determined by WST-1 and Annexin V analysis. In addition, the morphological changes in cells were evaluated by acridine orange-ethidium bromide fluorescence staining.

The intracellular PpIX level significantly increased in HCC cells treated with 1 mM 5-ALA for 4 hours compared to the control group and the level of PpIX was higher in SNU-449 cells. According to the WST-1 analysis results, the viability of HCC cells was considerably reduced after laser irradiation. It was determined that 12 J/cm² power density in SNU-449 cell line and 9 J/cm² power density in Huh-7 cell line caused the highest cytotoxicity. 5-ALA/PDT caused especially early apoptotic death in HCC cells and SNU-449 cells were more sensitive to 5-ALA/PDT treatment. In addition, DNA fragmentation, chromatin condensation, reduction in cell size and /or cell shrinkage and nuclear fragmentation were observed in HCC cells treated with 5-ALA/ PDT.

As a result, our results for the first time showed that 5-ALA/PDT have a cytotoxic and apoptotic effect on Huh-7 and SNU-449 HCC cells in the present thesis study, *in vitro*.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Photodynamic Treatment, 5-ALA, Apoptosis.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (HSK), dünya çapında en yaygın kanser türleri arasında dördüncü sırada yer alan heterojen fenotipe sahip bir kanser türüdür. HSK tedavisinde küratif rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu, radyofrekans ablasyonu, trans-arteriyel kemoembolizasyon, radyoembolizasyon ve sorafenib gibi sistemik hedefli ajan dahil olmak üzere farklı seçenekler kullanılmaktadır. Ancak, HSK tedavisi tümör evresine, hasta performans durumuna ve karaciğer fonksiyon rezervine bağlıdır ve multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Son birkaç yılda cerrahi tedavilerde ve bölgesel tedavilerde önemli gelişmeler HSK hastalarının sağkalım süresinde artışa neden olduğu belirlenmesine rağmen, hastalarda gelişen nüks tedavinin başarısında önemli bir engel olarak yer almaktadır [1-5].

Fotodinamik tedavi (FDT), kanseri hücrelerine karşı seçici sitotoksik aktivite gösteren minimal invaziv bir prosedürdür. FDT, bir fotosensitizerin (FS) uygulanmasını ve ardından FS absorpsiyon bandı içindeki dalga boylarında ışıtmayı içermektedir. Bu mekanizma, FS'nin ışık kaynağından fotonları absorbe ederek dışarıya elektronlar çıkarması şeklinde gerçekleşmektedir. Bu süreç boyunca açığa çıkan, singlet oksijen olarak da bilinen serbest radikaller, kanser hücrelerinde oksidatif hasar ile hücre ölümünü indüklemektedir. FDT'de FS'ler tipine bağlı olarak, intravenöz, oral ya da topikal olarak uygulanabilmektedir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA), hücreleri ışığa duyarlı hale getirmek için yaygın olarak kullanılan bir FS'dir. Ancak, 5-ALA tek başına ışığa duyarlı değildir. Bu duyarlılık mitokondriler içindeki protoporfirin IX (PpIX) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Pre-klinik ve klinik çalışmalarda, 5-ALA temelli FDT'nin özellikle erken evre tümörlerde iyileştirici olabileceği, cerrahi müdahale edilemeyen kanserli hastalarda sağkalım süresini uzatabileceği ve yaşam kalitesini önemli ölçüde artırabileceği ortaya konulmuştur [6-9].

FDT’de kullanılan ışık ve FS tek başına herhangi bir toksik etki göstermezken, oksijenle birlikte bir araya geldiklerinde oluşan fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. FDT, farklı sinyal yollarının aktivitesi sonucunda kanser hücrelerinde apoptoz, nekroz ve otofaji olmak üzere üç farklı ölüm tipini aktive etmektedir. FDT sonucunda gerçekleşen hücre ölümü, FS'nin konsantrasyonu, fizikokimyasal özellikleri ve hücre içi konumu, oksijen konsantrasyonu, ışığın dalga boyu ve yoğunluğu ve hücre tipi dahil olmak üzere farklı unsurlarla ilişkilidir. Örneğin, FDT'nin daha düşük dozları daha yüksek oranda apoptotik ölüme neden olurken, yüksek dozların ise daha fazla nekrotik ölüme yol açtığı literatürde belirtilmektedir. Ayrıca FDT’de kullanılan geniş bant dalga boyuna sahip polikromatik lazer olmayan ışık kaynakları ile monokromatik dalga boyundaki lazer ışık kaynakları etkin FDT uygulamasında önemlidir. Lazer ışık kaynaklarının monokromatik dalga boyu nedeniyle ışınım süresinin sınırlandırılabilmesi, ışık aktarımında fiberoptik donanım sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır [10,11].

Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında 5-ALA’nın farklı güç yoğunlukta lazer ışınması sonucunda Huh7 ve SNU-449 HSK hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi ve potansiyel terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinom

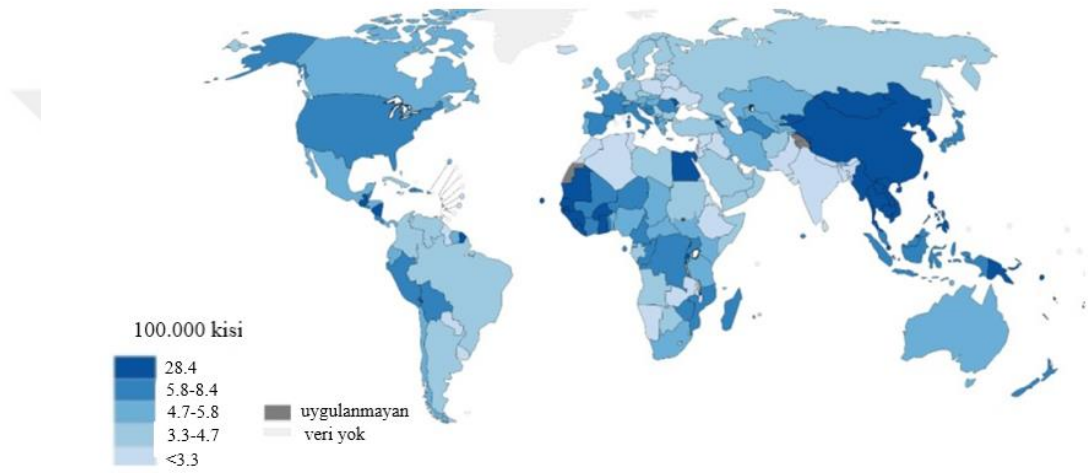
Hepatosellüler karsinom (HSK), dünya çapında kanser kaynaklı ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır ve her yıl 600.000'den fazla ölüme neden olduğundan dolayı büyük bir sağlık sorununu temsil etmektedir [12,13]. HSK'nın asemptomatik yapısı ve heterojen fenotipi hastalarda ölüm oranının yüksek olmasına neden olmaktadır [14]. HSK ile ilişkili temel risk faktörleri arasında kronik hepatit C (HCV) enfeksiyonu, hepatit B (HBV) enfeksiyonu, alkolik siroz ve non-alkolik karaciğer yağlanması yer almaktadır [15]. ABD ve Avrupa'da, HSK insidansındaki artışın temelinde HCV enfeksiyonun yer aldığı belirtilmektedir [16,17]. HSK'nın görülme sıklığında bu önemli artışı, 1980'lerde HCV salgını ve enfeksiyonun başlangıcı ile sirozun gelişmesi arasındaki 20-30 yıllık gecikme süresinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, etiyolojiye bakılmaksızın, HSK'nın %80-90'ında en önemli risk faktörü, siroza neden olan kanser öncesi lezyonların varlığıdır [18,19]. Ayrıca, kronik karaciğer hastalığının yanısıra HSK gelişiminde bağımsız risk faktörleri içerisinde artan obezite ve diyabet HSK'nın görülme sıklığında artışa neden olabileceği belirtilmektedir [20,21].

Ayrıca, HSK ortalama olarak 65 yaş ve üstü yetişkinlerde kötü prognoza neden olmasına rağmen erken hepatosit veya pediatrik bir tümör tipi olan hepatoblastoma temelli olarak erken yaşta da (<20-30 yaş) tespit edilmesi mümkündür [22].

2.2. HSK'nın Dünyadaki İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Dünya çapında HSK insidansı incelendiğinde, HSK'nın risk faktörlerinin değişken yaygınlığı nedeniyle heterojen olduğu görülmektedir. Vakaların %72'sinin Asya'da (Çin'de %50'den fazla), %10'unun Avrupa'da, %7.8 Afrika'da, %5.1 Kuzey Amerika'da, %4.6 Latin Amerika'da ve % 0.5'inin Okyanusya'da meydana geldiği belirtilmektedir.

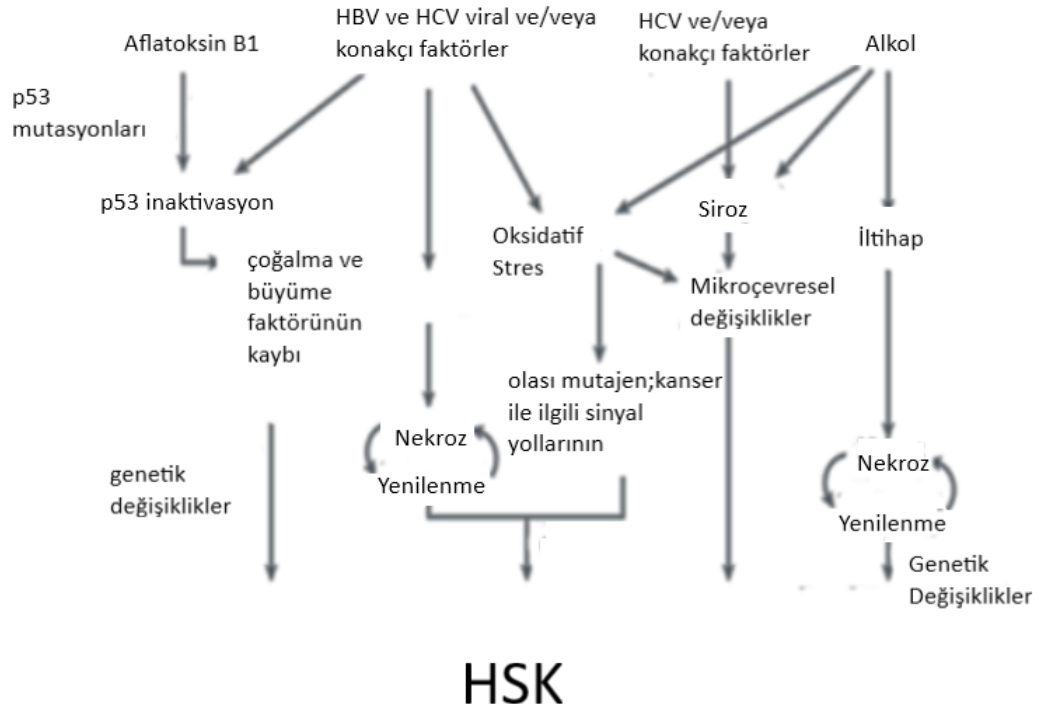
Dünya çapında 2018 yılında HSK için tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranları içerisinde 100.000'de en yüksek insidans oranının Doğu Asya'da (17.7) olduğu görülmektedir. Moğolistan (93.4) bu bölgede ve dünyada en yüksek insidans oranına sahiptir. Güneydoğu Asya ve Afrika'da sırasıyla 13.3 ve 8.4 iken, Mısır (32.2) ve Gambiya (23.9) Afrika'daki en yüksek insidans oranına sahiptir. En düşük insidans oranı Güney Orta Asya'da (2.5), ardından Orta ve Doğu Avrupa ve Batı Asya'da (eşit olarak yaklaşık 4.0) gözlemlenmiştir (Şekil 2.1) [23].



Şekil 2.1 : Dünya çapında yaşa göre standardize edilmiş HSK insidans oranları, 2018 [23].

2.3. Hepatosellüler Karsinom Risk Faktörleri

HSK risk faktörleri arasında hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), siroz, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, obezite ve diyabet yer almaktadır (Şekil 2.2) [24].



Şekil 2.2 : HSK risk faktörleri [24].

2.3.1. Hepatit B, hepatit C ve siroz

Kronik HBV ve HCV enfeksiyonu, HSK'nın en önemli nedenleri arasında yer almaktadır ve küresel olarak HSK vakalarının %80'ini oluşturmaktadır [24,25]. Kronik HBV enfeksiyonu, HCV insidansının en yüksek olduğu Kuzey Afrika dışında, Doğu Asya ülkelerinde ve çoğu Afrika ülkelerinde HSK'nın önde gelen nedenleri arasında yer alır. Dünya çapında 257 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonu olduğu tahmin edilmektedir ve 2015 ile 2030 yılları arasında 20 milyon kişinin HBV'nin neden olduğu akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve HSK'dan ölebileceği ve yine bu yıllar arasında 5 milyon kişinin HSK'dan ölebileceği tahmin edilmektedir [24,26]. HCV ise, Kuzey Amerika, Avrupa, Japonya, Moğolistan da dahil olmak üzere Orta Asya'nın bazı kısımlarında ve Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da ve özellikle Mısır HSK'nın önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır [24,27].

Çoğu durumda HSK, HBV veya HCV enfeksiyonundan gelişen karaciğer sirozundan sonra ortaya çıkan uzun süreli kronik hepatit sonucunda gelişmektedir. Genel olarak,

kronik HBV veya HCV enfeksiyonuna sahip sirozlu hastalarda HSK'nın yıllık insidansı %2-5'tir [28]. Bununla birlikte, HBV ile ilişkili HCC sıklıkla karaciğer sirozu olmayan kişilerde Doğu Asya ve çoğu Afrika ülkesi gibi HBV'nin endemik olduğu bölgelerde HSK'nın %30-50'sini oluşturmaktadır [29]. Buna karşılık, HBV'nin endemik olmadığı Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yapılan çalışmalarda, HBV ile ilişkili HSK hastalarının %90'ından fazlasında karaciğer sirozu tespit edilmiştir [30].

2.3.2. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve diyabet

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) en yaygın karaciğer hastalığıdır ve çoğu gelişmiş ülkede HSK için önemli bir risk faktörü olarak yer almaktadır [31,32]. NAFLD ile ilişkili HSK ayrıca siroz yokluğunda da sıklıkla görülmektedir [33]. Amerika'da HSK hastalarında yapılan bir çalışmada, HCV ile ilişkili HSK hastalarına kıyasla, NAFLD ile ilişkili HSK hastalarının siroz olmamasına rağmen, HSK'ya yakalanma riskinin beş kattan fazla olduğu bildirilmiştir [34]. Diyabet ve/veya obezite ise, karaciğer yağlanması en önemli klinik risk faktörleri içerisinde yer alıp, ABD'de HSK gelişiminde %37 etki oranına sahiptir [35]. Ayrıca, diyabetin HSK riskinin iki ile üç kat artmasına neden olduğu da belirtilmektedir [28, 36, 37]. Diyabet ile ilişkili olarak insülin direnci ve buna bağlı olarak karaciğer yağlanmasını tetikleyen reaktif oksijen türlerinin üretimini hepatokarsinogenez gelişimine neden olduğu düşünülmektedir [38-40]. Yapılan bir çalışmada, diyabetin karaciğer sirozu olan hastalarda HSK riskini arttırdığı gösterilmiştir [28,37].

2.3.3. Alkol kullanımı

Alkolic hepatit siroz, ABD ve Avrupa'da HSK risk faktörleri arasında ikinci sırada yer almaktadır [24]. Alkole bağlı sirozlu hastalarda HSK gelişim riski, kronik viral hepatite bağlı sirozlu hastalardan daha düşük görünmektedir [41,42]. Birleşik Krallık Genel Uygulama Araştırma Veritabanında (1987–2006) 3.107 siroz hastası üzerinde yapılan popülasyona dayalı bir çalışmada, alkolic hepatit siroz hastalarında viral hepatite bağlı siroz hastalarına göre iki ile üç kat daha düşük HSK riskine sahip olduğu belirlenmiştir [41].

