

LED Tabanlı Metilen Mavisi Aracılı Fotodinamik Tedavinin HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattındaki In vitro Etkisi

In vitro Effect of Methylene Blue Mediated Photodynamic Therapy on HT-29 Colon Cancer Cell Lines Using LED

Ayla EREN ÖZDEMİR¹, Ebru AKSOY², Mustafa Zahid YILDIZ³

Sakarya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO¹

Biyomedikal Mühendisliği Yüksek Lisans Programı²

Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Teknoloji Fakültesi³

aylae@sakarya.edu.tr, eaksoy2359@gmail.com, mustafayildiz@sakarya.edu.tr

Özetçe— Metilen mavisi (MB) klinik tıpta yıllardır kullanılan bir boyadır ve fotodinamik terapi (FDT) için bir ilaç olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada HT-29 kolon kanseri hücrelerine MB ekilerek terapötik etkisi in vitro olarak araştırılmıştır. Son yıllarda FDT’de ışık kaynağı olarak LED’ler (Light Emitting Diodes) kullanılmaya başlanmıştır. Ancak FDT’nin LED’lerle kombinasyonundaki etkisini inceleyen çok fazla çalışma yoktur. Bu nedenle, bu çalışmada kolon kanseri hücrelerine 635nm LED ışık kaynağı kullanılarak MB aracılı FDT’nin antitümör etkisi değerlendirilmiştir. Kolon kanseri hücreleri bir petri kabına ekilerek üzerine MB uygulanmıştır. Ortam 635nm LED ile 16mW/cm² güç yoğunluğu ve 3J/cm² enerji yoğunluğu hücreler ortama eklendikten sonra 2sa, 6sa, 16sa, 24sa, 48sa, 72sa arayla uygulanmıştır. 72 saatin sonunda MB aracılı FDT’nin LED ışık kaynağı ile kullanıldığında belirgin antitümör etkileri gözlenmiştir. %80 oranında hücre ölümü gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler — Fotodinamik terapi; Metilen mavisi; Işık yayan diyotlar; Kolon kanseri hücreleri.

Abstract— Methylene blue (MB) has been used in clinical medicine for many years and has been accepted as a drug for photodynamic therapy (PDT). In this study, the therapeutic effect of MB in HT-29 colon cancer cells was investigated in vitro. In recent years, LEDs (light-emitting diodes) have been used as a light source in FDT. However, there are not many studies examining the effect of FDT in combination with LEDs.

Therefore, in this study, antitumor effect of MB mediated PDT was evaluated by using 635nm LED light source to colon cancer cells. Colon cancer cells were planted in a petri dish and MB was added. 16mW/cm² power density and 3J/cm² energy level with 635nm LED were applied to 2s, 6h, 16h, 24h, 48h, 72h after the cells were added to the medium. After 72 hours, significant antitumor effects were observed when MB mediated FDT was used with LED light source. 80% of cell death occurred.

Keywords—photodynamic therapy; Methylene blue; LED; Near infrared; Colon cancer cells.

I. GİRİŞ

Fotodinamik tedavi (FDT) iyi huylu veya habis tümörlere doğru seçici bir sitotoksik aktivite uygulayabilen invaziv bir tedavi prosedürüdür. Prosedür, fotosensitizan (FS) adı verilen toksik olmayan ışığa duyarlı maddelerin sistemik olarak uygulanmasıyla başlar. Malignan hücrelere seçicilik gösterip biriken FS, ışık maruziyetinin ardından aktif hale gelir. Oksijen varlığında bir dizi olay sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROT) salınmasıyla tümör hücrelerinin ölümü gerçekleşir [1]. FDT, geleneksel kanser tedavi yöntemlerine kıyasla (kemo ve radyoterapi) FS’nin tümörlü hücrelerde seçicilik göstermesi ve birikmesi, toksik olmaması ve iyonize eden ışığın kullanılmaması sebebiyle bilinen bir zararı yoktur ve prosedür tekrarlanabilir [1,2].

Metilen mavisi klinik olarak tıpta kullanılan önemli bir canlı boyadır. MB lokal olarak ameliyata elverişli olmayan özofagus tümörlerinin tedavisinde ve sedef hastalığının tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır [3]. Son zamanlarda reaktif oksijen türlerini meydana getirdiği ve toksik olmaması nedeniyle FDT’de kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda bu ilacın hücre içinde mitokondriyal lokalizasyon gösterdiği ve apoptoz ile hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Damar yıkımından ziyade direkt tümör hücrelerini öldürdüğü ayrıca sadece kanser için değil FDT’de potansiyel kullanımının olduğu görülmüştür [3,4].

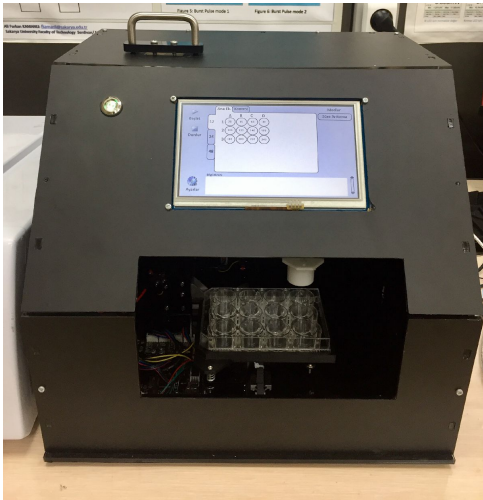
MB aracılı FDT ışık kaynağı olarak lazerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda lazerler yerine daha ucuz, kontrolü kolay, çok küçük taşınabilir ve geniş alan aydınlatma alanları sağlayan ışık yayan LED’ler kullanılmıştır [5,6].

Bu çalışma ile de kolon kanseri hücrelerinde LED kullanılarak metilen mavisi aracılı fotodinamik tedavinin etkinliği araştırılmıştır.

II. METERYAL VE METOT

A. LED cihazı

Çalışmada kullanılan LED cihazı, bir Tübitak projesi sonucu Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Laboratuvarında üretilmiş olup, 635 nm’de stabil bir optik çıkışa sahip, 500 mW gücünde programlanabilir özelliğe sahiptir. Cihaz, hücre hattı çalışmalarına uygun olarak, çoklu well-plate ortamında ışımaya yapabilmektedir. Sistemin çıkışı, optik güç ölçüm sensörü ile sürekli olarak kontrol edilmekte ve çıkış gücündeki tüm salınımlar bir kontrolör ile engellenmektedir. Yani bir optik geri besleme sağlanmaktadır. LED ışık kaynaklarının sıcaklık ile dalga boyu değişebileceğinden, kullandığımız sistemin sıcaklık kontrolörü sürekli 635 nm’de sabit ışımaya yapmasını sağlamaktadır.



Şekil 1. 635 nm LED Işık Kaynağı.

B. Hücre kültürü ve FDT

HT-29 kolon kanseri hücreleri gerekli besiyerinin sağlanması için kültüre edilmiştir, böylece hücre hattının genişlemesine olanak sağlanmıştır. Yeterli büyüklüğe ve sayıya ulaşan HT-29 kolon kanseri hücreleri kontrol grubu ve deney grubu olarak ikiye ayrılmıştır ve hücrelerden 2000µl iki petri kabına ekilmiştir. FS olarak kullanacağımız MB %1’lik bir oranda seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi yapılan MB’dan 20µl deney grubundaki kanser hücrelerinin üzerine uygulanmıştır. Oluşan ortam 5dk kadar bekletilmiştir ve güç değeri 16mW/cm² ‘ye ayarlanarak 188sn boyunca (3J/cm²) 635nm dalga boyunda LED ışığı ile ışınlanmıştır. Aynı güç değeri ve süre 2sa, 6sa, 16sa, 24sa, 48sa ve 72sa sonra tekrarlanmıştır.

C. Hücre sayımı

72 saatin sonunda kontrol ve LED uygulanmış grupta hücre canlılığı thoma lamında floresan mikroskop altında sayılmıştır (Şekil 2).

Sayım sonucu;

$$A \times SF \times 10.000 \quad (1)$$

A: 16 büyük karede sayılan hücre adedi

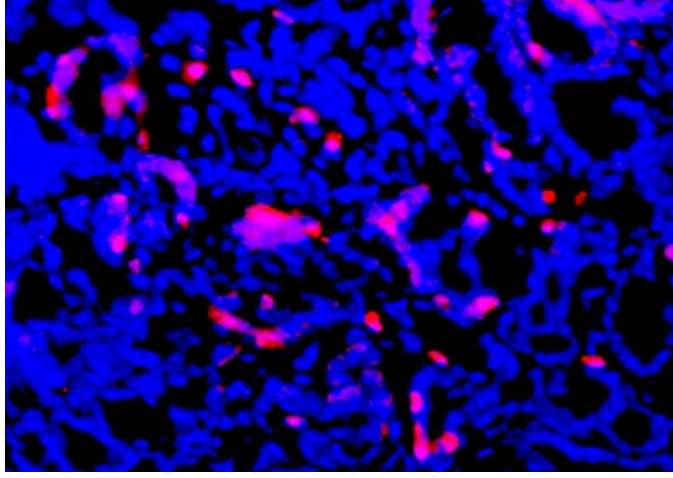
SF: Seyreltme oranı

formülü ile hesaplanmıştır. Thoma lamının esası, 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır [9].

III. SONUÇ VE TARTIŞMA

MB aracılı FDT’nin kolon kanseri hücrelerinde in vitro etkisi ışık kaynağı LED kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar hiç bir işleme tabi tutulmayan kontrol grubu ($\approx 6 \times 10^6$) ile karşılaştırılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. 72 saatin sonunda 635 nm’de 16mW/cm² güç yoğunluğundaki ışımaya ile $4.3 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$ hücre ölümü gözlenmiştir. İstatistik sonucuna göre tüm deney gruplarıyla kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur. Yapılan FDT çalışmasının yaklaşık %80 oranında hücre canlılığını yok ettiği görülmüştür. Diğer yandan 24, 48 ve 72 saatlik deney gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Buna göre tedavinin etkinliği zamana bağlı olarak değişmiştir.