2.3.4. Aflatoksin

Aflatoksinler, birçok temel tahıl ve yağlı tohumda belirlenen güçlü hepatokarsinojenik etkilere sahip mikotoksinlerdir [43]. Aflatoksin kontaminasyonu, HSK insidansının yüksek olduğu bölgelerde yaygındır [44]. Karaciğer kanserojenezinde yer alan aflatoksinin ana formu, *Aspergillus* sp. tarafından üretilen aflatoksin B1'dir (AFB1) [43,45]. Aflatoksin maruziyetinin, HSK erken başlangıcında kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir [46].

2.3.5. Diğer siroz nedenleri

Kronik safra hastalığı ve genetik veya metabolik karaciğer hastalıkları gibi diğer kronik karaciğer hastalıkları ve siroz HSK gelişimine neden olmaktadır. Ancak bu nedenlere bağlı HSK görülme sıklığı dünya çapında %5-10'dan daha azdır [47].

2.4. HSK Tedavisi

Erken evrede teşhis edilen HSK hastalarının, cerrahi rezeksiyon veya karaciğer nakli ile tedavi potansiyelleri mevcuttur. Ancak ileri evre ve karaciğer fonksiyon bozukluğu tespit edilen HSK hastalarının sadece %15'nin tedavisi mümkündür [48]. Ayrıca, HSK tedavisinde radyofrekans ablasyon (RFA), mikrodalga ablasyon, perkütan etanol enjeksiyonu (PEI), transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), radyo-embolizasyon, kriyoablasyon, radyasyon tedavisi, stereotaktik radyoterapi, sistemik kemoterapi ve moleküler hedefli tedaviler gibi diğer tedavi yöntemleri de mevcuttur.

HSK tedavisinde kemoterapi sistemik veya bölgesel olarak uygulanabilir. Bölgesel kemoterapi, sonuçları kemoembolizasyona benzer olan arter içi tedaviyi içermektedir. Sistemik kemoterapi ise HSK hastalarında düşük yanıt oranı (tipik olarak %25'ten az yanıt) ile ilişkilidir ve doz, sıklıkla HSK ile ilişkili siroz nedeniyle sınırlandırılabilir [49].

Sorafenib, HSK tedavisinde FDA tarafından onaylanan birden fazla moleküler yolağı hedefleyen bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib tedavide kullanılmadan önce, doksorubisin ilerlemiş HSK tedavisinde rutin olarak kullanılan tek kemoterapi ilacı olarak

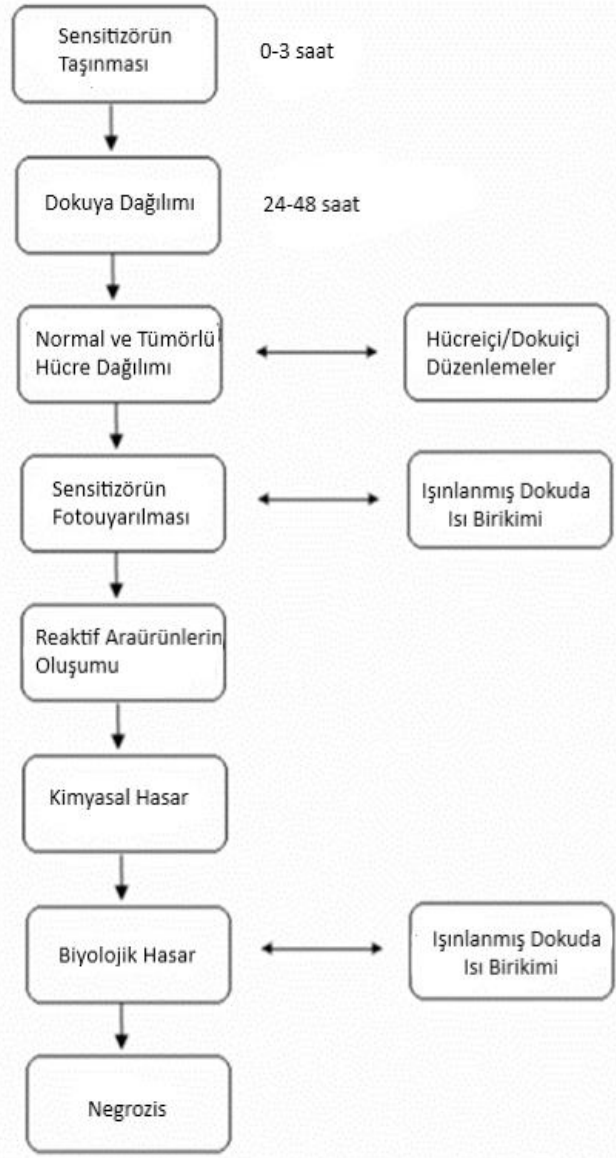
belirlenmektedir ve hastaların yaklaşık %15-20'sinde doksorubisin temelli tedaviye yanıt alınmaktadır. Bu nedenle, sorafenib HSK hastalarında konvansiyonel kemoterapi için bir ilerleme olarak kabul edilmesine rağmen, HSK hastalarında gelişen ilaç direnci ve sağ kalım süresinde yaklaşık 3 ay artış sağlaması, HSK tedavisinde yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir [50].



BÖLÜM 3. FOTODİNAMİK TEDAVİ

3.1. Fotodinamik Tedavi

FDT, farklı hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli olan modern ve invazif olmayan bir tedavi şeklidir [51]. FDT, FS olarak bilinen toksik olmayan bir ilacın veya boyanın sistemik, lokal veya topikal olarak uygulanması olarak tanımlanabilir [52,53]. Kansere tedavisinde FS'nin aktivitesine bağlı değişen inkübasyon süresinden sonra, spesifik lezyonun genellikle uzun dalga boylu kırmızı görünür ışıkla (620-690 nm) aydınlatılmasına ve oksijen varlığında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıyla hücre ölümüne neden olmaktadır [54,55]. Ayrıca, FDT FS'nin spesifik olarak kanser hücrelerinde aktifleşmesi temeline dayandığından dolayı, kanser tedavisinde dikkat çekmektedir (Şekil 3.1) [56,57].



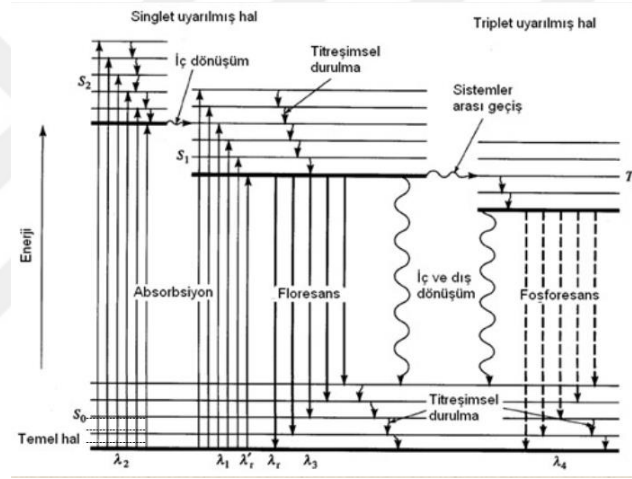
Şekil 3.1 : FDT'de olaylar dizini [58].

3.2. FDT'de Fotofiziksel Olaylar

Fotoduyarlanıcı bir molekül S_0 temel enerji seviyesinde iken, ışık ile uyarılınca uyarılmış enerji seviyesi olan S_1 enerji seviyesine kısa süreli olarak geçmektedir.

Elektronun üst seviyelerine spin değiştirmeden çıkmasına uyarılmış singlet hal denilir. Uyarılmış halde molekülün diamanyetik özelliği değişmez. Uyarılan molekülün tekrar temel hale dönmeye iç dönüşüm (IC) denilmektedir. Fotoduyarlanıcı, iç dönüşüm (IC) ile veya floresans yayarak temel enerji seviyesi olan S_0 seviyesine dönebilir. Ayrıca S_1

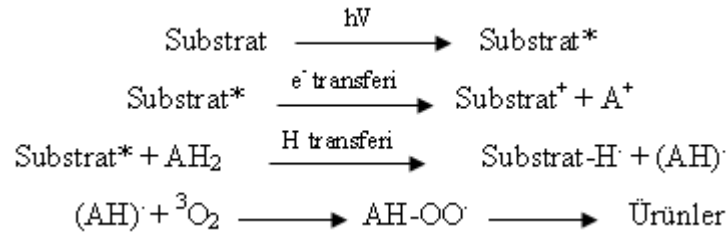
seviyesinden S_0 seviyesine dönmek için sistemler arası geçiş (ISC) ile triplet uyarılmış hale (T_2) de geçebilir. Uyarılmış singlet halin aksine uyarılmış triplet halde molekül paramanyetik özellik kazanır. Triplet uyarılması 10^{-4} saniyeden saatlere kadar sürerken, singlet uyarılma sadece 10^{-7} - 10^{-9} saniye sürer. T_2 triplet uyarılmış seviyedeki bir molekül iç dönüşüm ile T_1 triplet seviyesine inebilir veya T_1 triplet seviyesinden fosforesans ışımaya yaparak temel enerji seviyesine dönebilir. Molekülün uyarılan elektronun spini ters dönerek fosforesans ışımaya gerçekleşir [59]. Spin koruma kuralına göre singlet-triplet ve triplet-singlet enerji aktarımları yasaktır. Bu nedenle T_1 enerji seviyesindeki molekül, kimyasal tepkime verebilmesi için uzun bir uyarılma süresine (μs 'den ms 'ye) sahip olmalıdır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : Jablonski diyagramı [58].

3.3. FDT'de Fotokimyasal İşlemler

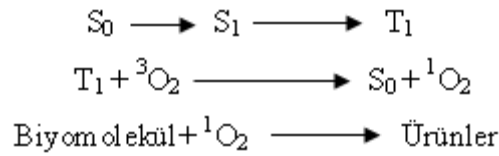
Triplet enerji seviyesine uyarılan molekül enerjisini iki yolla verebilir. Bunlar tip I ve tip II mekanizmasıdır.



Şekil 3.3 : Tip I reaksiyonu [60].

Tip I mekanizmasında (Şekil 3.3) serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır [60]. Bu mekanizmada; uyarılmış triplet enerji seviyesindeki FS, elektron veya H atomu transferiyle substrat veya çözücü ile tepkime vererek, radikalik iyonlar veya serbest radikaller açığa çıkarmaktadır. Oluşan bu radikaller oksijen ile tepkime vererek oksijen radikalleri oluşturur. Bunun sonucunda süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) vb. radikalik oksitler (ROS), hidroperoksil radikalleri veya hidrojen peroksit radikalleri (ROO^{\bullet}) oluşur. Ortamda su olması durumunda hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) de oluşabilir ve bu radikal biyomoleküller ile etkileşerek biyomolekül radikalleri ortaya çıkabilir [61].

Tip II mekanizmasında (Şekil 3.4), singlet oksijen oluşumu gözlenir ve triplet şeklinde uyarılmış FS, moleküler oksijene enerjisini aktararak temel seviyeye döner [60]. Bu durumda oldukça reaktif olan fakat radikal olmayan singlet oksijen (1O_2) oluşur. Buradan anlaşılacağı gibi FS'nin aktifliği direkt olarak oksijenle bağlantılıdır ve oksijenin olmadığı dokularda fotodinamik özelliği kaybolur. [61].



Şekil 3.4 : Tip II reaksiyonu [61].

3.4. FDT Etki Mekanizması

FDT'nin moleküler mekanizması, karşılıklı etkileşimlerle patolojik dokularda istenen etkinin elde edilmesini sağlayan üç toksik olmayan bileşene dayanmaktadır. Bu bileşenler FS, ışık dağıtımı ve singlet oksijendir.

3.4.1. Fotosensitizerler (FS)

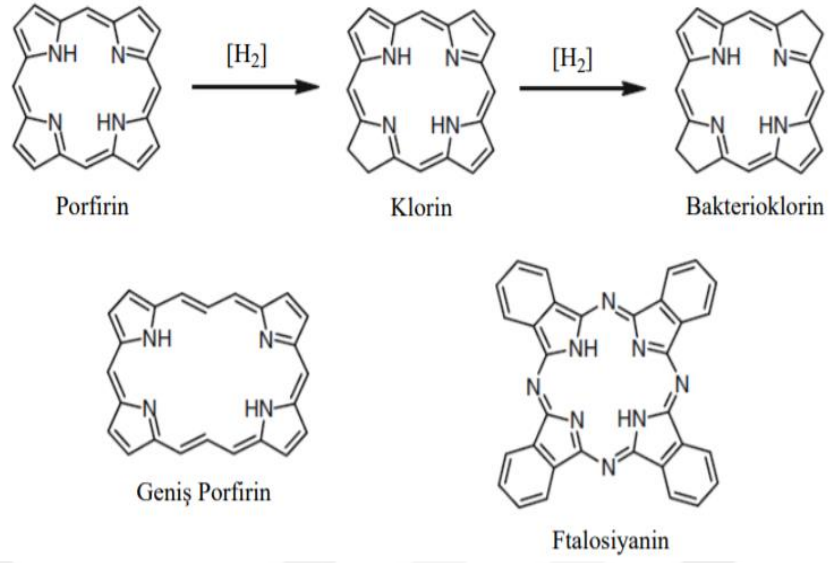
FDT deneylerinde çok sayıda FS'nin etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak analiz edilmesine rağmen, az sayıda FS'nin ideal özellik gösterdiği belirlenmiştir [62]. İdeal bir FS'nin ön koşulları arasında kimyasal saflık, tümör hücreleri için seçicilik, kimyasal ve fiziksel stabilite, uygulama ve tümör dokusunda maksimum birikim arasındaki kısa zaman aralığı

ve optimal doku penetrasyonu bulunmaktadır [63]. Bu kapsamda, porfirin kanser çalışmalarında FDT için ilk onaylanan FS olarak yer almıştır ve çalışmalarda FDT’de kullanılabilen doğal veya sentetik porfirinlere ve analogların geliştirilmesine odaklanılmaktadır [64,65].

FDT'nin diğer geleneksel kanser tedavilerine göre avantajları şunlardır:

- (i) FS'nin yalnızca ışık varlığında etkinleştirilmesi nedeniyle düşük sistemik toksisite,
- (ii) Tümör hücrelerini seçici olarak yok etme yeteneği,
- (iii) Tek başına veya kemoterapi, cerrahi, radyoterapi veya immünoterapi gibi diğer terapötik modalitelerle kombin halinde uygulanabilme ve
- (iv) Genellikle diğer kanser tedavilerine göre daha ucuz olması sıralanabilir [65].

İdeal olarak, bir FS ajanı hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikler taşıyan, seçici bir şekilde tümör dokusunda birikebilen ve normal hücrelerde minimum toksik etki göstermesi beklenen tek ve saf bir bileşik olmalıdır [66]. Çünkü sistemik olarak uygulanan FS belirli bir dereceye kadar hidrofilik özellik gerekirken, hedef hücrelere bağlanması için de bir dereceye kadar hidrofobik özellik göstermesi gereklidir. Ayrıca, 800 nm'den büyük dalga boylarında foton absorpsiyonu, moleküler oksijeni ışınlamasıyla oluşan singlet durumunu uyarmak için yeterli enerji sunmadığından dolayı, FS'nin etkin tedavide kullanılabilmesi için 600 ile 800 nm arasında iyi bir absorpsiyona sahip olmalıdır. Sonuç olarak, ışığın dokuya nüfuzu dalga boyu ile artırıldığından, kırmızı bölgede güçlü emiciliğe sahip klorlar, bakteriyoklorinler ve ftalosiyeninler gibi ajanlar, kanser tedavisinde terapötik etkiye sahiptir (Şekil 3.5) [67].



Şekil 3.5 : FDT'de kullanılan doğal ve sentetik FS'ler [68].

Diğer tedavilerde olduğu gibi FDT'deki temel zorluklardan biri FS'nin uygulanmasıdır. Etkili bir FDT tedavisi için, FS'lerin sağlıklı dokularda istenmeyen yan etkileri en aza indirmesi için seçici bir şekilde kanser hücrelerinde terapötik konsantrasyonlarda uygulanabilmesi gereklidir [69].

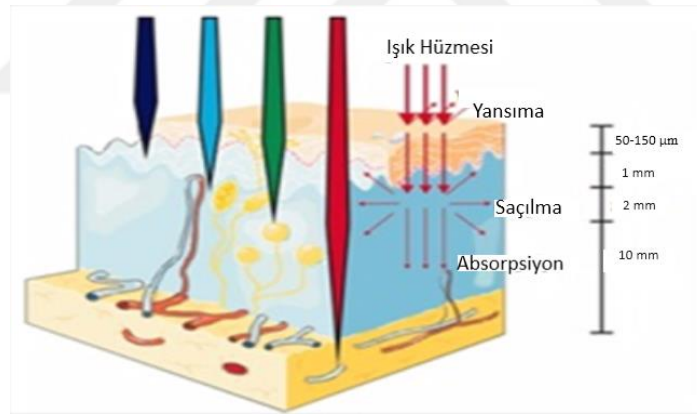
5-aminolaevulinik asit (ALA) aracılı FDT, FDT araştırmalarında en umut verici alanlardan biri haline gelmiştir. 5-ALA, fotosensitize edici protoporfirin IX'ın (PpIX) öncüsüdür. 5-ALA uygulamasının ardından uygun hücre içi PpIX seviyelerine ulaşıldığında, hedeflenen doku PpIX'i aktive etmek için görünür ışıkla ışınlanır ve hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır [69].

3.4.2. Işık dağıtımı

FDT'yi *in vivo* başarılı bir şekilde gerçekleştirmek için, hastalıklı dokuya yeterli ışığın ulaşmasını sağlamak gerekmektedir. Bu nedenle, ışığın çeşitli dokulardan nasıl geçtiğini ve soğurma ve saçılmanın göreceli etkilerini anlamak önemlidir [70]. Işık dokuya girdiğinde ya dağılır ya da emilir. Her iki işlemin kapsamı da, kullanılan doku tipine ve ışık dalga boyuna bağlıdır. Biyolojik doku homojen değildir ve mikroskobik homojensizliğin varlığı (makromoleküller, hücre organelleri, organize hücre yapısı, ara

tabakalar) onu bulanıklaştırır. Bulanık bir ortam içinde çoklu saçılma, bir ışık demetinin yayılmasına ve yön kaybına yol açmaktadır. Emilim büyük ölçüde hemoglobin, miyoglobin ve sitokromlar gibi endojen doku kromoforlarına bağlıdır [71].

Mavi ışık dokuya en az verimli şekilde nüfuz ederken, kırmızı ve kızılötesi radyasyonlar daha derinlemesine nüfuz etmektedir [72] (Şekil 3.6). 600 ile 1200 nm arasındaki bölge genellikle dokunun optik penceresi olarak adlandırılır. Bununla birlikte yaklaşık 800 nm'ye kadar olan ışık singlet oksijen (1O_2) üretebilir. Çünkü daha uzun dalga boyları, fotodinamik reaksiyonu başlatmak için yetersiz enerjiye sahiptir [50]. Aynı FS'ler için bile tek bir ışık kaynağı ideal değildir. Bu nedenle ışık kaynağı seçimi, FS absorpsiyonuna (floresans uyarımı ve eylem spektrumları), hastalığa (lokasyon, lezyonların boyutu, erişilebilirlik ve doku özellikleri), maliyet ve boyuta dayalı olmalıdır. FDT'nin klinik etkinliği, toplam ışık dozu, ışık maruz kalma süresi ve ışık uygulama modu (tekli, parçalı veya hatta metronomik) içeren karmaşık dozimetriye bağlıdır. Akıcılık oranı ayrıca FDT yanıtını da etkilemektedir [73].



Şekil 3.6 : Dokulardan ışık yayılımı [73].

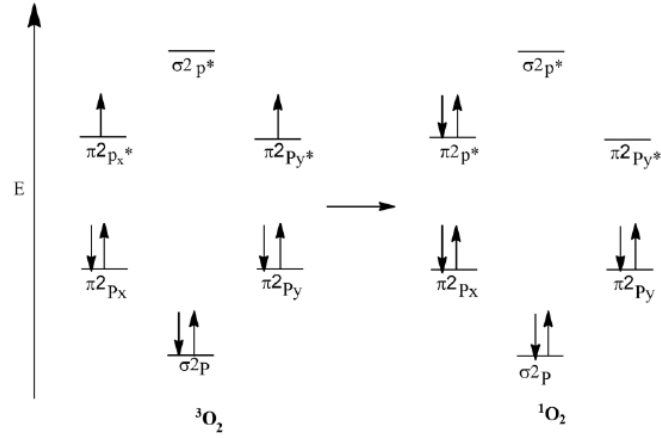
FDT için ışık kaynağı, sitotoksik bir etki oluşturmak için yeterli ROS üretmek için uygulanan FS'in maksimum absorpsiyon dalga boyu aralığı ile çakışan uygun spektral özellikler sergilemelidir [74]. Çoğu FS'in aynı zamanda floresans olması gerçeği, hastalıklı dokuya yeterli ışığın nüfuz etmesini sağlayarak, FDT ile birleştirilen çeşitli optik görüntüleme stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, fotodinamik lazer aracılı tedavide hastalıklı dokuya genellikle daha uzun bir ışık aralığı uygulanır ve bu uygulama hedeflenen dokuda en fazla doku tahribatı ile minimum ışık

saçılımı ve maksimum FS aktivasyonu ile artan penetrasyon derinliğine olanak sağlamaktadır [75].

Hem lazerler hem de akkor lambalar FDT için kullanılan ve benzer etkiler gösteren ışık kaynaklarıdır [76]. Büyük ve verimsiz pompalı boya lazerlerinin aksine, diyot lazerleri küçüktür ve uygun maliyetlidir, kurulumu kolaydır ve otomatik dozimetri ve kalibrasyon özelliklerine ve daha uzun bir çalışma ömrüne sahiptir. Işık yayan diyotlar (LED'ler) ise, nispeten dar spektral bant genişliklerine ve yüksek akıcılık oranlarına sahip alternatif ışık kaynaklarıdır [77,78]. Ayrıca, lazerler, idrar kesesi ve sindirim sistemindeki tümörleri tedavi etmek için difüzyon uçlu liflere bağlanabilir. İçleri güçlü şekilde dağılan bir malzeme ile kaplanmış ve bir organa uyacak şekilde şekillendirilmiş şişirilebilir balonlar da ticari olarak mevcuttur [79]. Bu nedenle, başarılı FDT için optimum FS, ışık kaynakları ve tedavi parametreleri kombinasyonlarının seçimi çok önemlidir [80,81].

3.4.3. Singlet oksijen

FDT'de, FS'ler ışıkla aktive edildiği zaman hücre ölümüne neden olan singlet oksijen oluşumuna neden olmaktadır. Singlet oksijen (1O_2), 1924'te bulunmuş ve oksijenin daha reaktif bir hali şeklinde tanımlanmıştır [79]. 1O_2 üretiminde ana metot fotosensitizasyon reaksiyonlarıdır [80]. 1O_2 nin bir boyanın içerisindeki moleküllerin uyarılması sonucu oluşan bir ara ürün olabileceği 1931 yılında Kautsky tarafından öne sürmüştür [81]. Sonraki yıllarda yapılan birçok araştırmada, 1O_2 biyomoleküllerin oksidatif nekroza uğraması ile ortaya çıkan kararsız bir ara ürün olduğu belirlenmiştir. 1O_2 protein, DNA, lipitler ve enzimler gibi birçok biyolojik yapı ile etkileşebilen bir üründür [82]. 1O_2 bulunduğu ortamlarda uyarılmış haldeki moleküllerle etkileşerek bu molekülleri hızlı bir şekilde dönüştürmektedir. Genellikle FDT'nin etkinliği, tümörlü dokuda üretilen 1O_2 miktarına bağlıdır [83].



Şekil 3.7 : Triplet ve singlet oksijen elektron dağılımını gösteren moleküler orbital diyagramları [84].

Dış elektronlardan birinin dönüş yönünün değiştirilmesi ile üretilen $^1\text{O}_2$ yüksek ölçüde reaktiftir (Şekil 3.7) [84]. $^1\text{O}_2$ aldığı enerjiyi dalga enerjisi şeklinde çevreye salarak tekrar moleküler oksijen haline dönebilir. $^1\text{O}_2$ ortamdaki diğer moleküllere enerjisini transfer ederek veya kovalent bağlanma ile reaksiyon vermektedir [85,86].

Klinik öncesi çalışmalarda, FDT başarısında $^1\text{O}_2$ önemi gösterilmiş ve ışık gücünün tedavilerdeki kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur [87,88]. Özetle, FDT etkinliği ışıma sonucu kanserli hücrede oluşan singlet oksijen ile bağlantılıdır ve dokudaki moleküler oksijenin konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir [89]. Bu nedenle hipoksik hücrelerin FDT'ye karşı daha kararlı olduğu görülmekte ve kanser hücresindeki oksijenasyonu arttırmak için yenilikçi yaklaşımlar bu tedavinin etkin ve başarılı bir şekilde kullanılmasında gerekli olabilmektedir [90].

3.5. Hücre Lokalizasyonu

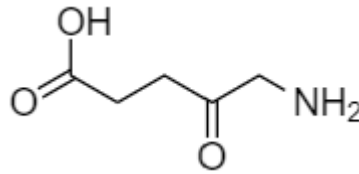
FDT'nin sonucunu belirleyen en önemli faktör, FS'in hedef doku veya tümör içindeki hücrelerle nasıl etkileşime girdiğidir. Bu etkileşimin temel özelliği, FS'nin hücredeki lokalizasyonudur. Çünkü FS, mitokondri, lizozomlar, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve plazma membranları gibi birçok farklı hücresel organel içinde lokalize olabilir [91].

Kültüre edilmiş hücrelerde farklı yapılara sahip FS'nin hücre içi lokalizasyonu farklılık göstermektedir. Bu farklılığa neden olan önemli yapısal özellikler, -4 anyonik ile +4 kationik arasında değişebilen net iyonik yük, oktanol/su bölme katsayısının logaritması olarak ifade edilen hidrofobiklik derecesi ve FS molekülünde mevcut asimetri derecesidir. Hidrofobik olan ve iki veya daha az negatif yüklü FS'ler hücre kültürü ortamında nispeten düşük konsantrasyonlarda uygulandığında plazma membranı boyunca yayılabilir ve daha sonra diğer hücre içi membranlarla yer değiştirebilir. Diğer yandan, daha az hidrofobik olan ve ikiden daha az negatif yükü olan FS'ler, plazma membranı boyunca yayılamayacak kadar polar olma eğilimindedir ve bu nedenle endositoz yoluyla alınmaktadır [92].

Kanser hücreleri tarafından FS alımı, etkili FDT için çok önemlidir. Çünkü ROS, kısa bir yarı ömre sahiptir ve FS ile ışığa maruz bırakılmış hücrelerde meydana gelen fotohasarın türü, FS'nin hücre içindeki lokalizasyonuna bağlıdır. Bu nedenle, FS lokalizasyonunu anlamak, her uygulama için en etkili FS'yi seçerken dikkate alınması gereken önemli bir ilkedir [93].

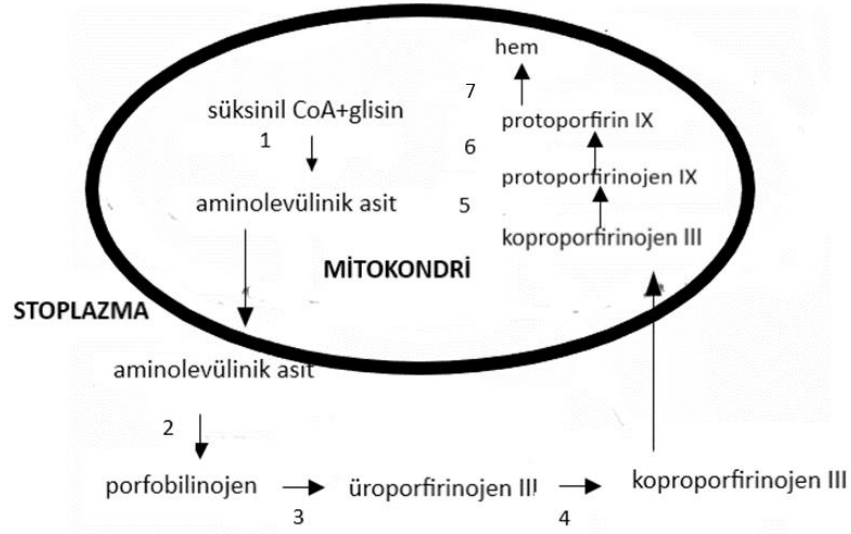
3.6. Fotodinamik Terapide 5-ALA'nın Yeri

5- ALA, hemoglobin ve klorofilin ortak bir öncüsü olan, hayvanlarda ve bitkilerde bulunan doğal bir aminoasittir (Şekil 3.8) [94].



Şekil 3.8 : 5-ALA kimyasal yapısı [94].

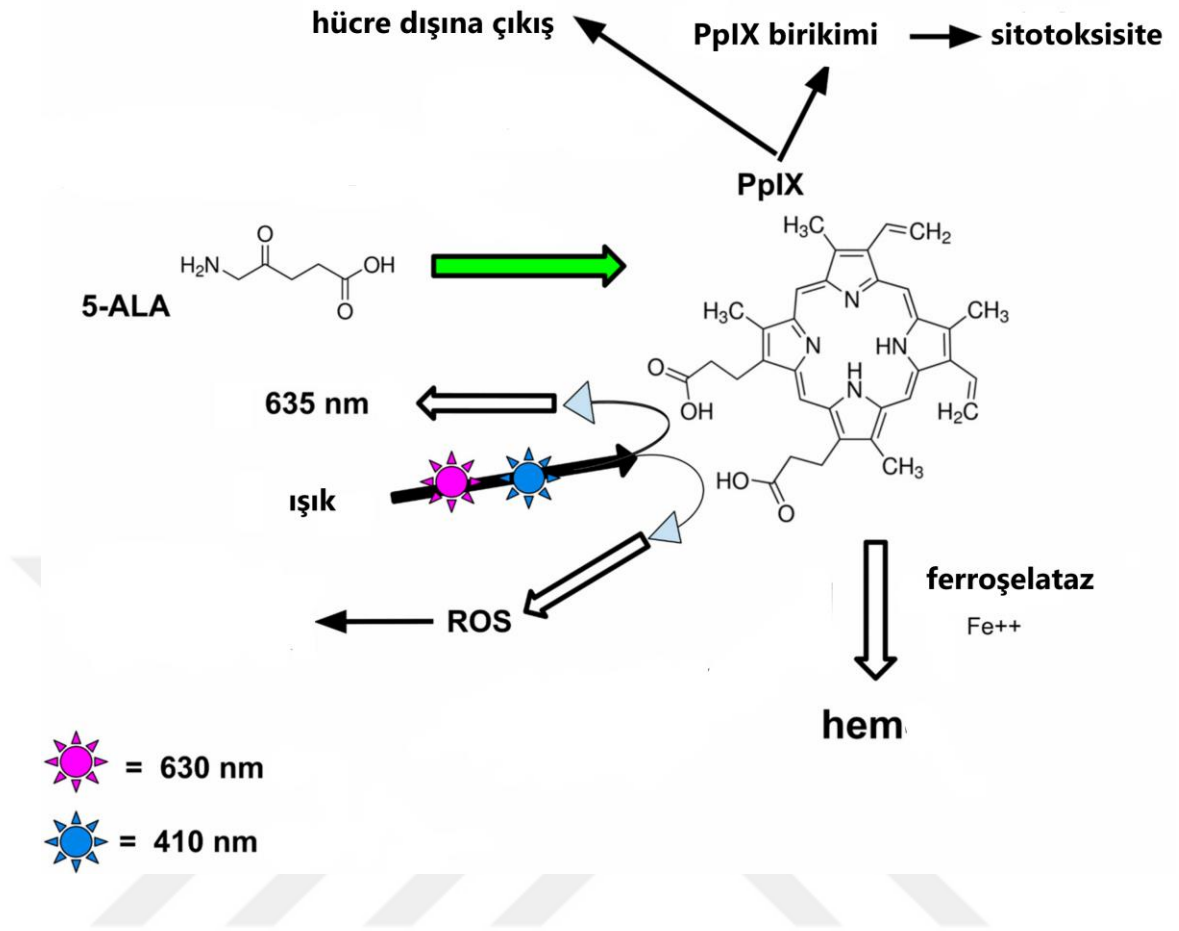
5- ALA, neoplastik hücrelere ön ilaç olarak uygulandığında FS olarak protoporfirin IX (PpIX) birikimini indükleyen hem sentezinde doğal bir ara üründür (Şekil 3.9) [94]. Demir (Fe^{+2}), ferroşelataz enzimi (FECH) aracılığıyla hem oluşturmak için PpIX'e dahil edilir. Hem, PpIX'in aksine, FS özelliklerinden yoksundur, çünkü demirin şelasyonu hem floresansı hem de 1O_2 oluşumunu durdurmaktadır.



Şekil 3.9 : Hem biyosentezi [91].

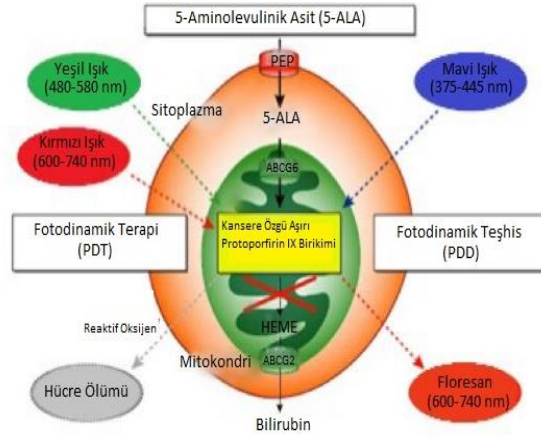
Şekil 3.9’da gösterildiği üzere; 5- ALA/FDT'nin ana varlığı, tümör hücrelerinde PpIX birikiminin çok daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu, esas olarak iç mitokondriyal membranda bulunan önemli ölçüde daha düşük FECH'dan kaynaklanmaktadır ve kanser hücrelerinde geliştirilmiş porfobilinojen deaminaz (PBGD) aktivitesi, PpIX'in heme dönüşümünün azalmasına yol açmaktadır. PpIX, 5-ALA uygulamasından sonraki 24 saat içinde heme dönüştürülerek, FDT ile ilişkili yan etkilerden biri olan hastalarda uzun süreli cilt fotosensitivitesine neden olmamaktadır [96]. Ayrıca, hidrofilik ve nispeten küçük bir molekül olan 5- ALA'nın, sistemik olarak uygulanması, klinikte FDT için sıklıkla kullanılan diğer büyük ve lipofilik FS'lere göre daha kolaydır [95].

5-ALA uygulamasının esas amacı, PpIX sentezini arttırmak, PpIX dönüşümünü azaltmak ve PpIX çıkışını inhibe etmektir. Bu olayları sonucunda ise ortamda PpIX miktarını arttırılmış olur (Şekil 3.10). Hücre içinde çok fazla ve çok özel bir protoporfirin birikimi meydana gelmektedir. 5-ALA hücrede mitokondri organelinin içine girer ve hücre sitoplazmasında 5-ALA porfobilinojene dönüşür. Porfobilinojen, porfobilinojen enzimi aracılığı ile üroporfobilinojene dönüşür ve üroporfobilinojen, ko-porfobilinojene dönüşerek hücrede mitokondri organeline girer ve burada PpIX’e dönüşür. Demir katalizi ile protoporfirin heme dönüşerek hemoglobine katılır [91].



Şekil 3.10 : 5-ALA'nın PpIX'e dönüşümü [91].

5 ALA/FDT, kanserli hücrelerde birikmiş PpIX moleküllerinin, düşük güçte görünür kırmızı ışık (600-740 nm) ve yeşil ışık (450-580 nm) gibi belirli ışık dalga boyları tarafından uyarıldığında ışık enerjisini emerek, bir uyarma durumuna yükselmesi ve daha sonra temel duruma dönmesiyle açıklanır (Şekil 3.11) [96,97]. Bu geçiş aşamasında, enerji dönüşümü ile hidroksi radikalleri, singlet oksijen, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri üretilir. Bu fotokimyasal reaksiyonların ürettiği reaktif oksijen türleri kanser hücrelerine zarar vererek hücre ölümüne yol açan apoptozu indüklemektedir [98,99]. Apoptotik hücrelerde sitoplazmik yoğunlaşmanın yanı sıra sitoplazmik ve nükleer parçalanma meydana gelmektedir. Bu durumdaki hücreler, makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositler tarafından hızla fagositize edilerek, çevredeki hücre ve dokularda minimum hasar gerçekleşmesini sağlar [100]. Diğer bir deyişle, antikanser etkinliğini esas olarak apoptoz ile gösteren 5-ALA- FDT, çok az yan etkiye sahip minimal invaziv bir tedavi şeklidir.



Şekil 3.11 : 5-ALA ve fotodinamik terapi [96,97].

5-ALA ve diğer FS (Ce6, indisiyanin yeşili) temelli FDT çalışmaları incelendiğinde; 5-ALA'nın akciğer, kolon, meme, over gibi kanser türlerinin terapötik etkisinin belirlenmesine yönelik *in vitro* çalışmalar olduğu görülmektedir [100-107]. Bu çalışmalarda kullanılan 5-ALA'nın dozu, ışık kaynağı ve kanser hücre tipleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Literatürde yer alan *in vitro* FDT çalışmaları

Kanser Hücre Hatları	Doz	Işık kaynağı ve dozu	Kaynakça
MCF-7 ve HepG2	0.5 ve 2 mM 5-ALA	633 nm He-Ne lazeri 60 J 4 dakika	[101]
MCF-7 ve MDA-MB-231	1 ve 2.5 mM 5-ALA	635 nm diyot lazer 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm ²	[102]
MIA PaCa-2 ve MRC-5	10 µM Ce6 (Klorin e-6)	670 nm diyot lazer 5J/cm ²	[103]
4T1	Dkk-3 (20, 40 ve 80ng/ml) ve 1 mM 5-ALA	635 nm diyot lazer 1, 3 ve 6 J/cm ²	[104]
SCC25	5, 10, 25, 50 ve 100 mg/L 5-ALA	635 nm diyot lazer 10.4 J cm ²	[105]
4T1	1 mM 5-ALA	632 nm diyot lazer 5 J /cm ²	[106]
PC-3	100 µL besiyeri ile birlikte indisiyanin yeşili	808 nm diyot lazer 100 J/cm ²	[107]
MCF-7 ve MDA-MB-231	1 mM 5-ALA	635 nm LED 6, 9, 12, 18 ,24, 30 J/cm ²	[108]

BÖLÜM 4. MALZEME VE YÖNTEM

4.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir.

- -80°C derin dondurucu (Haier, Çin)
- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Stuart, Birleşik Krallık)
- Distile su cihazı (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Hassas Terazi (Shimadzu, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- CO₂ inkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Inverted mikroskop (BestScope, Çin)
- Countees hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- EVOS Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- ELISA Plaka Okuyucu (Hangzhou Allsheng, Çin)
- LAXCELL T3000 Fotodinamik Terapi Lazer Cihazı (Bio-Optics, Kore)
- Fiber optik Kablo (Thorlabs, Almanya)
- Güç ölçer (PM100, Thorlabs, Almanya)
- Kolimatör (Thorlabs, Almanya)

4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir.

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Millipore, Almanya)
- 5-Aminovelünik Asit (5-ALA) (Sigma, A3785)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12), (DMEM/F-12) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) (Sigma-Aldrich)
- Tripsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) reaktifi (Biovision, ABD)
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
- Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD)
- Etidyum bromür (Amresco, ABD)
- Etanol (Merck Millipore, Almanya)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- Tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

4.3. Hücre Kültürü

4.3.1. Hücre hatlarının temini ve hücrelerin özellikleri

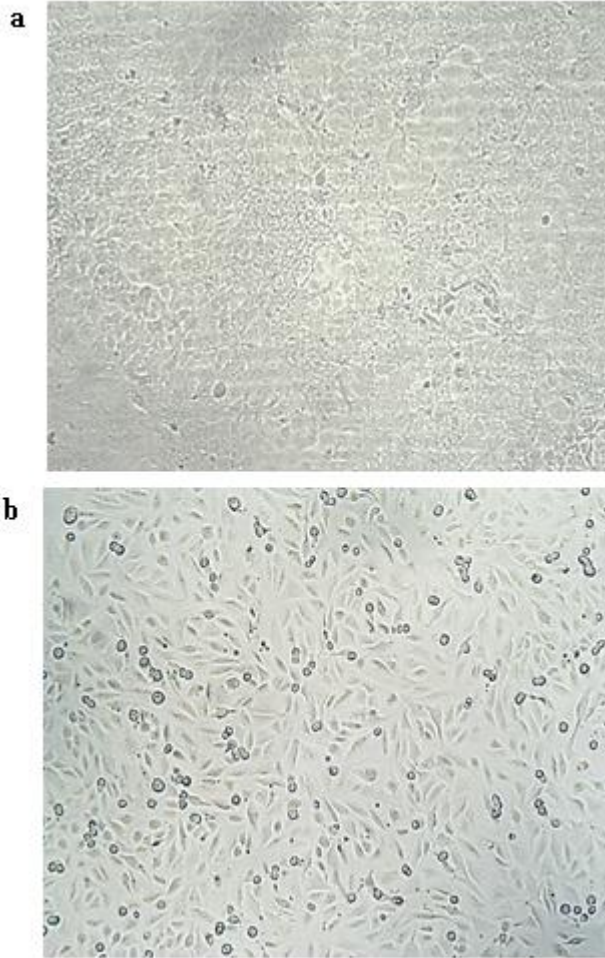
Bu çalışmada HSK hücre hatları viral hepatit B virüsü içeren SNU-449 (ATTC® CRL-2234) hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak satın alınmıştır. Bir diğer HSK hücre hattı olarak Huh-7 (ATTC® HB-8065) hücre hattı Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Doç. Dr. Yasemin Eraç tarafından hediye edildi.

4.3.2. Besiyerlerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları

SNU-449 hücre hattı için besiyeri sodyum bikarbonat ve L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyerinde % 10 FBS, % 1 Penisilin/Streptomisin ilave edilerek hazırlandı. Huh-7 hücre hattı için ise DMEM/F-12 besiyerine % 10 FBS, % 1 Penisilin/Streptomisin eklenerek

hazırlandı. Huh-7 ve SNU-449 hücreleri uygun besiyerleri içerisinde, 37°C’de %5 karbondioksit (CO₂) bulunan inkübatörde kültüre edildi.

Hücre stokları -80°C’den çıkarılarak 37°C su banyosunda çözüldü. İçerisine hazırlanan uygun besiyeri eklenerek 25 cm² filtreli flasklara ekildi. Hücrelerin çoğalması her gün inverted mikroskop ile kontrol edildi ve besiyerleri yenilendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : (a) Huh-7 ve (b) SNU-449 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri

4.3.3. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler %80-90 doygunluğa ulaştığında pasajlandı. Hücrelerin pasajlanması için; hücrelere özgü besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 1 kez yıkandı. Ardından hücrelerin kaldırılması için 1X Trypsin/EDTA solüsyonu (%0.25) eklenerek inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Sonrasında, süspansiyon halindeki hücre

solüsyonu serolojik pipet yardımıyla 15 ml hacimli falkon tüp içerisine alındı. Tüpe alınan süspansiyon 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, hücrelerin süpernatantı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 mL taze besiyeri ile süspansiyon edildi. Yoğunluğuna uygun olarak 75 cm²'lik flaska bölündü ve pasajlanan hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

4.3.4. Hücrelerin sayımı, dondurulması ve saklanması

Hücrelerin sayılması için, süspansiyon halindeki hücreler bir ependorf tüp içerisine 10 µL alınarak 10 µL tripan mavisi ile pipetlendi. Boyanan hücreler Countess hücre sayım cihazında (Invitrogen, ABD) sayıldı.

Dondurulma işlemi için, hücre pelleti 900 µL besiyeri ile süspansiyon edildi ve ependorf tüpler içerisine aktarıldı. Üzerine 100 µL DMSO eklenerek hücreler -80°C'de stoklandı.

4.4. Fotodinamik Tedavi Protokolü

4.4.1. 5-ALA uygulanması

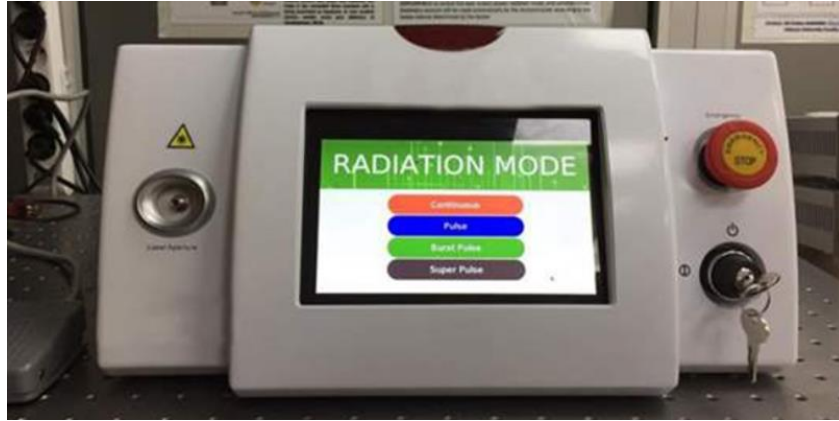
5-aminolevulinik asit hidroklorür (5-ALA, Sigma, A3785) steril su içinde çözüldü. Hücreler, uygun besiyeri ortamında 96 ve 12 hücre kültürü plakalarına ekildikten sonra 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, FBS içermeyen DMEM ortamında 1 mM konsantrasyonda taze hazırlanmış 5-ALA ile 4 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, ortamdaki 5-ALA içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve FBS içeren taze besiyeri eklendikten sonra lazer uygulamaları gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 : Lazer uygulamasından önce FBS içeren taze besiyeri uygulaması.

4.4.2. Lazer uygulaması

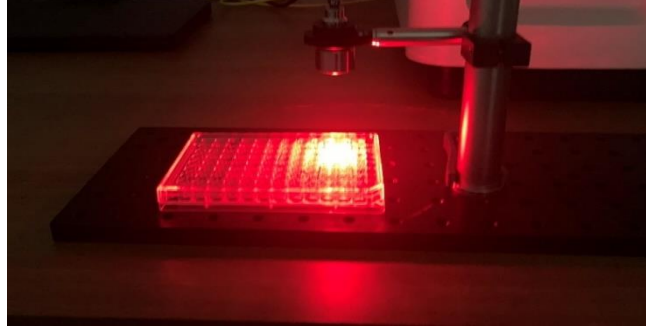
Yapılan deneylerde lazer uygulaması, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Enstrümantasyon Laboratuvarında TÜBİTAK 1005 projesi kapsamında geliştirilen çok modlu 635 nm dalgaboyuna sahip LAXCELL T3000 fotodinamik terapi lazer cihazı ile yapılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 : Lazer cihazı

Tüm deneylerde, lazer ışık kaynağının dalga boyu ± 3 nm ile 635 nm olarak belirlenmiştir. Cihazın optik çıkış gücü maksimum 1.5 Watt değerine kadar ulaşmaktadır. Yapılan deneylerde sürekli dalga (CW) modu kullanılmıştır. Lazer ışıma için 3 J/cm^2 , 6 J/cm^2 , 9 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 güç yoğunlukları belirlenmiştir (Tablo 4.1). Deney öncesi çıkış gücü güç-ölçer (PM100 Thorlabs Almanya) ile

ölçülmüştür. Akıcılık hızı 30 mW/cm^2 de farklı güç yoğunlukları elde etmek için kullanılmıştır (Tablo 2). Kontrol hücreleri, ışığa olmadan aynı ortamda inkübe edilmiştir (Şekil 4.4).



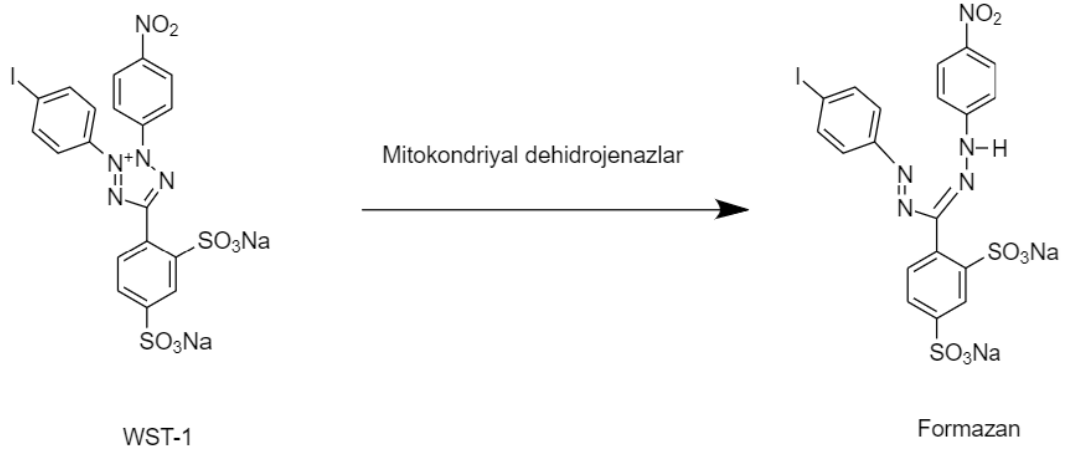
Şekil 4.4 : Lazer uygulaması.

Tablo 4.1 : 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin radyasyon parametreleri.

Radyasyon Parametreleri	
Dalgaboyu (nm)	$635 \pm 3 \text{ nm}$
Mod	CW
Güç çıkışı	30 mW
Maruz kalma süresi (s)	100,200,300,400,
Enerji yoğunluğu (J/cm^2)	3,6,9,12
Fotosensitizör	5-ALA

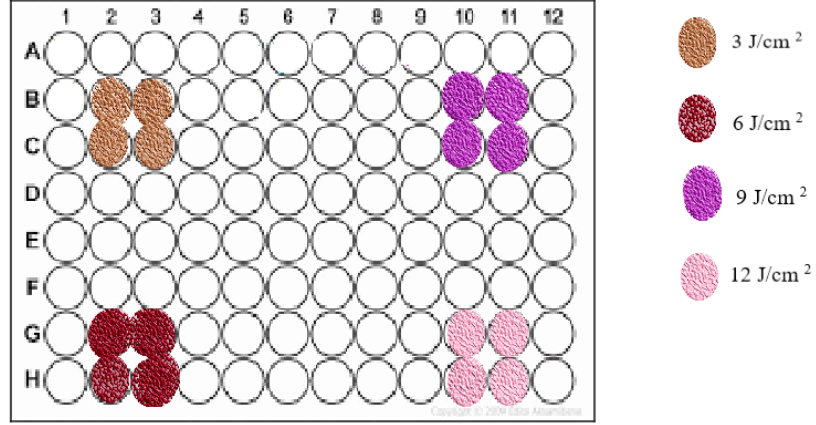
4.5. Hücre Proliferasyon Analizi

WST-1 testi çeşitli hücre tiplerinde hücre proliferasyonu, canlılık ve sitotoksitite belirlenmesinde kullanılan kolorimetrik bir testtir. Aynı zamanda kanser kemoterapisinde anti-kanser ilaçların etkin dozlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. WST-1 çalışma prensibi, tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondriyal dehidrojenaz tarafından formazona dönüşmesine dayanır (Şekil 4.5). Dehidrojenaz aktivitesiyle oluşan boyayla meydana gelen renk değişikliği canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Canlı hücreler tarafından üretilen formazon boyası 450 nm dalga boyunda absorbanı vermektedir [109].



Şekil 4.5 : WST-1 mitokondriyal enzimlerle formazana indirgenmesi [109].

5-ALA'nın Huh7 ve SNU-449 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için (WST-1) boyası kullanıldı. WST-1 deneyi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara, her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde $100 \mu\text{L}$ besiyeri ile birlikte ekildi. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 1 mM 5-ALA 4 saat boyunca hücrelere uygulandıktan sonra, hücrelerde 3 J/cm^2 , 6 J/cm^2 , 9 J/cm^2 ve 12 J/cm^2 güç yoğunluklu lazer ışınları gerçekleştirildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 4.6). İnkübasyon sonunda her bir kuyucuk için $10 \mu\text{l}$ WST-1 solüsyonu eklendi ve reaksiyonun gerçekleşmesi için 45 dakika 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ELISA okuyucu cihazında (Allsheng, Çin) 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. 5-ALA ile muamele edilmeyen kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları kontrole kıyasla % olarak hesaplandı.

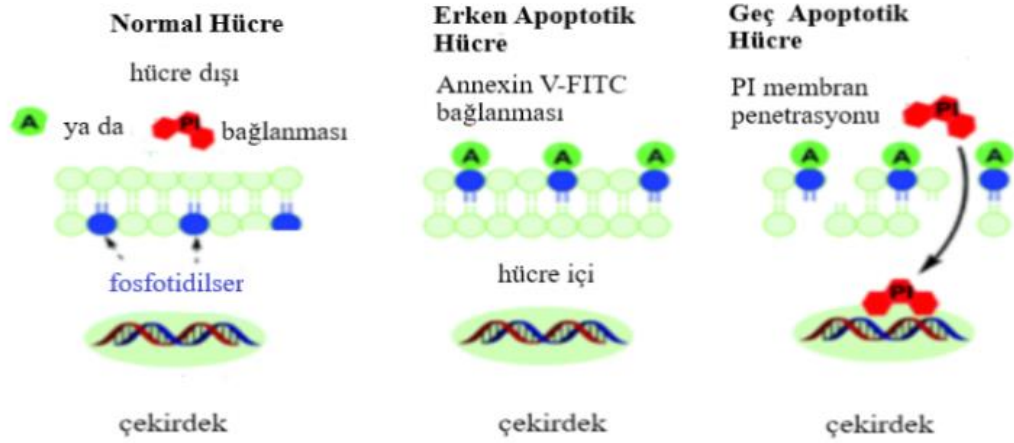


Şekil 4.6 : WST-1 analizi için 96 kuyucuklu plaka düzeneği.

4.6. Apoptozun Belirlenmesi

4.6.1. Annexin V analizi

Apoptoz sırasında hücrelerin zarında değişimler meydana gelir. Bu değişimlerden en belirgin olanı normalde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde yer alan fosfatidilserinin, apoptoz başladıktan sonra hücre zarının dış yüzüne geçiş yapmasıdır. Apoptotik hücrelerin tespitinde, hücrelerde meydana gelen bu fizyolojik değişimlerden yararlanır. Apoptoza uğrayan hücrelerin belirlenmesinde Annexin V yöntemi kullanılmaktadır. Annexin-V antikorı, apoptoz sırasında hücrelerin zarlarında bulunan fosfatidilserine yüksek affinite ile bağlanan bir proteindir. Annexin V yöntemi ile hücreler henüz zar bütünlüklerini kaybetmeden erken apoptoz aşamasında tespit edilebilmektedir. Geç apoptotik evrede ise hücre zarının bütünlüğü bozulduğu için, hücreler Annexin V-FITC ve propidyum iyodür (PI) ile boyanmaktadır. Nekrotik hücreler ise sadece PI ile boyanmaktadır (Şekil 4.7) [111].



Şekil 4.7 : Annexin V yöntemi ile apoptoz aşamaları [111].

5-ALA'nın WST-1 verilerine göre en etkin olduğu belirlenen 9 ve 12 J/cm² ile uyarılmış ışınması sonucunda hücrelerde neden olduğu apoptotik etki Annexin V analizi ile belirlenmiştir. Annexin V analizi için, her bir hücre grubu 12 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra 1 mL besiyerinde 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelere 1 mM 5-ALA uygulandıktan sonra 9 ve 12 J/cm² enerji yoğunluklu lazer ışınması gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra tripsin ile hücreler kaldırıldı ve ependorf tüplere alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti PBS yıkandı. Yıkama sonrasında pellet PBS ile süspanse edildi ve hücreler 100 µL Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit ile 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Boyanan hücreler Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analize alındı. Deneyler üç kez tekrarlandı.

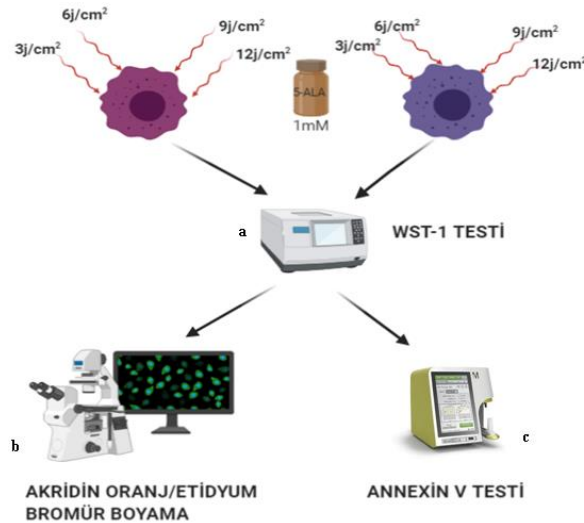
4.6.2. Akridin oranj/Etidyum bromür boyama

Apoptotik süreçteki hücrelerin, hücre zarı ve nükleusundaki değişikliklerin görüntülenmesi için Akridin oranj (AO)/Etidyum bromür (EB) boyaması gerçekleştirilmektedir. AO ve EB nükleik asitler ile etkileşime giren floresan boyalardır. AO, DNA arasına giren hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan yeşil floresan renk veren bir boyadır. EB ise zar bütünlüğünü kaybetmiş, ölü hücreleri boyamaktadır. EB zar yapısı bozulan nekrotik hücreleri boyayan, DNA arasına giren turuncu renkli floresan bir

boyadır. Canlı hücreler ve apoptozun erken dönemindeki hücreler de yeşil renkte gözlenmektedir. Çekirdekte görülen yoğunlaşma ve kromatin fragmentasyonundan dolayı apoptozun erken dönemindeki hücrelerde daha koyu parlak yeşil renkli noktalar gözlemlenir. Apoptozun geç dönemindeki hücreler ise, EB ile turuncu/kırmızı rengine boyanmaktadır. Zar yapısı bozulan nekrotik hücreler ise EB ile boyandığı için turuncu/kırmızı renkte görülmektedir [112].

5-ALA'nın Huh-7 ve SNU-449 hücreleri üzerindeki morfolojik etkisinin değerlendirilmesi için, AO/EB boyaması yapıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde 1 mL besiyeri ile ekildi ve 37°C , %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelere 1 mM 5-ALA uygulandıktan sonra 9 ve 12 J/cm^2 enerji yoğunluklu lazer ışınması gerçekleştirildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyuya 1 mL %4'lük paraformaldehit eklenerek 30 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında her bir kuyu PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Her bir kuyuya 1 mL AO/EB solüsyonu eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Boyama işleminden sonra kuyular 3 kez PBS ile yıkandı. Boyanan hücreler EVOS Hücre Görüntüleme Sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

Yöntem kısmında yapılan uygulamalar özet olarak Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8 : Farklı güç yoğunluklu lazer ışınması sonrasında HSK hücrelerinde 5-ALA/FDT'nin (a) WST-1 canlılık analizi ile sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi, WST-1 analizine göre en etkin çıkan güç yoğunluklarının HSK hücrelerinde (b) AO/EB boyamasıyla morfolojik değişimlerin görüntülenmesi ve (c) Annexin V ile apoptotik etkilerin belirlenmesi.

4.7. İstatistiksel Analiz

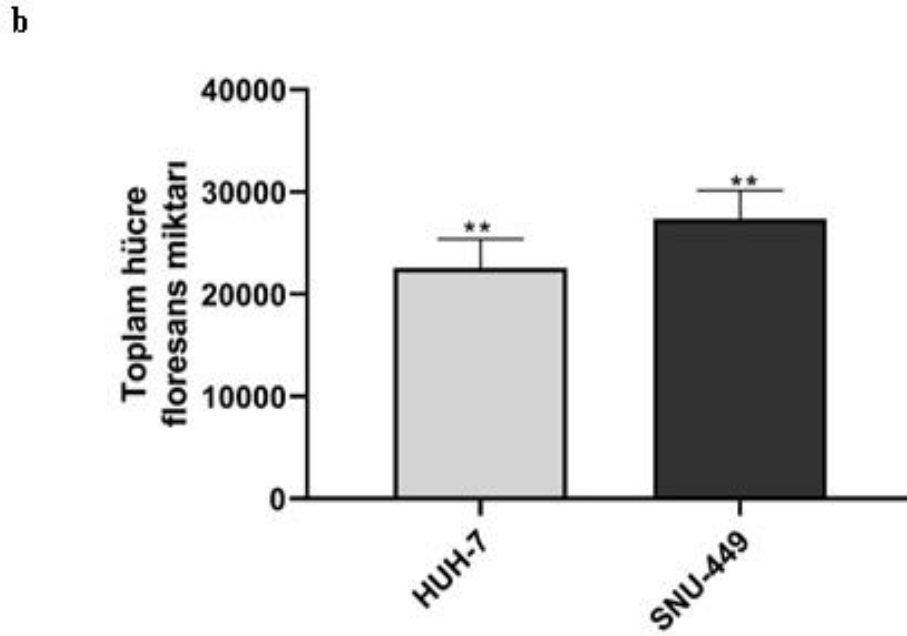
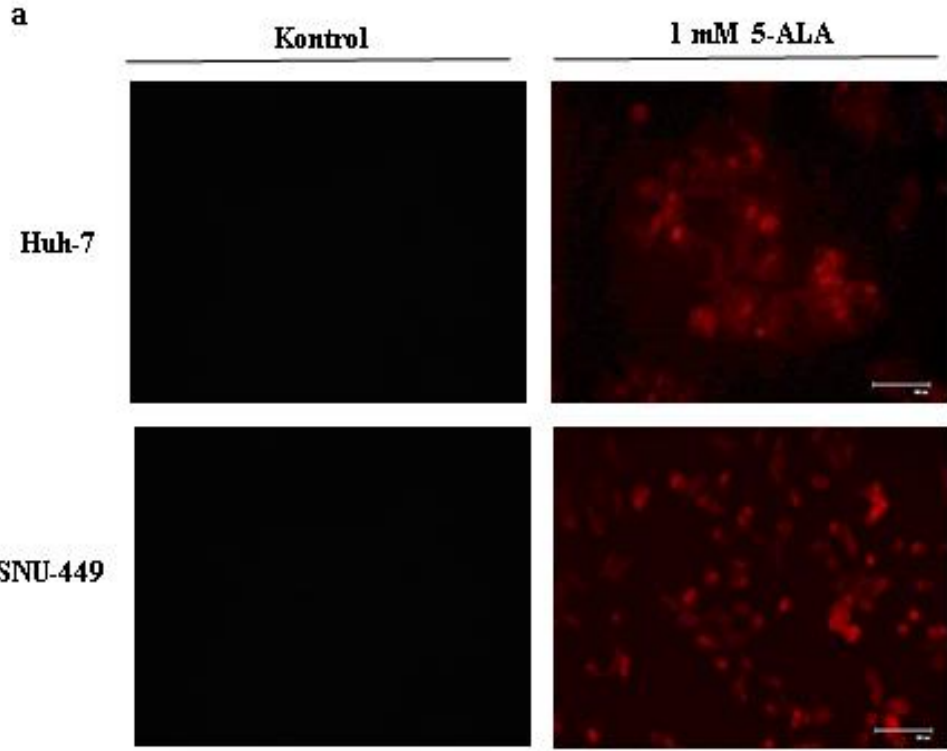
İstatistiksel analiz çalışmaları için GraphPad Prism 6.0 programından yararlanıldı. Elde edilen verilerin gruplar arası farklılıkları istatistiksel anlamlılık açısından One Way ANOVA (Post-hoc Tukey) analizi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



BÖLÜM 5. BULGULAR

5.1. HSK Hücre Hatlarında İntraselüler PpIX- floresans Miktarının Belirlenmesi

Huh-7 ve SNU-449 hücre hatlarında intraselüler PpIX seviyesinin belirlenmesi için, Şekil 5.1'de gösterildiği gibi hücreler 4 saat boyunca 1 mM 5-ALA inkübe edildikten sonra, 628±40 nm kırmızı filtrede görüntüleri alınmıştır. Şekil 5.1 (a)'da görüldüğü üzere SNU-449 hücrelerinde intraselüler PpIX miktarının Huh-7 hücrelerine göre daha fazla olduğu görüntülenmiştir. Ayrıca, hücrelerdeki toplam intraselüler PpIX seviyesi, Huh-7 hücrelerinde 22559.35±2858.5 iken, SNU-449 hücrelerinde 27335.86±2787.5 olarak analiz edilmiştir (Şekil 5.1 (b)). Sonuç olarak, 4 saat boyunca 1 mM 5-ALA uygulanan Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde kontrol grubuna göre intraselüler PpIX seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.01$) ve bu artışın SNU-449 hücrelerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir.



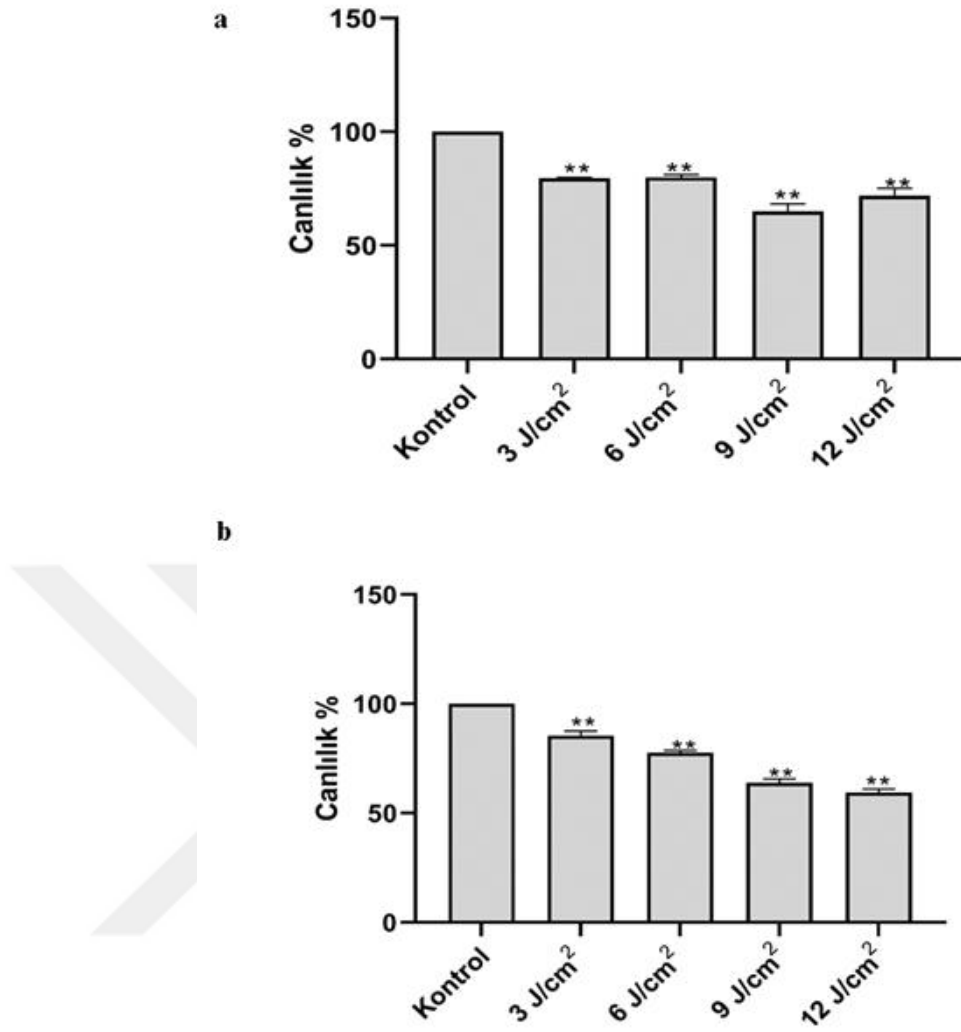
Şekil 5.1 : 1 mM 5-ALA uygulanan Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde intraselüler PpIX miktarı (a) Kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak HSK hücrelerinde intraselüler PpIX miktarına ait görüntüler (b) Hücrelerde intraselüler PpIX floresans miktarının statiksel karşılaştırılması ($p < 0.01^{**}$).

5.2. HSK Hücrelerinde 5-ALA/FDT'nin Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde 3, 6, 9, 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınım sonrası hücreler üzerinde 5-ALA'nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen WST-1 canlılık analizi sonuçları Şekil 5.2 ve Tablo 5.1'de verilmiştir.

1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde 3,6,9,12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınım sonrasında 24 saatte canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (p<0.01). 5-ALA uygulanan Huh-7 hücrelerinde 3, 6, 9, 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınımı yapıldıktan ve 24 saat inkübatörde inkübe edildikten sonra, hücrelerde canlılık oranlarının sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %79.56±0.35, %79.96±1.22, %65.00±3.32, %71.85±3.39'a azaldığı belirlenmiştir (p<0.01; Şekil 5.2 (a)).

5-ALA uygulanan SNU-449 hücrelerinde 3, 6, 9, 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınımı yapıldıktan ve 24 saat inkübatörde inkübe edildikten sonra, canlılık oranları sırasıyla %85.39±2.11, %77.53±1.19, %63.78±1.87, %59.46±1.55 olarak belirlenmiştir ve canlılık oranlarında azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.01; Şekil 5.2 (b)).



Şekil 5.2 : Farklı güç yoğunluklu lazer ışınma sonrasında **(a)** Huh-7 ve **(b)** SNU-449 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin WST-1 analizi sonuçları ($p < 0.01^{**}$).

Tablo 5.1 : 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak Huh-7 ve SNU-449 sitotoksosite sonuçları.

	Huh-7	SNU-449
Kontrol	%100	%100
3 J/cm²	%79.56±0.35	%85.39±2.11
6 J/cm²	%79.96±1.22	%77.53±1.19
9 J/cm²	%65.00±3.32	%63.78±1.87
12 J/cm²	%71.85±3.39	%59.46±1.55

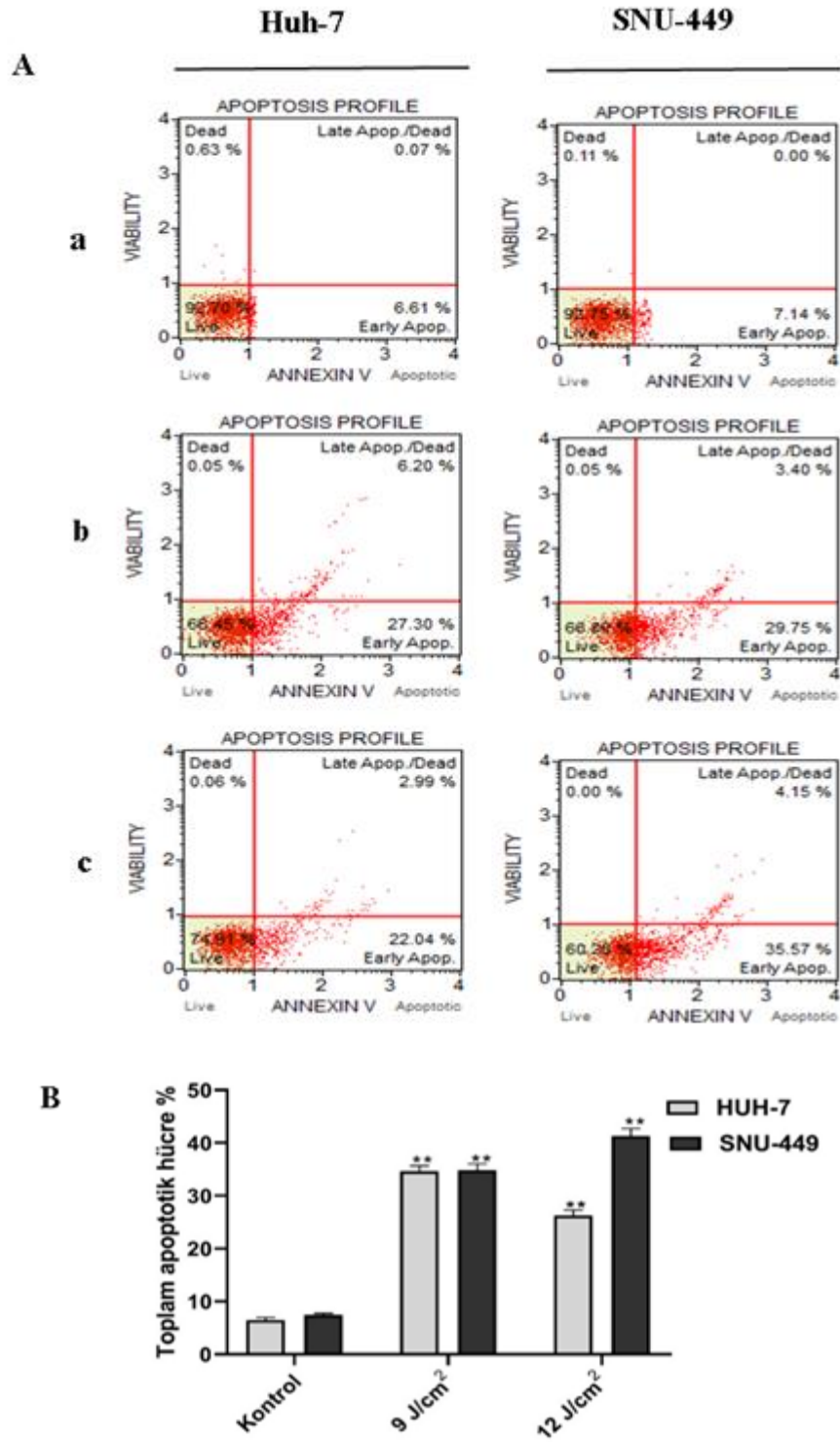
Sonuç olarak, Huh-7 ve SNU-449 hücre hatlarında lazer ışınmasına bağlı olarak anlamlı bir şekilde 5-ALA'nın sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5.1). Ayrıca,

özellikle 12 J/cm² güç yoğunluğundaki lazer ile FDT tedavinin SNU-449 hücrelerinde en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

5.3. Annexin V Analizi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde WST-1 analizine bulgularına göre en etkin olarak seçilen lazer ışınlarını temelli FDT'nin hücrelerde neden olduğu apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla Annexin V analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 5.3'te sunulmuştur.

1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınları sonrasında 24 saatte hücrelerde apoptotik ölümün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0.01). Huh-7 hücre hattında 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınlarından sonra elde edilen toplam apoptotik hücre ölüm oranları sırasıyla %34.66±1.04 ve 26.24±1.09 olarak belirlenmiştir (p<0.01**). SNU-449 hücre hattında 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışınları sonrasında elde edilen toplam apoptotik hücre ölüm oranları sırasıyla %34.79±1.25 ve 41.31±1.40 olarak belirlenmiştir (p<0.01**).



Şekil 5.3 : Farklı güç yoğunluklu lazer ışınma sonrasında (A) Huh-7 ve SNU-449 hücre hatlarında Annexin V analizi sonuçları a) Kontrol b) 9 J/cm² c) 12 J/cm² (B) Huh-7 ve Snu-449 hücrelerinin toplam apoptotik hücre yüzdesinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (p<0.01).

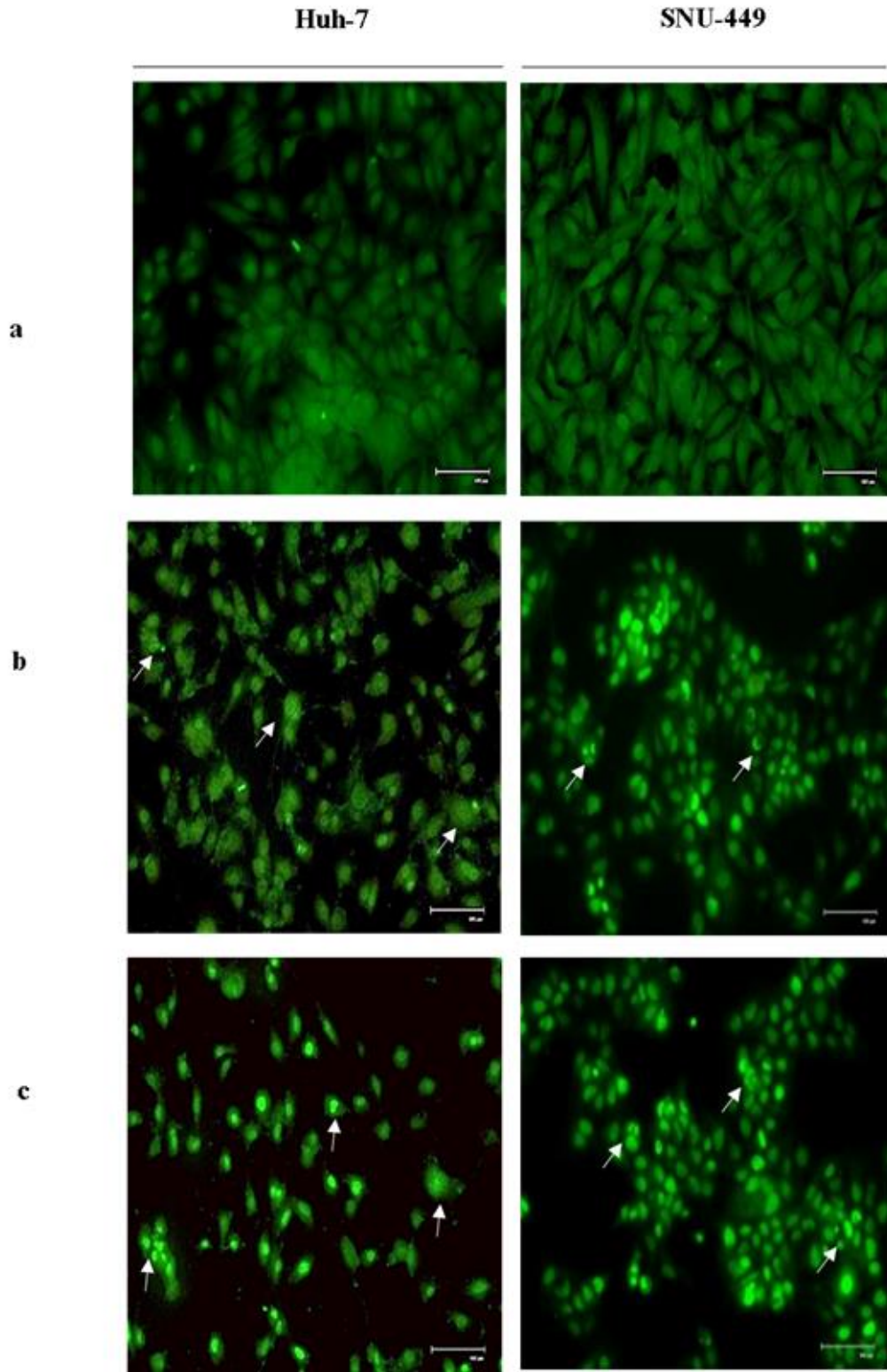
Bu bulgular ışığında Huh-7 hücrelerinde en yüksek apoptotik etki 9 J/cm^2 güç yoğunluklu lazer ışımada belirlenmesine rağmen, SNU-449 hücrelerinde en etkin güç yoğunluklu lazer ışıma 12 J/cm^2 olarak saptanmıştır. Ayrıca, 1 mM 5-ALA'nın 12 J/cm^2 güç yoğunluklu lazer ışımının SNU-449 hücrelerinde Huh-7 hücrelerine göre daha fazla apoptotik ölüme neden olduğu ve bu nedenle SNU-449 hücrelerinin 5-ALA temelli FDT'ye Huh-7 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

5.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Sonuçları

5-ALA temelli lazer ışımının HSK hücrelerinde etkisi AO/EB boyaması ile morfolojik olarak değerlendirilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 5.4'te sunulmuştur.

Genel olarak 1 mM 5-ALA uygulanan ve 9 ve 12 J/cm^2 güç yoğunluklu lazer ışıma yapılan HSK hücrelerinde kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, hücre boyutunda küçülme ve/veya hücre büzülmesi ve nükleer parçalanmaların olduğu görüntülenmiştir. Ayrıca, Huh-7 hücrelerinde SNU-449 hücrelerine göre belirgin kromatin yoğunlaşması ve hücre morfolojisinin değiştiği gözlemlenmesine rağmen, SNU-449 hücrelerinde Huh-7 hücrelerine göre daha belirgin şekilde nükleer parçalanmanın meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, 5-ALA temelli FDT uygulamasının HSK hücrelerinde apoptotik ölüme neden olduğu morfolojik olarak görüntülenmiştir.



Şekil 5. 4 : Farklı güç yoğunluklu lazer ışınma sonrasında Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak morfolojik değişimlerin akridin oranj boyaması (Oklar, DNA fragmentasyonunu ve hücre yapısının bozulmasını göstermektedir). **a)** Kontrol **b)** 9 J/cm² **c)** 12 J/cm².

BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

HSK, kanser kaynaklı ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer alan heterojen bir kanser tipidir. HSK tedavisinde cerrahi rezeksiyon, sistemik kemoterapi, radyoterapi ve moleküler hedefli tedaviler gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde tümörün büyüklüğü, metastaz varlığı, karaciğer fonksiyonu ve diğer faktörler (yaş, aile hikayesi, genetik mutasyon vb.) rol almaktadır [113].

Mevcut uygulanan tedavi yöntemlerinde, kanser hücrelerinde gelişen ilaç direnci, metastaz ve anjiyogenez, kullanılan kemoterapi ilaçlarının yan etkileri ve tümörün heterojen yapısı HSK tedavisinde başarının elde edilmesinde güncel sorunlar olarak yer almaktadır [114,115]. Bundan dolayı kanser tedavisindeki son yıllarda yapılan araştırmalarda kemoterapi ilaçlarının yanı sıra farklı FS temelli FDT veya kemoterapi ve FDT kombin *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları dikkat çekmektedir [116-119]. FDT, FS olarak kullanılan maddelerin uzun dalga boyuna sahip kırmızı görünür ışıkla ve oksijen varlığında spesifik bir şekilde hücre ölümüne neden olduğu tedavi şeklidir. FDT çalışmalarında en yaygın kullanılan FS, 5-ALA'dır [120]. Yapılan çalışmalarda farklı kanser tiplerinin (meme, prostat, pankreas, kolon vb.) tedavisinde 5-ALA/FDT'nin terapötik etkisi araştırılmıştır [101-108]. Ancak Huh-7 ve SNU-449 HSK hücrelerinde 5-ALA/FDT tedavisinin araştırıldığı bir çalışma henüz literatürde yer almamaktadır. Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında ilk kez 5-ALA/FDT'nin Huh-7 ve SNU-449 hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

5-ALA temelli FDT'nin Huh-7 ve SNU-449 hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi için, hücreler 1 mM 5-ALA ile 4 saat inkübe edilmiş ve intraselüler PpIX miktarı ölçülmüştür. 5-ALA mitokondride PpIX dönüşmektedir. Kırmızı (600-740 nm) ve yeşil ışık (450-580 nm) ile uyarılması sonucunda hidroksi radikalleri, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi ROS ürünlerinin fotokimyasal reaksiyon ile

oluşmasını sağlayarak apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır [121]. 5-ALA temelli FDT'nin solar keratosis ve deri kanserinin tedavisinde Amerika ve Avrupa'da klinik kullanımı onaylanmıştır [122-124]. Bu nedenle FDT'nin her bir kanser tipine özgü uygulama protokolünün belirlenmesi ve bu konuda ön verilerin elde edilmesi önemlidir. Literatürde 5-ALA/FDT çalışmaları incelendiğinde, intraselüler PpIX miktarının hücre tipine göre değiştiği belirlenmiştir. Tsai ve ark. (2004) yaptıkları çalışmalarında, MCF-7 ve MCF-7/ADR dirençli meme kanseri hücrelerinde artan 5-ALA konsantrasyonuna bağlı olarak intraselüler PpIX miktarının arttığını ve dirençli MCF-7/ADR hücrelerinde hücre içi PpIX miktarının daha az olduğunu belirtmişlerdir [125]. Palasuberniam ve ark. (2015) ve Morito ve ark. (2019) çalışmalarında farklı meme kanseri alt tiplerinde PpIX miktarının farklı olduğunu belirlemişlerdir [126,127]. Mevcut tez çalışmasında 4 saat boyunca 1 mM 5-ALA uygulanan Huh-7 ve SNU-449 hücre hatlarında intraselüler PpIX seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0.01$) ve bu artışın SNU-449 hücrelerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Literatürde 5-ALA/FDT'nin kanser hücrelerinde özellikle farklı alt tipteki meme kanseri hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve/veya otofajik etkisinin belirlendiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır [128, 130]. Eskiler ve ark (2020) 5-ALA/FDT'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlediği çalışmalarında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında 1 ve 2.5 mM 5-ALA 635 nm lazer diyot 1.5, 3, 6, 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluğu kullanılarak ısıtma gerçekleştirmişlerdir. WST-1 sonucu verilerine göre, 1mM 5-ALA uygulanan hücrelerde lazer dozuna bağlı bir şekilde meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun önemli ölçüde azaldığı ve 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluğunun MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre daha etkin olduğunu belirtmişlerdir [102]. Diğer bir çalışmada, 24 saat boyunca 0.1- 4 µM 5-ALA uygulanan HeLa servisk kanseri hücrelerinde 5 J/cm² güç yoğunluğu kullanarak lazer ısıtması yaptıklarında, hücrelerde canlılık oranının anlamlı bir şekilde azaldığını ve en etkin konsantrasyonun 1 µM olarak belirlemişlerdir [130]. Osaki ve ark. (2017) çalışmalarında, KLN205 akciğer kanseri hücrelerinde 4 saat boyunca 0.6, 1.2, 2.5 ve 5 mM 5-ALA uyguladıktan sonra 630 nm lazer ışınması (1,5 ve 10 J/cm²) uyguladıklarında, 5-ALA hücrelerde önemli derece canlılığını azalttığını ve bu azalmanın metformin varlığında daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir [131]. Ancak, 5-ALA/FDT'nin HSK hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Abo-Zheid ve ark (2018)

Hep G2 ve MCF-7 hücrelerinde 0.5 ve 1mM 5-ALA'nın sitotoksik etkisini, He-Ne lazeri ile 633 nm dalga boyu kullanarak 60 J/cm² güç yoğunluğunda 4 dakika boyunca ısıtma gerçekleştirerek değerlendirmiştir. Elde ettikleri bulgulara göre, 5-ALA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak her iki hücre hattında canlılık oranının anlamlı bir şekilde azaldığını belirlemişlerdir (p<0.01) [101].

Mevcut tez çalışmasında, 1 mM 5-ALA/FDT uygulanan Huh-7 ve SNU-449 HSK hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan WST-1 analizi sonucunda, 6, 9, 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışına sonrasında hücrelerin 24 saatte canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ve SNU-449 hücrelerinde canlılık oranında Huh-7 hücrelerine göre daha fazla oranda azalış olduğu analiz edilmiştir (p<0.01). WST-1 analizi sonuçlarına göre HSK hücrelerinde 5-ALA temelli FDT'ye farklı yanıt elde edilmesi hücrelerin farklı özelliklere sahip olmasından kaynaklanabilir. Huh-7 hücre hattı epiyelyal kökenli, agresif, dirençli ve heterojen bir grup olmasına rağmen, SNU-449 hücre hattı ise mezenkimal kökenli hücre hattı olmasından dolayı, 5-ALA'nın sitotoksik etkisinin farklı olmasında rol alabileceği düşünülmektedir. Ayrıca HBV enfeksiyonunun SNU-449 hücrelerinin 5-ALA temelli FDT'ye daha duyarlı olmasında rol alabileceği de öngörülmektedir.

Diğer yandan, 5-ALA/FDT'nin farklı kanser tiplerinde apoptotik etkisinin araştırıldığı çalışma sayısı literatürde sınırlıdır. Eskiler ve ark (2020) 5-ALA/FDT'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Annexin V analizi sonuçlarına göre, artan güç yoğunluğu ve doza bağlı olarak her iki hücre hattında apoptotik ölümün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir (p<0.05). Ayrıca yapılan akridin oranj boyaması sonuçlarına göre, kontrol hücrelerine kıyasla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde güç yoğunluğuna bağlı olarak hücrelerde vakuolizasyon ve belirgin kromatin yoğunlaşması gözlenmiştir [102]. Ayrıca 5-ALA temelli FDT ile ilgili olarak diğer kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda da, hücrelerde mikronükleus sayısında artış olduğu, hücre membranının yapısının bozulduğu ve kromatin yoğunlaşmasının gözlemlendiği, Bax protein miktarının artarken, Bcl-2 protein miktarının azaldığı belirlenmiştir [124,131,132]. Diğer yandan Osaki ve ark. (2017) çalışmalarında 5-ALA/FDT ile metformin kombin uygulamasının akciğer kanseri hücrelerinde apoptozun yanı sıra otofajik ölümede neden olduğunu belirlemişlerdir [131].

Mevcut tez çalışmasında yapılan 5-ALA/FDT'nin Annexin V analizi ve akridin oranj/etidyum bromür boyaması yöntemi ile apoptotik etkisinin belirlenmesi sonucunda, 5-ALA/FDT'nin HSK hücrelerinde apoptotik ölüme neden olduğu ve bu ölümün SNU-449 hücrelerinde Huh-7 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Huh-7 hücrelerinde en yüksek apoptotik etki 9 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışımada belirlenmesine rağmen, SNU-449 hücrelerinde en yüksek apoptotik ölüm 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışımaya olarak saptanmıştır. Elde edilen sayısal veriler AO boyaması ile de desteklenmiştir. 1 mM 5-ALA uygulanan ve 9 ve 12 J/cm² güç yoğunluklu lazer ışımaya yapılan HSK hücrelerinde kromatin yoğunlaşması, hücre boyutunda küçülme ve nükleer fragmentasyonun olduğu görüntülenmiştir. Sonuç olarak, 1 mM 5-ALA uygulanan HSK hücrelerinde apoptotik ölüm hem sayısal hem de görsel olarak belirlenmiş ve elde edilen veriler WST-1 analizinden elde edilen verileri destekler niteliktedir. Ancak, hücrelerde en etkin apoptotik ölüm değerlerinin farklı güç yoğunluğunda lazer ışımadan elde edilmesinden dolayı, apoptotik ölümün moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

FDT uygulamalarında diyot lazerleri FS'lerle uyumlu dalga boylarında çalıştığı için güncel olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem önceki dönemlerde kullanılan lazerlerden daha düşük maliyetli ve yaygın kullanım için yeterince geliştirilmiştir [133]. Lazerin monokromatik olması ve lazer ışığını oluşturan tüm dalgaların birbirine paralel olması sayesinde son derece küçük bir alana dahi yüksek enerji uygulayabilecek yapıda olması lazer ışık kaynaklarını FDT uygulamalarında daha etkin hale getirmiştir. Ayrıca lazerin LED'lere göre daha fazla penetrasyon derinliği sağlaması onu daha etkin kılmaktadır [134]. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında da diyot lazer sistemi kullanılmıştır ve farklı güç yoğunluğunda etkisi analiz edilmiştir. Ancak HSK hücrelerinde değişen güç yoğunluğuna bağlı olarak hücrelerde sitotoksik ve apoptotik etkinin değişmesi, farklı ışık kaynakları (LED vb.) ile FDT çalışmalarının da yapılması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, ileri çalışmalarda farklı güç yoğunluğunda LED ışımaları ile HSK hücrelerinde 5-ALA'nın terapötik etkisinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında ilk kez farklı özelliklere sahip HSK hücre hatlarında 5-ALA/FDT uygulanarak apoptotik ve sitotoksik etkileri *in vitro* olarak

değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, HSK hücrelerinde artan güç yoğunluğuna bağlı olarak hücrelerde canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı ve 5-ALA'nin apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, SNU-449 hücrelerinin Huh-7 hücrelerine göre 5-ALA'ya daha fazla yanıt verdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen ön veriler HSK tedavisinde 5-ALA/FDT temelli yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ancak 5-ALA/FDT uygulanan HSK hücrelerinde hücre ölümünün moleküler mekanizmaların aydınlatılması, farklı FS'lerin ve ışık kaynaklarının kullanılması ve elde edilen *in vitro* verilerin *in vivo* deneylerle desteklenmesi ile sunulan bu çalışmalar geliştirilebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Sherman, M. (2005). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 25(2):143-54.
- [2] Verslype, C., Van Cutsem, E., Dicato, M., Arber, N., Berlin, J. D., Cunningham, D., Van de Velde, C. (2009). The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer. *Annals of Oncology*, 20, 81-86.
- [3] Bruix, J., Boix, L., Sala, M., Llovet, J. M. (2004). Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*, 5(3), 215-219.
- [4] Luo, Z., Zheng, M., Zhao, P., Chen, Z., Siu, F., Gong, P., Cai, L. (2016). Self-monitoring artificial red cells with sufficient oxygen supply for enhanced photodynamic therapy. *Sci Rep.*, 6(1), 1-11.
- [5] Wu, J., Waxman, D. J. (2018). Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett.*, 419, 210-221.
- [6] Daniell, M. D., Hill, J. S. (1991). A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand J Surg.*, 61(5), 340-348.
- [7] Moan, J., Berg, K. (1991). The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 53(4), 549-553.
- [8] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*, 106, 1098-1107.
- [9] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbely, M., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.*, 90(12), 889-905.
- [10] Brancalion, L., Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.*, 17(3), 173-186.
- [11] Korbely, M. (1996). Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.*, 14(5), 329-334.
- [12] Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(10), 589-604.

- [13] GWO (2009). Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. In: Global Guideline.
- [14] Debes, J. D., Carrera, E., Mattos, A. Z., Prieto, J. E., & Boonstra, A. (2019). Hepatocellular carcinoma, a unique tumor with a lack of biomarkers. *Ann Hepatol*, 18(6), 786-787.
- [15] El-Serag, H. B., Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- [16] Bostan, N., Mahmood, T. (2010). An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 91-133.
- [17] El-Serag H.B, Mason A.C (1999). Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340, 745–50.
- [18] Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, et al. (2006). Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 135–51.
- [19] Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. (2004). Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*, 126, 1005–14.
- [20] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362, 1907–17.
- [21] Hamilton, S. R., Aaltonen, L. A. (2000). *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* (Vol. 2). Lyon: IARC press.
- [22] <<http://gco.iarc.fr>>, erişim tarihi 06.04.2019.
- [23] El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142, 1264–1273.
- [24] Park, J. W. et al. (2015). Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the bridge study. *Liver Int.*, 35, 2155–2166.
- [25] Yang, J. D. et al. (2015). Hepatocellular carcinoma occurs at an earlier age in Africans, particularly in association with chronic hepatitis B. *Am. J. Gastroenterol.*, 110, 1629–1631.
- [26] Chan, H. L. Y., Sung, J. J. Y. (2006). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *In Seminars in Liver Disease*, 26 (2), 153-161.
- [27] Yang, J. D. et al. (2017). Characteristics, management, and outcomes of patients with hepatocellular carcinoma in Africa: a multicountry observational study from the Africa Liver Cancer Consortium. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2, 103–111.
- [28] Yang, J. D. et al. (2016). Diabetes mellitus heightens the risk of hepatocellular carcinoma except in patients with hepatitis c cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* 111, 1573–1580.

- [29] Yang, J. D. et al. (2017). Characteristics, management, and outcomes of patients with hepatocellular carcinoma in Africa: a multicountry observational study from the Africa Liver Cancer Consortium. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2, 103–111.
- [30] Chayanupatkul, M. et al. (2017). Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 66, 355–362.
- [31] Younossi, Z. M. et al. (2016). The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*, 64, 1577–1586.
- [32] Younossi, Z. M. et al. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64, 73–84.
- [33] Yang, J. D. et al. (2017). Recent trends in the epidemiology of hepatocellular carcinoma in Olmsted county, Minnesota: a US population based study. *J. Clin. Gastroenterol.*, 51, 742–748.
- [34] Mittal, S. et al. (2016). Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in United States veterans is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 14, 124–131.
- [35] Welzel, T. M. et al. (2013). Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Am. J. Gastroenterol.*, 108, 1314–1321.
- [36] El-Serag, H. B., Hampel, H., Javadi, F. (2006). The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 4, 369–380.
- [37] Huang, S. F. et al. (2018). Metabolic risk factors are associated with non-hepatitis B non-hepatitis C hepatocellular carcinoma in Taiwan, an endemic area of chronic hepatitis B. *Hepatol. Commun.*, 2, 747–759.
- [38] Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet*, 357, 539–545.
- [39] Hirosumi, J. et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333–336.
- [40] Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., Wagner, E. F. (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J. Clin. Invest.*, 118, 3943–3953.
- [41] West, J., Card, T. R., Aithal, G. P., Fleming, K. M. (2017). Risk of hepatocellular carcinoma among individuals with different aetiologies of cirrhosis: a population-based cohort study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 45, 983–990.
- [42] Jepsen, P., Ott, P., Andersen, P. K., Sorensen, H. T., Vilstrup, H. (2012). Risk for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis: a Danish nationwide cohort study. *Ann. Intern. Med.* 156, 841–847.

- [43] Wild, C. P., Miller, J. D. Groopman, J. D. (2015). *Mycotoxin Control in Low and Middle Income Countries*, Vol. 9.
- [44] Gouas, D., Shi, H. Hainaut, P. (2009). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.*, 286, 29–37.
- [45] Weng, M. W. et al. (2017). AFB1 hepatocarcinogenesis is via lipid peroxidation that inhibits DNA repair, sensitizes mutation susceptibility and induces aldehyde-DNA adducts at p53 mutational hotspot codon 249. *Oncotarget*, 8, 18213–18226.
- [46] Helleday, T., Eshtad, S., Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.*, 15, 585–598.
- [47] Yang, J. D. Roberts, L. R. (2010). Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 7, 448–458.
- [48] Llovet, J. M. (2003). Burroughs A, and Bruix J. *Hepatocellular carcinoma. Lancet*, 362, 1907-1917.
- [49] Cao, H., Phan, H., Yang, L. X. (2012). Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.*, 32(4), 1379-1386.
- [50] Méndez-Blanco, C., Fondevila, F., García-Palomo, A., González-Gallego, J., Mauriz, J. L. (2018). Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Mol Med.*, 50(10), 1-9.
- [51] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.*, 61:250- 281.
- [52] A.C. Kubler (2005). Photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.*, 20, 37–45.
- [53] A. Mitra, G.I. Stables (2006). Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 116–127.
- [54] J.J. Schuitmaker, P. Bass, H.L.L.M. Van Leengoed, F.W. Van Der Meulen, W.M. Star, N. Zandwijk (1996). Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 34, 3–12.
- [55] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2, 1–23.
- [56] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.*, 5, 497–508.
- [57] F.S. De Rosa, M.V.L.B. Bentley (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm. Res.*, 17, 1447–1455.
- [58] Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 39, 1-18.
- [59] Bonnett, R. (2000). Chemical aspects of photodynamic therapy. *CRC Press*.

- [60] Bergamini, C. M., Gambetti, S., Dondi, A., Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des.*, 10(14), 1611-1626.
- [61] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1984). Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.*, 105, 47-56.
- [62] Stummer, W., Stocker, S., Novotny, A., Heimann, A., Sauer, O., Kempfski, O., Reulen, H. J. (1998). In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B.*, 45(2-3), 160-169.
- [63] Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina*, 39, 12.
- [64] Levy, J. G. (1994). Photosensitizers in photodynamic therapy. *In Seminars Oncol.*, 21(15), 4-10.
- [65] Gomes, A. T., Neves, M. G., Cavaleiro, J. A. (2018). Cancer, photodynamic therapy and porphyrin type derivatives. *An Acad Bras*, 90(1), 993-1026.
- [66] Bock, G. R., Harnett, S. (2008). Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use. *Ciba Found Symp.*, 146(1), 241.
- [67] Nyman, E. S., & Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.*, 73(1-2), 1-28.
- [68] Macdonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 5(2), 105-129.
- [69] Robertson, C. A., Evans, D. H., Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B.*, 96(1), 1-8.
- [70] De Rosa, F. S., Bentley, M. V. L. (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm Res.*, 17(12), 1447-1455.
- [71] König, K. (2000). Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc.*, 200(2), 83-104.
- [72] Patrice, T., Wilson, B. C. (2003). Technologies and biophysical techniques for PDT. *In Photodynamic Therapy*, 127-158.
- [73] Juzeniene, A., Nielsen, K. P., Moan, J. (2006). Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*, 25(1-2).
- [74] Henderson, B. W., Busch, T. M., & Snyder, J. W. (2006). Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 38(5), 489-493.
- [75] Brancalion, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*, 17(3), 173-186.

- [76] Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. (2004). Effectiveness of different light sources for 5- aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.*, 19, 139- 149.
- [77] Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. (2005). Photodynamic therapy for non- melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol.*, 85, 483- 490.
- [78] Beyer W. (1996). Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.*, 36, 153- 156.
- [79] Wilson BC, Patterson MS (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.*, 53, 61- 109.
- [80] Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.*, 24, 259- 268.
- [81] Ito, T. (1978). Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: the $^1\text{O}_2$ hypothesis as a driving force in recent research. *Photochem Photobiol.*, 28(4- 5), 493-506.
- [82] Lane, N. (2002). Oxygen: the molecule that made the world. *Oxford University Press*, USA.
- [83] Mulliken, R.S. (1928). Interpretation of the atmospheric oxygen bands, electronic levels of the oxygen molecule. *Nature*, 122, 505.
- [84] Clennan, E. L., Pace, A., Ishii, A., Kawai, T., Noji, M., Nakayama, J., Ishibashi, M. (2005). Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron*, 61(28), 6665–6691.
- [85] Ogilby, P. R. (2010). Singlet oxygen: there is still something new under the sun, and it is better than ever. *Photochem Photobiol Sci.*, 9(12), 1543-1560.
- [86] Karotki, A., Kruk, M., Drobizhev, M., Rebane, A., Nickel, E., Spangler, C. W. (2001). Efficient singlet oxygen generation upon two-photon excitation of new porphyrin with enhanced nonlinear absorption. *IEEE J Selected Topics in Quantum Electronics*, 7(6), 971-975.
- [87] Juzeniene, A., Nielsen, K.P. ve Moan, J. 2006). Biophysical aspects of photodynamic therapy, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 25, 7-28.
- [88] Moan, J., Berg, K. (1991). The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem photobiol.*, 53(4), 549-553.
- [89] Wainwright, M. (2004). Photodynamic therapy from dyestuffs to high-tech clinical practice. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, 34(1), 95-109.
- [90] Nyman, E. S., Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.*, 73(1-2), 1-28.

- [91] Pazos, M. D. C., Nader, H. B. (2007). Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res.*, 40(8), 1025-1035.
- [92] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 1(4), 279-293.
- [93] Moloney J.N., Cotter T.G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 80, 50-64.
- [94] Inoue, K. (2017). 5- Aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int J Urol.*, 24(2), 97-101.
- [95] Steinbach, P., Wedmgandt, H., Baumgartner, R., Kriegmair, M., Hofstädter, F., Knüchel, R. (1995). Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5- aminolevulinic acid. *Photochem and photobiol.*, 62(5), 887-895.
- [96] Malik, Z., Lugaci, H. (1987). Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer*, 56(5), 589-595.
- [97] Ishizuka, M., Abe, F., Sano, Y., Takahashi, K., Inoue, K., Nakajima, M., Tanaka, T. (2011). Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol.*, 11(3), 358-365.
- [98] Inoue, K., Fukuhara, H., Kurabayashi, A., Furihata, M., Tsuda, M., Nagakawa, K., Shuin, T. (2013). Photodynamic therapy involves an antiangiogenic mechanism and is enhanced by ferrochelatase inhibitor in urothelial carcinoma. *Cancer Sci.*, 104(6), 765-772.
- [99] Wan, M. T., Lin, J. Y. (2014). Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol.*, 7, 145.
- [100] Wachoswka, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wanczyk, M., Bojarczuk, K., Golab, J. (2011). Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*, 6.
- [101] Abo-Zeid, M. A., Abo-Elfadl, M. T., Mostafa, S. M. (2018). Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 21, 351-356.
- [102] 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 Photodyn Ther.*, 31, 101854.
- [103] Aydoğan, T. K., Akbulut, S., Çakmakoğlu, B., Bireller, E. S., Tabakoğlu, H. Ö. (2017). Chlorine e6 tabanlı fotodinamik terapinin MiaPaCa-2 ve MRC-5 hücreleri üzerindeki etkisi.

- [104] Mohammadpour, H., Fekrazad, R. (2016). Antitumor effect of combined Dkk-3 and 5-ALA mediated photodynamic therapy in breast cancer cell's colony. *Photodiagnosis Photodynamic Ther.*, 14, 200-203.
- [105] Ma, Y., Qu, S., Xu, L., Lu, H., Li, B. (2020). An in vitro study of the effect of 5-ALA-mediated photodynamic therapy on oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*, 20(1), 1-6.
- [106] Mohammadpour, H., Majidzadeh-A, K. (2015). Antitumor effect of conditioned media derived from murine MSCs and 5-aminolevulinic acid (5-ALA) mediated photodynamic therapy in breast cancer in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 12(2), 238-243.
- [107] Ruhi, M. K., Ayşe, A. K., Gülsoy, M. (2018). PC-3 Prostat Kanser Hücreleri Üzerinde İndosyanin Yeşili Kullanarak Yapılan Fotodinamik Terapinin AO/PI Boyama Testi Sonuçları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 182-185.
- [108] Kamanlı, A. F., Yıldız, M. Z., Özyol, E., Ozkan, A. D., Kucukkara, E. S., Eskiler, G. G. (2021). Investigation of LED-based photodynamic therapy efficiency on breast cancer cells. *Lasers in Med Sci.*, 36(3), 563-569.
- [109] 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. *Int J Med Sci.*, 10(1), 68.
- [110] Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W., Bhunia, A. K. (2008). WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods*, 73(3), 211-215.
- [111] Zimmermann, M., Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In *Mammalian Cell Viability*, 57-63.
- [112] Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. (2006). Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(3), 4493.
- [113] Frei, E., Eder, J. P. (2003). Principles of dose, schedule, and combination therapy. *Cancer Med.*, 7, 590-599.
- [114] Sung, W. K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., Luk, J. M. (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 44(7), 765-769.
- [115] Luo, Z., Tian, H., Liu, L., Chen, Z., Liang, R., Chen, Z., Cai, L. (2018). Tumor-targeted hybrid protein oxygen carrier to simultaneously enhance hypoxia-dampened chemotherapy and photodynamic therapy at a single dose. *Theranostics*, 8(13), 3584.
- [116] 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. *J Controlled Release*, 283, 190-199.

- [117] Shi, S., Zhang, L., Zhu, M., Wan, G., Li, C., Zhang, J., Wang, Y. (2018). Reactive oxygen species-responsive nanoparticles based on PEGlated prodrug for targeted treatment of oral tongue squamous cell carcinoma by combining photodynamic therapy and chemotherapy. *ACS App Materials Interfaces*, 10(35), 29260-29272.
- [118] Khdair, A., Handa, H., Mao, G., Panyam, J. (2009). Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance in vitro. *European J Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 71(2), 214-222.
- [119] Lopez, R. F. V., Lange, N., Guy, R., Bentley, M. V. L. B. (2004). Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Advanced Drug Delivery Rev.*, 56(1), 77-94.
- [120] Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K. E., Nesland, J. M. (1997). 5- Aminolevulinic acid- based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer J American Cancer Soci.*, 79(12), 2282-2308.
- [121] Garcia-Zuzaga, J., Cooper, K.D., Baroni E.D. (2005). Photodynamic therapy in dermatology: current concepts in the treatment of skin cancer. *J Ex Rew Anticancer Ther.*, 5, 5.
- [122] Kim, M., Jung, H. Y., Park, H. J. (2015). Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: Principles and new applications. *Int J Mol Sci.*, 16(10), 23259-23278.
- [123] Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., Gołab, J. (2011). Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*, 16(5), 4140-4164.
- [124] Tsai, T., Hong, R. L., Tsai, J. C., Lou, P. J., Ling, I. F., Chen, C. T. (2004). Effect of 5- aminolevulinic acid- mediated photodynamic therapy on MCF- 7 and MCF- 7/ADR cells. *Lasers in Surgery and Medicine: J American Society for Laser Med Surg.*, 34(1), 62-72.
- [125] Palasuberniam, P., Yang, X., Kraus, D., Jones, P., Myers, K. A., Chen, B. (2015). ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Scientific Rep.*, 5(1), 1-12.
- [126] 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 Med.*, 8(12), 5524-5533.
- [127] Ahmadijian, V. (Ed.). (2012). The lichens. *Elsevier*.
- [128] Josifovski, J., Manojlović, N., Pupić, G., & Radošević-Jelić, L. (2002). Localization, clinical and pathological characteristics of the colon cancer patients aged up to 40 years and over 65 years. *Archive of Oncol.*, 10(3), 149-149.

- [129] Shrestha, G., Clair, L. L. S. (2013). Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rew.*, 12(1), 229-244.
- [130] Guo, X., Xiao, H., Guo, S., Li, J., Wang, Y., Chen, J., Lou, G. (2019). Long noncoding RNA HOTAIR knockdown inhibits autophagy and epithelial–mesenchymal transition through the Wnt signaling pathway in radioresistant human cervical cancer HeLa cells. *J Cellular Physiology*, 234(4), 3478-3489.
- [131] Osaki, T., Yokoe, I., Takahashi, K., Inoue, K., Ishizuka, M., Tanaka, T., Okamoto, Y. (2017). Metformin enhances the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in vitro. *Oncol Lett.*, 14(1), 1049-1053.
- [132] Guo, Q., Dong, B., Nan, F., Guan, D., Zhang, Y. (2016). 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy in human cervical cancer via the activation of microRNA-143 and suppression of the Bcl-2/Bax signaling pathway. *Molecular Med Rep.*, 14(1), 544-550.
- [133] Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H., Stewart, F. A. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist*, 11(9), 1034-1044.
- [134] Wilson, B. C., Patterson, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.*, 53(9), 61-109.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Özge ÖZTEN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
- **Yükseklisans** : 2017, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Organik Kimya
- **Yükseklisans** : 2021, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER

- 2015-2017 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Farmosatik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda ilaç sentezi üzerine çalıştı.
- 2019-2021 yılları arasında yılları arasında Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Laboratuvarları'nda fotodinamik tedavi üzerine çalıştı.
- TUBITAK SBAG-1001 (119O383). Köpek Meme Tümörü Hücrelerinde Fotodinamik Tedavi (FDT) Etkinliğinin Değerlendirilmesi (Bursiyer).

BİLDİRİLER

- Ozten O., Zengin Kurt B., Sonmez F., Sadık Gulgec A., Kucukislamoglu M. (2017) "Synthesis of Biologically Active Novel Coumarin Derivatives", *3rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies*. Poster presentation. April 26-29.
- Zengin Kurt B., Ozten O., Sonmez F. (2018). Synthesis and anticholinesterase activity of Tacrine-Carbamate derivatives. *2nd International Congress on Advances in BioScience and Biotechnology (ICABB)*, June 26, ss.17.

YAYINLAR

- Turna O, Baykal A, Sozen Kucukkara E, Ozten O, Deveci Ozkan A, Guney Eskiler G, Kamanli AF, Bilir C, Yildiz SZ, Kaleli S, Ucmak M, Kasikci G, Lim HS. (2021). Efficacy of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in different subtypes of canine mammary gland cancer cells. *Lasers Med Sci.*, 1-10.