Bu sonuçlar LED kullanan MB aracılı FDT’nin kolon kanseri hücreleri için etkili bir tedavi olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Şekil 2. Deney Grubu Hücrelerinin Florasan Mikroskop Altındaki Görüntüsü

Genelde FDT'de ışık kaynağı olarak lazerler kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda LED'lerin etkinliği bildirilmiştir [5,7,8]. Bu çalışmada, kolon kanseri hücrelerinde MB aracılı FDT için bir ışık kaynağı olarak LED'in performansı araştırılmıştır. Bu kaynağın en önemli avantajı maksimum fotosensitizan emilim iyi bir şekilde örtüşebilen dar emisyon spektrumudur [7]. Ayrıca LED'lerin lazerlere kıyasla kullanımının kolay, ucuz ve ışınlama alanının büyük olması gibi avantajları vardır. Çalışma sonucunda da gördüğümüz gibi bu ışık kaynağı kolon kanseri hücrelerinde FDT için yeni bir ışık kaynağı olarak kullanılabilir.

Bu bir ön çalışma olup diğer çalışmalarda kontrol grupları artırılmalı ve hücre sayımı ile ilgili daha güvenilir yöntemler uygulanmalıdır. Thoma lamında hücre sayımı oldukça güçlü ve önerilen bir yöntem değildir. Çeşitli boyalarla gerçekleştirilebilecek hücre boyama yöntemleriyle daha net sonuçlara ulaşılabilir. Laboratuvar koşullarının iyileştirilmesiyle ilerleyen çalışmalarda bu sorunların giderilmesi ve daha sağlıklı sonuçlar alınması hedeflenmektedir. Bu çalışmada 635nm'deki kırmızı LED ışık kullanılmıştır fakat diğer dalga boyundaki LED'ler (mavi, beyaz vb.) kullanılarak kanser hücrelerinde en etkili dalga boyunu araştırmak, LED ışık kaynağının diğer kanser hücre hatlarında etkili olup olmadığını teyit etmek için bir çok ilave çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; LED kullanan MB aracılı FDT'nin in vitro olarak kolon kanseri hücre dizisinde etkili bir antitümör etkisi gösterdiği görülmektedir. Bu tedavi yöntemi kolon kanseri hastaları için yeni bir umut kaynağıdır.

IV. TEŞEKKÜR

Deney boyunca yanımızda olan ve her türlü destekte bulunan Büşra GÜNOĞLU'na ve çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen, kullanılan cihazla ilgili her türlü

soruna yetişen ve bu cihazı çok değerli hocalarımızın desteği ile Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Laboratuvarı'na kazandıran BiyomedLab ekibine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Patrizia Agostinis, Kristian Berg, Keith A. Cengel³, Thomas H. Foster⁴, Albert W. Girotti⁵, Sandra O. Gollnick, Stephen M. Hahn, Michael R. Hamblin, Asta Juzeniene, David Kessel, Mladen Korbelik, Johan Moan, Pawel Mroz, Dominika Nowis, Jacques Piette, Brian C. Wilson, and Jakub Golab, PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE CA Cancer J Clin . 2011 ; 61(4): 250–281
- [2] C.A Robertson , D. Hawkins Evans , H.Abrahamse Photodynamic therapy (PDT) :A Short Review on Cellular Mecanisms and Cancer Research Applications for PDT , 17July 2009, Pages 1-8.
- [3] K. Orth , G. Beck , F. Genze , A Ruck Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice ,Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 57 (2000) 186–192
- [4] N. Blass, D. Fung, Dyed but not dead – Methylene blue overdose, Anesthesiology 45 (1976) 458–459
- [5] L. Brancaleon and H. Moseley, Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy , Lasers Med Sci 2002, 17:173–186
- [6] Tomoya Hatakeyama , Yasutoshi Murayama , Shuhei Komatsu , Atsushi Shiozaki , Yoshiaki Kuru , Hisashi Ikoma , Masayoshi Nakanishi , Daisuke Ichikawa , Hitoshi Fujiwara , Kazuma Okamoto , Toshiya Ochiai , Yukihito Kokuba , Katsushi Inoue , Motowo Nakajima And Eigo Otsuji , Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells , Received October 30, 2012; Accepted December 7
- [7] Anna Erkiert-Polguj, Adam Halbina, Izabela Polak-Pacholczyk & Helena Rotsztein, Light emitting diodes in photodynamic therapy in non-melanoma skin cancers – own observations and literature review, Journal of Cosmetic and Laser Therapy 2016, 105-110
- [8] Timothy M. Baran • Oleg Mironov • Ashwani K. Sharma¹ • Thomas H. Foster , Indwelling Stent Embedded with Light-Emitting Diodes for Photodynamic Therapy of Malignant Biliary Obstruction , Cardiovasc Intervent Radiol (2016) 39:916–919
- [9] "Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara"