

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

**ÇİNKO FTALOSİYANİN TÜREVİ FOTODUYARLAŞTIRICININ
FOTODİNAMİK TERAPİ YÖNTEMİ İLE KOLON KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu ADKUVAYÇIN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emre GÜZEL

Haziran 2023

T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO FTALOSİYANİN TÜREVİ FOTODUYARLAŞTIRICININ
FOTODİNAMİK TERAPİ YÖNTEMİ İLE KOLON KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu ADKUVAYÇIN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 21/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ	BAŞARI DURUMU
Jüri Başkanı: Doç. Dr. Emre GÜZEL	BAŞARILI
Üye: Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ	BAŞARILI
Üye: Doç. Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN	BAŞARILI

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 bulunduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Cansu ADKUVAYÇIN

22/05/2023

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 danışman hocam Doç. Dr. Emre GÜZEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölüm Başkanı Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN'a, deney çalışmaları süresince deneyimleri ve bilgisini esirgemeyen Özge ÖZTEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması için gerekli deneylerin gerçekleştirildiği Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİYOTAM)'a ve çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 125-2023) teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalışmam da dahil olmak üzere hayatım boyunca her zaman arkamda olan, teşvik eden, maddi ve manevi açıdan desteklerini esirgemeyen eşime, aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.3. Risk Faktörleri	5
2.3.1. İnflamatuvar bağırsak hastalığı.....	6
2.3.2. Adenomatöz kolon polipleri	6
2.3.3. Diyabet ve kolon kanseri	7
2.3.4. Kolesistektomi	8
2.3.5. Yaşam tarzı ve diğer etkenler	8
2.4. Kolon Kanseri Tedavisi	8
2.4.1. Kolon kanseri güncel tedavi yaklaşımları.....	9
BÖLÜM 3.	
KANSER TEDAVİSİNDE YENİ BİR YAKLAŞIM: FOTODİNAMİK TERAPİ. 10	
3.1. Fotodinamik Terapi	10
3.2. Fotodinamik Terapi Mekanizması	11
3.3. FDT ‘ de Hücre Ölüm Mekanizmaları ve FDT’ nin Tümörler Üzerindeki Etkileri	12
3.3.1. Apoptotik hücre ölümü (apoptoz).....	14
3.3.2. Nekrotik hücre ölümü (nekroz).....	14

3.3.3. Otofaji	15
3.3.4. Fotodinamik terapinin tümörler üzerindeki etkisi	19
3.4. FDT' de Fotofiziksel Olaylar.....	20
3.5. FDT' de Fotokimyasal Olaylar	21
3.6. FDT Bileşenleri	22
3.6.1. Singlet oksijen.....	22
3.6.2. Işık	23
3.6.3. Fotoduyarlaştırıcılar.....	24
3.6.3.1. I. Nesil fotoduyarlaştırıcılar	25
3.6.3.2. II. Nesil fotoduyarlaştırıcılar	26
3.6.3.3. III. Nesil fotoduyarlaştırıcılar.....	26
3.6.3.4. Ftalosiyeninler.....	27
3.7. Hücre Lokalizasyonu	28
3.8. FDT ve Kolon Kanseri Çalışmaları	28

BÖLÜM 4.

MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	30
4.1. Kullanılan Cihazlar.....	30
4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	31
4.3. Hücre Kültürü	31
4.3.1. Hücre hatlarının temin edilmesi ve özellikleri.....	31
4.3.2 Hücre kültürü besiyeri hazırlığı ve inkübasyon şartları.....	32
4.3.3. Hücrelerin pasajlanması.....	33
4.3.4. Hücrelerin Sayımı, Dondurulması ve Saklanması	33
4.4. Fotodinamik Terapi Prosedürü	33
4.4.1. FDT için optimizasyon çalışmaları.....	33
4.4.2 Çinko ftalosiyenin yapısı ve çinko ftalosiyenin absorpsiyon özellikleri	34
4.4.3. Çinko ftalosiyenin türevi fotoduyarlaştırıcı uygulanması	35
4.4.4. FDT için LED sistemi.....	36
4.4.4.1. LED uygulaması.....	37

BÖLÜM 5.

BULGULAR.....	38
5.1. Çinko Ftalosiyenin Türevi Fotoduyarlaştırıcının Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	38
5.2. WI-38 ve HT-29 Hücrelerinde Çinko Ftalosiyenin Türevi Fotoduyarlaştırıcı /FDT'nin Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	39

BÖLÜM 6.

TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
-------------------------------	-----------

KAYNAKÇA	47
-----------------------	-----------

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-ALA	: Aminolevulinik Asit
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CCK-8	: Cell Counting Kit 8
CO ₂	: Karbondioksit
DBU	: 1,8 Diazabisiklo (5.4.0) undek-7-ene
DM	: Diyabetes Mellitus
DMEM-HA	: DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-Glutamine
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FDA	: Food and Drug Administration
FDT	: Fotodinamik Terapi
FD	: Fotoduyarlaştırıcı
HPD	: Hematoporfirin Türevleri
J	: Joule
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MTT	: 3,4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür Testi
mW	: Miliwatt
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
Pc	: Ftalosiyenin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Revolutions per Minute
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
Vis	: Görünür Bölge
ZnPc	: Çinko Ftalosiyenin

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 : Kolon Kanseri Risk Faktörleri.....	5
Tablo 3.1 : Fotodinamik terapi (FDT) ile aktive edilen ana hücre ölüm mekanizması ..	17
Tablo 3.2 : Hücre ölüm yollarının ayırt edici özellikleri	18
Tablo 3.3 : Apoptoz ve nekrozun özellikleri yönüyle kıyaslaması.....	19
Tablo 3.4 : İkinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar	26
Tablo 3.5 : Literatürde Yapılan Kolon Kanseri Çalışmaları.....	28
Tablo 5.1 : WI-38 ve HT-29 Hücrelerinde çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi	38
Tablo 5.2 : WI-38 ve HT-29 8 µM çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcı/FDT sitotoksikite sonucu.	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 : Normal bağırsak kıvrımı ile kolon adenomatöz polipi	7
Şekil 3.1 : FDT'de temel ilkeler	10
Şekil 3.2 : FDT işlemi ve ROS oluşumu.....	11
Şekil 3.3 : FDT tip I ve tip II reaksiyonları.....	12
Şekil 3.4 : Hücre ölüm yolları.	13
Şekil 3.5 : Jablonski diyagramı	21
Şekil 3.6 : Dokulardaki ışık yayılımı	24
Şekil 3.7 : Metalsiz (sol) ve çinko (sağ) ftalosiyanın moleküler yapıları.....	28
Şekil 4.1 : İntert mikroskop görüntüleri a) HT-29 ve b) WI-38.....	32
Şekil 4.2 : Çalışma kapsamında hazırlanan çinko ftalosiyanın moleküler yapısı ve sentez şartları.....	34
Şekil 4.3 : Çalışma kapsamında hazırlanan çinko ftalosiyanın UV-Vis spektrofotometrik özellikleri (a) Çinko ftalosiyanine ait DMSO çözücüsü içindeki UV-Vis absorpsiyon spektrumu UV-Vis (DMSO): λ_{maks} (nm) ($\log \epsilon$)= Q: 705 nm (5.03), Q': 633 nm (4.29), B: 321 nm (4.44) – (Konsantrasyon: 10 μ M) (b) Çinko ftalosiyanine ait UV-Vis seyrelme çalışması	35
Şekil 4.4 : Hücre kültürü uygulaması yapılması.	36
Şekil 5.1: WI-38 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının 24 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılık değerleri.....	38
Şekil 5.2: WI-38 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının LED uygulama çalışması.....	40

ÇİNKO FTALOSİYANİN TÜREVİ FOTODUYARLAŞTIRICININ FOTODİNAMİK TERAPİ YÖNTEMİ İLE KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Kolon kanseri dünya genelinde yaygın olarak gözlenen bir kanser türüdür. Sanayileşen dünya düzeniyle birlikte günden güne kolon kanseri vakaları artış göstermektedir. Bireylerin beslenme şekilleri, egzersiz düzenleri, sigara-alkol tüketme alışkanlıkları, ailesel kolon kanseri öyküleri hastalık risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir. Semptomlarının çok geç fark edilmesi ya da hiç fark edilmemesi sebebiyle ilerleyen evrelerde ancak tespit edilebilen kolon kanseri için tedavi amacıyla kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. Ancak bu uygulamaların sınırlayıcı yönleri olmakla birlikte tedavi süreci ve sonrasında zararlı yanıtlar ortaya çıkabilmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda yeni tedavi yaklaşımları değerlendirilmesi ile fotodinamik terapi (FDT) yöntemi bir alternatif olarak öne çıkmıştır. FDT’de üç ana bileşen dikkat çekmektedir: Işık, ışığa duyarlı ajan ve oksijen. Bu tedavi yöntemi ışığa duyarlı bir maddenin sistemik, lokal ya da topikal olarak uygulanması ve ışığa duyarlı maddenin bir ışık kaynağı yardımıyla uygun dalga boyu ile uyarılması suretiyle singlet oksijen üretmesi ve hücre ölüm mekanizmalarını başlatması prensibine dayanmaktadır. Yüksek ROS seviyeleri hücre için toksisiteye neden olurken kanser hücresi ölümünü gerçekleştirebilir.

Bu tez çalışmasında HT-29 ve WI-38 hücre hatları üzerinde, ilk defa sentezlenen çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının FDT yöntemiyle sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. HT-29 ve WI-38 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (1-150 μM) fotoduyarlaştırıcı uygulanmasının ardından 24 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yapılan sitotoksikite değerlendirmeleri için CCK-8 testi kullanılmıştır. İnkübasyon süresi (24 saat) sonrasında sitotoksikite değerlendirmelerine göre uygulanan fotoduyarlaştırıcı maddenin HT-29 için toksik etki gösterip WI-38 hücrelerinde toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. HT-29 hücre hattı için etkin konsantrasyon değeri 8 μM tespit edilmiştir.

Çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının bulunan etkin konsantrasyonu FDT aşamaları için yeni ekilen hücrelere uygulanmış ve inkübasyonu sonrasında hücrelere 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm^2 güç yoğunluklarında LED ışıltma yapılmıştır. Işıltma sonrasında hücreler 24 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcı uygulanan HT-29 hücrelerinde 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm^2 güç yoğunluklu LED ışıltma sonrası 24 saatte canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ve WI-38 hücrelerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar tez kapsamında kullanılan çinko ftalosiyanın FDT için potansiyel bir fotoduyarlaştırıcı ajan olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, Ftalosiyanın, Fotoduyarlaştırıcı, Fotodinamik terapi.

DETERMINATION OF THE EFFECT OF ZINC PHTHALOCYANINE DERIVATE PHOTSENSITIZER ON COLON CANCER CELLS BY PHOTODYNAMIC THERAPY

ABSTRACT

Colon cancer is a common type of cancer worldwide. With the industrializing world order, colon cancer cases are increasing day by day. Individuals' diet, exercise patterns, habits such as smoking and alcohol consumption, and familial history of colon cancer are considered as risk factors for the disease. Due to the fact that its symptoms are not easily recognizable, or sometimes not recognizable at all, treatment approaches such as chemotherapy and radiotherapy are applied for the treatment of colon cancer, which can only be detected in advanced stages. However, these practices present certain limitations to individuals and may lead to harmful responses (or outcomes) during and after the treatment process. In line with these harmful outcomes in patient health, In line with these results, photodynamic therapy (PDT) method has come to the fore as an alternative with the evaluation of new treatment approaches. PDT has three components: light, photosensitizer and oxygen. This treatment method is based on the principle that a photosensitizing agent is administered to the patient systemically, locally or topically where, the photosensitizing agent is irradiated with the appropriate wavelength with the help of a light source to produce singlet oxygen and initiate cell death mechanisms. High ROS levels can cause cell toxicity and cause cancer cell death. In colon cancer cells, ROS production is higher than in normal cells.

In this thesis, it is aimed to investigate the cytotoxic effect of the synthesized zinc phthalocyanine for the first time derivative photosensitizer on HT-29 and WI-38 cell lines by PDT method. HT-29 and WI-38 cells were treated with different concentrations (1-150 μM) of photosensitizer and incubated in an incubator for 24 hours. CCK-8 assay was used for cytotoxicity evaluations after incubation. According to cytotoxicity evaluations after the incubation period (24 hours), it was determined that the photosensitizer applied was toxic to HT-29 but not to WI-38 cells. The effective concentration value 8 μM was determined for HT-29 cell line.

The effective concentration of the zinc phthalocyanine derivative photosensitizer was applied to the newly planted cells for the PDT stages, and after incubation, the cells were irradiated with LEDs at power densities of 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm^2 . After irradiation, cells were incubated in the incubator for 24 hours. The HT-29 cells that were treated with 8 μM zinc phthalocyanide based photosensitizer were exposed to different densities of LED irradiation at 1,3,5,8,10,12 J/cm^2 . Upon 24 hours of incubation, the viability of the cells were statistically observed to drastically decrease and there was no sign for cytotoxicity on WI-38 cells. These results show that the zinc phthalocyanine used in the thesis can be considered as a potential photosensitizing agent for PDT.

Keywords: Colon cancer, Phthalocyanine, Photosensitizer, Photodynamic therapy

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Yıllar boyu süregelen alışkanlıklar, yaşam biçimleri ve değişen dünya düzeni ile birlikte kanser tanısı alan hasta sayıları dikkat çekici şekilde artmaya başladı. Kanser oluşumu kontrolsüz hücre büyümesi olarak tanımlanabilir. Temelde aynı genetik materyali taşıyan hücre topluluklarının, dokudan aşırı büyümesi sebebiyle oluşmaktadır. Bu hücreler, büyümeyi durdurma yeteneğini kaybetmiş hücrelerdir. Hücre içinde büyüme karşıtı, ölüm sinyallerini oluşturan mekanizmalara direnç gibi kanserli hücrelere ayırt edici özellikler kazandıran genetik değişiklikler yaşanarak kanserli hücrelerin artışı ya da gelişimi durdurulamayabilir. Kanser gelişimi için aktif onkojen varlığı, işlevsiz tümör baskılayıcılar gibi etmenler kanser hücrelerinin oluşumundan sorumludurlar ancak kanser için daha fazlasına ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser gelişimi olarak adlandırılan karsinogenez için apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon potansiyeli, kendine yeten proliferasyon vb. etmenler önemlidir.

Kanser gelişim aşamaları ise başlangıç, gelişme ve ilerleme olarak üç grupta toplanabilir. Başlangıç grubu için kanser hücresi başlatma operasyonu hücrede; nokta mutasyonları, gen silinmesi, geri dönüşümsüz hücresel boyutta değişikliklerin yaşanmasına sebep olan genomik değişimlerle başlamaktadır. Gelişme sürecinde bu hücrelerin canlı kalımı ve klonal hücreler ile yayılımı desteklenmektedir. İlerlemiş grup olarak kanser hücreleri, anormal büyümeleri ve birbirini etkileyen metastazlar ile ilişkilidir [1,2].

Kolon kanseri, dünyada en sık görülen kanserlerdendir. Sanayileşme ve kötü beslenme şartları ile artan oranları bulunmakla birlikte ailesel öyküsü de çok fazladır. Kolon kanseri vakalarının % 1-3 aralığını bilinen kalıtsal sendromlar oluşturmaktadır. Ayrıca kolon kanseri olan kişilerin birinci derece akrabalık ilişkileri değerlendirildiğinde, kalın bağırsak malignite riskinin arttığı görülmüştür. Buna ek olarak kolon kanseri gelişimi birbirini takip eden bir gen kaybı süreciyle ilişkilidir. Artan vakaların batılı diyet modelleri, fiziksel egzersiz yetersizliği, obezite gibi sebeplerden kaynaklandığı da

düşünülmektedir. Erken evrelerde tespit edilen kolon kanseri, tedaviden olumlu sonuçlar alabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), gelişen etkili tarama yöntemlerinin kabul görülmesi ve benimsenmesi üzerine yapılan tarama değerlendirmelerinin artışı yaşlı insanlarda görülen vaka sayısını ve ölüm oranlarını azaltmıştır. Ayrıca kullanılan mevcut tedavi yöntemleri de (cerrahi, radyoterapi, kemoterapi vb.) kolon kanseri için katkı sağlayan yöntemlerdir. Periferik kök hücre nakli, hormon tedavisi, kriyocerrahi, fotodinamik terapi (FDT) gibi yöntemlerde kolon kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Tez çalışmasında kullanılan FDT, cerrahi müdahaleye gerek kalmaksızın kanserli dokunun yok edilmesi/azaltılması suretiyle geleneksel yöntemlerin oluşturabileceği hasarı bertaraf etmek için de yeni bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir [1,3-5].

FDT, kanser hastaları için umut verici bir yaklaşım olarak kanserli hücreler üzerine bir fotoduyarlaştırıcının (FD) enjeksiyonu ve ışık kaynağı aracılığıyla uygun dalga boyu ile ışımaya yapılmasını içermektedir. FD'nin aktive edilmesi ve singlet oksijen (1O_2) oluşumuyla hücre için geri dönüşümsüz hasarların oluşması ve hücre ölüm mekanizmalarının başlatılması prensibiyle çalışmaktadır. Yapılan araştırmalar ışığında, FDT'nin özellikle erken evrelerde teşhis edilen vakalarda uygulanmasıyla, hastalarda iyileştirici etkisinin ve ameliyat edilmesi imkansız durumda olan hastaların yaşamsal faaliyetlerinde verimin artmasını sağlamaya yönelik faydalarının olabileceği çalışmalar ile bildirilmiştir [6-8].

Bu bağlamda, mevcut tez çalışmasında HT-29 ve WI-38 hücre hatlarında çinko ftalosiyanın (ZnPc) türevi FD'nin farklı konsantrasyonlar ve güç yoğunluklarında sitotoksik ve fototoksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, en yaygın üçüncü kanser türü olarak bilinmekle birlikte kansere bağlı ölümlerde de en yaygın dördüncü kanser türü olarak bilinmektedir. Yıllık artış gösteren bu vakalar için yapılan çalışmalarda çoğu vakanın Batı ülkelerinde olduğu görülmektedir [9]. Ülkelerin ekonomik gelişmişlik derecesine göre hastalığın artış azalış rakamları değişiklik göstermekle birlikte hastalık, ülkelerin sosyoekonomik gelişiminin göstergesi olarak kabul görmektedir [10]. Kolon kanserine yakalanma olasılığı yaklaşık olarak %4 ile %5 aralığında iken ilgili kanserin gelişme riski bireylerin yaşı, kronik rahatsızlıkları, olumsuz modern beslenme alışkanlıkları, sigara, düşük fiziksel egzersiz, obezite ve bunlarla ilişkili özellik ve alışkanlıklardaki risk faktörlerindeki artışla bağlantılıdır [9,11]. Kolon kanseri nedenleri incelendiğinde tümör baskılayıcı genler, DNA onarım mekanizmaları, onkogenler ile ilgili genlerin hedef alındığı mutasyonların yol açtığı görülmektedir. Bu mutasyon kaynaklarıyla ilişkili olarak kolon karsinomları %70 sporadik, %5 kalıtsal ve %25 ailesel olarak belirlenmektedir. Bu durumun oluşmasına neden olan sistemler ise üç tip olmak üzere incelenebilir; kromozomal kararsızlık (CIN), mikro uydu kararsızlığı (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP). Bu tiplerin kromozomal düzeyde ve bazı önemli yollarda mutasyonları etkilediği yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [9]. Artan vakalar ile yeni tedaviler geliştirme yoluna gidilmiş olup bu tedaviler laparoskopik cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Buna rağmen son yıllarda sağkalım oranları çok az değişkenlik göstermiştir çünkü kolon kanserinin gelişimi belirsiz olup bir lezyon ve sonucunda kanser gelişimi yaklaşık on ile on beş yıllık bir süreci kapsayabilir. Bu nedenle kolon kanserinin gelişimi öncesinde bir polipoid öncünün varlığı göz önüne alınıp erken teşhis amacıyla tarama programları hızlandırılmıştır [11,12].

2.2. Kolon Kanseri Epidemiyolojisi

Kolon kanseri erkek bireylerde en sık görülen üçüncü kanser türü olurken, kadın bireylerde erkeklerden farklı olarak en sık görülen ikinci kanser türü olmuştur. 2012 yılında dünya genelinde 614.000 kadına ve 746.000 erkeğe kolon kanseri teşhisi konulmuş olup, kadınlarda bu oran tüm yeni kanser vakalarının %9,2'sini ve erkeklerde ise yeni kanser vakalarının %10'unu oluşturmuştur. Ayrıca kolon kanseri melanoma dışı cilt kanseri haricindeki tüm kanserlerin de %9,7'sini oluşturmaktadır. Yaşa göre görülme oranı erkek ve kadınlarda incelendiğinde, erkek vakalarının (100.000 kişide 20,6), kadınlardan (100.000 kişide 14,3) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sporadik mutasyon kaynaklı kanserli hastaların birçoğu elli yaşından büyük olup, rektum kanserli hastaların %75'i ve kolon kanserli hastaların %80'i 60 yaş ve üzeridir. 2020 yılı ile birlikte 1,9 milyonun üzerinde yeni vaka olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kolon kanseri, kanserden ölümlerin yaygın sebebi olduğundan yaklaşık 935.000 bireyin ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. 2020 verileri incelendiğinde kolon kanseri görülme ve kolon kanseri sebepli ölümlerde geniş coğrafi çeşitlilik gözlenmektedir. Kolon kanseri için izlenen vaka ve ölüm artışının, batılı yaşam biçimi olarak adlandırılan yaşam biçimini özümseyen orta ve yüksek insani gelişme indeksi (İGE) ülkelerinde olduğu görülmektedir. Bu durum aynı zamanda gelişmiş ülkelerin kolon kanseri için en yüksek riske sahip olduğunu göstermektedir. Vakaların coğrafi olarak değişiklik göstermesi ile en yüksek vaka oranı Avustralya ve Yeni Zelanda'da, en düşük vaka oranı ise Batı Afrika'da görülmektedir. Kolon kanserine sebep olan faktörler incelendiğinde özellikle obezite, hareketsiz yaşam şekli, kırmızı et ve alkol, tütün tüketimi kolon kanseri gelişiminde itici faktörler olarak belirlenmiştir. Bu sebeple kolon kanseri bu faktörlerin yoğun olduğu batılı yaşam tarzına sahip gelişmiş ülkelerin bir hastalığı olarak kabul edilmektedir. Erken evrede beş yıllık sağkalım oranlarına bakıldığında kolon kanseri için %90 fakat sonraki evrelerde teşhis edildiğinde %13'tür. Her iki cinsiyette de 100.000 kişide kolon kanserinden ölüm yaşa göre standardize edilmiş olarak %8,9'dur [10,11].

2.3. Risk Faktörleri

Kolon kanseri gelişiminde farklı birçok etkenin ve risk faktörünün (Tablo 2.1) varlığından söz edilebilir. Hasta adaylarının risk durumu izlendiğinde bireylerin aile ve tıbbi geçmişi, kanser, kolon polip öyküsü, kolesistektomi, inflamatuvar bağırsak hastalıkları veya diyabet geçmişlerinin olması kolon kanseri için yüksek risk varlığını göstermektedir. Buna ek olarak kişilerin hayat biçimleri kolon kanseri etiyojisi için önemli bir etkidir. Bireylerin yaşantısındaki fiziksel aktivite eksikliği, obezite hali, sigara ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme modellerinin tercihi gibi faktörlerin kolon kanseri riskini arttırdığı gözlenmektedir. Tüm bu etkenlerin varlığı ile birlikte bireylerin yaş, cinsiyet, ırk, bağırsak sağlığı, sosyal şartları da kolon kanserinde risk faktörü olduğu bilinen etkenlerdir [10].

Tablo 2.1 : Kolon Kanseri Risk Faktörleri [10].

Aile ve Kişisel Öykü	Yaşam Tarzı	Diğerleri
Aile öyküsü ve genetik	Yüksek Kilo ve Obezite	Bağırsak Mikrobiyotası
İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	Yanlış Diyet Kalıpları	Yaş
Kolon Polipleri	Fiziksel Hareketsizlik	Cinsiyet ve Irk
Şeker Hastalığı	Sigara Kullanımı	Sosyoekonomik Faktörler
Kolesistektomi	Alkol Tüketimi	

Aile bireylerinin tıbbi öykülerinde kolon kanseri varlığı diğer bireyler içinde kolon kanseri geliştirme riskini büyük oranda arttırmaktadır. Çünkü bu durumda kişiler hem kalıtsal genetik yatkınlık hem de yaşam biçimi unsurlarını paylaşmaktadır. Aile geçmişi risk faktörü olarak değerlendirildiğinde yapılan çalışmalar, birinci derece yakınları (anne-baba, kardeşler ve çocuklar) kolon kanserine maruz kalmış kişilerin, aile öyküsü olmayan kişilere göre yaklaşık iki kat daha fazla kolon kanseri risklerinin var olduğunu göstermiştir [10,13].

Kolon kanseri vakaları incelendiğinde ortaya çıkma nedenlerinin %2-8 oranında kalıtsal sendromlar sebebiyle olduğu tahmin edilmektedir. Bu anlamda kanser gelişimine büyük oranda yatkınlık oluşturduğu bilinen iki kalıtsal sendrom Lynch sendromu (HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis koli (FAP)'dir. HNPCC, otozomal baskın bir hastalık olmakla birlikte bilinen bazı genlerdeki (MLH1 ve MSH2) mutasyonlar ile ilişkilidir [10]. FAP ve diğer alt tipleri (Gardner's sendromu, Turcot's Sendromu ve zayıflamış FAP) kolon kanseri için yaklaşık %1'lik bir dilim oluşturmaktadır. FAP için çocukluk dönemlerinde çok sayıda kolonik adenom varlığından söz etmekle birlikte semptomlarının yaklaşık olarak on altı yaşlarında görüldüğü bilinmektedir. Bununla birlikte erken teşhis edilememiş ve tedavi uygulanamayan durumlarda kırk beş yaşlarında bireylerin %87'sinde kolonik kanser izlenmektedir [13].

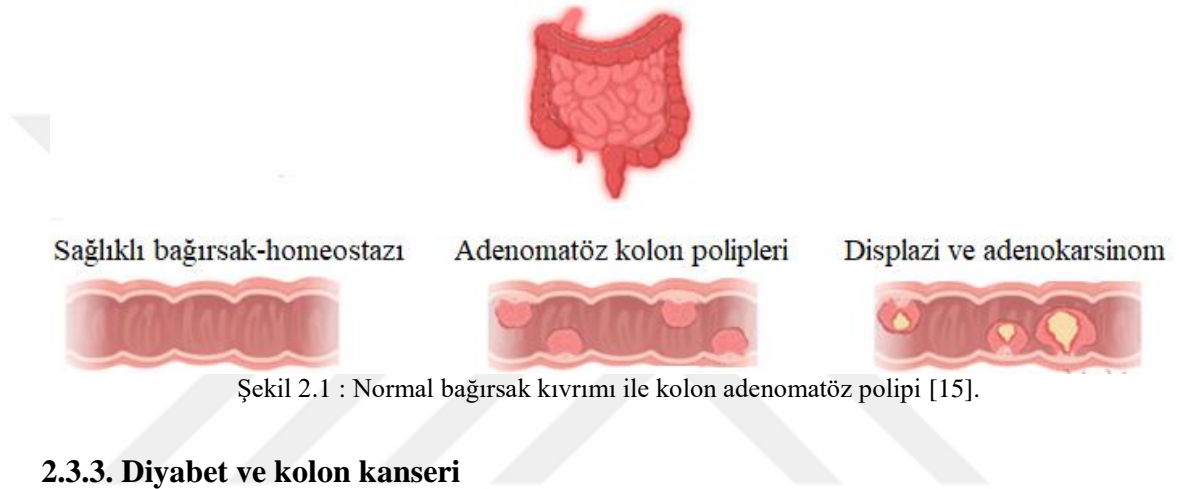
2.3.1. İnflamatuvar bağırsak hastalığı

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, kolonun uzun süre iltihaplanması durumudur. Bu hastalığa sahip kişiler tedavi edilmezlerse kişilerde sıklıkla displazi gelişimi görülür ki displazi zamanla kansere dönüşebilmektedir. Kolon kanseri için Lynch sendromu ve FAP'tan sonra üçüncü en yaygın neden olarak bilinmektedir. Bununla birlikte aktif kolonik inflamasyon alanları üzerinden gelişim gösteren kolit ile ilişkili kolon kanserleri için tüm inflamatuvar bağırsak hastalıklarının %10-15'inin ölüm nedeni olarak bilinmektedir. Ülseratif kolit ya da Crohn hastalığı dahil inflamatuvar bağırsak hastalıkları kolon kanseri riskinin artışında etkin bir faktördür. Fakat bununla birlikte bağırsak inflamatuvar hastalıkları batı toplumları için kolon kanserlerinin ortalama %1'lik kısmını açıklayabilir [11,13,14].

2.3.2. Adenomatöz kolon polipleri

Kolon kanseri başlangıç evresi, genellikle mukozal tabaka olan kolonun en derin tabakasındaki bir büyüme ile temsil edilmektedir. Bu tabakadaki büyümelere polip adı verilmektedir. Oluşan polipler genellikle birkaç sene içerisinde kanserli duruma gelebilirler. Ancak yine de tüm polipler kanserli olmayabilir.

Bir polibin kanserli olması ile ilgili olarak ana özelliğine yani tipine bakılması gerekmektedir. Üç tip ana polip türü varlığından bahsedebiliriz: Adenomatöz polipler (Şekil 2.1) (çoğunlukla kanser öncesidir ve kolon kanserlerin %96'sını temsil etmektedir), hiperplastik polipler ve inflamatuvar polipler. Hiperplastik polipler daha yaygın olmakla birlikte çoğunlukla kanser öncesi değildir. Yapılan bazı çalışmalarda bağırsak florasında görülen dengesizlik ve adenomatöz kolon polipleri arasında kolon kanseri gelişimini destekleyen bağlantılar olduğu düşünülmektedir [15].



2.3.3. Diyabet ve kolon kanseri

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte diyabet ve kanser arasında bir neden sonuç ilişkisinin varlığı tahmin edilmiştir. Elde edilen kanıtlar ile diyabet ve belirli kanser türlerinin ilişkisinin var olduğu düşünülmektedir. Araştırmalar diyabet hastalığının, hastalarda kolon kanserinin oluşma riskini %30 arttırdığını göstermektedir. Amerikan Diyabet Derneği, diyabet ile kanser riski arasında bir ilişki olduğunu kabul etmektedir. Hiperglisemi, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü düzeylerinin bazı etkileşimleri ile kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasında etkili olabilmektedir. Bazı çalışmalar diyabetle birlikte kolon kanseri varlığının hastalarda ölüme sebep olma riskini arttırdığını bildirmektedir. Kolon kanseri ile birlikte diyabet hastalığının faktörlerini araştırmak bu iki hastalık arasındaki etkileşim mekanizması hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmasını sağlamakla birlikte iki hastalık arasındaki bağlantının anlaşılmasına yardımcı olacaktır [16].

2.3.4. Kolesistektomi

Safra kesesinin vücuttan cerrahi olarak çıkarılması kolesistektomi olarak adlandırılmakla birlikte kolesistektomi sonrası kolon kanseri oluşma sıklığı kesin olarak belirlenebilmiş değildir. Yapılan bazı çalışmalar kolesistektomi sonrası kolon kanseri gelişme riskini yükselttiğini gösterse dahi diğer çalışmalar herhangi bir risk artışı gerçekleşmediğini bildirmektedir. Kolesistektomi ardından kolon kanseri riskine, safra asitlerinin salgılanması ve yapısındaki değişikliklerin sebep olduğu düşünülmektedir. Çünkü safra kesesi yokluğunda bağırsağa safra salınımı gerçekleşir ki bu da bağırsakta gerçekleşen bazı olumsuz durumlara sebep olmaktadır. Oluşan bu olumsuz değişim ile safra asitleri reaktif oksijen ve nitrojen türleri oluşturma, hücre zarını bozma, kolon kanseri riskini arttırıcı DNA hasarına sebebiyet verme ve apoptozu indüklemeye yetilerine sahiptir [10].

2.3.5. Yaşam tarzı ve diğer etkenler

Genel olarak yapılan incelemelerde bazı belirsizlikler var olsa da birçok veri yaşam tarzı, diyet gibi faktörlerin kolon kanseri riski üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yaşantılardaki fiziksel hareketlerde azalma, vücut ağırlığının artışı ile obezite gelişimi de risk faktörleri arasındadır. Diyet kalıplarında yapılan hatalar (kırmızı ve işlenmiş ette yüksek diyet, lif-meyve-sebze açısından düşük diyet vb.), alkol ve sigara tüketimi, bağırsak mikrobiyatası, yaş, cinsiyet gibi faktörlerde kolon kanseri riskinde önemli ölçütlerdir. Bununla birlikte kolon kanserlerinin büyük bir yüzdelik diliminin, beslenme ve yaşam tarzındaki ılımlı değişikliklerle önlenebileceği de çalışmalarda görülmektedir [17].

2.4. Kolon Kanseri Tedavisi

Kolon kanseri teşhis ve tedavisi için diğer hastalıklarda olduğu gibi bazı prosedürlere ihtiyaç duymaktadır. Teşhis için kullanılan birçok seçenek vardır. Fakat kullanılan yöntemin doğrulanması amacıyla farklı gereksinimler de doğmaktadır. Biyobelirteçler teşhis için kullanılmakla birlikte biyobelirteç kullanımına ek olarak kolon kanseri için klinik kullanımlarda vardır. Bunlar; kolonoskopi, sigmoidoskopi, çift kontrastlı baryumlu lavman, bilgisayarlı tomografik kolonoskopi ve dışkı kan testi (FOBT)'dir.

Biyobelirteçler, tanı koymak ve tedavi seçiminde yarar sağlamak adına ölçüm ve kullanımda kolaylık sağlamaktadır. Tüm bunların yanı sıra yüksek duyarlılığa, özgüllüğe ve gerekli olan güvenlik gibi önemli pek çok özelliğe de sahip olmalıdır [9].

2.4.1. Kolon kanseri güncel tedavi yaklaşımları

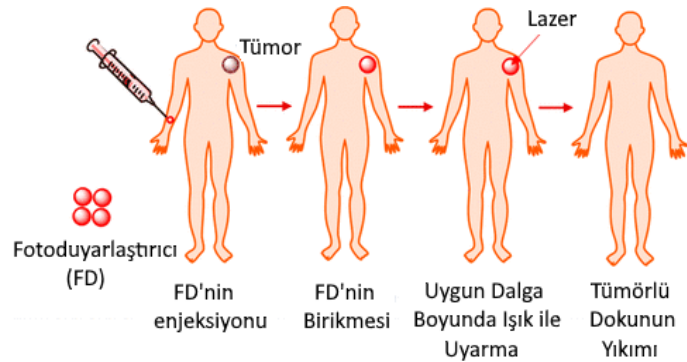
Kolon kanseri tedavi yöntemleri arasında cerrahi yöntemler, adjuvan radyoterapi veya kemoterapi bulunmaktadır. Tedavi seçiminde öncelikle tümör durumuna ve hastaya bağlı faktörlere bakılarak tedavi yöntemi seçimi yapılmaktadır. Çünkü kolon tümörleri yerleşim yerlerine göre sağ ve sol kolon olarak ayrılmaktadır. Sağ kolon tümörü olarak kabul edilen bölge çekum-transvers kolonun 2/3 bölgesi iken sol kolon tümörü 1/3 transvers kolon-rektum bölgesidir. Bu şekilde bir ayrımın yapılmasının başlıca nedeni aynı organ olmasına rağmen farklı histolojik, klinik, çevresel ve moleküler yapıya sahip iki kısımdan oluşmasından dolayıdır. Bu inceleme ile tedaviyi yönlendirecek tümör lokasyonu ve kanser risk grubu sınıflandırması belirlenmeye çalışılmaktadır. Evre I ve diğer evreler için cerrahi yöntem genel bir yöntemdir. Evre II ya da diğer evreleri kapsayan kolon kanseri hastalarında cerrahi tedavinin yanı sıra kemoterapi, adjuvan radyoterapi, immünoterapi tedavileri kullanılmaktadır. Kemoterapi tedavisinde 5-FU, L-OHP, irinotekan ve kapesitabin çok sık kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan kemoterapi ilaçları farklı ajanlar ile kombine edilerek de tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Geleneksel kemoterapinin yanı sıra, tedavi veriminin artması, yan etkilerin azaltılması ve bununla birlikte ikincil bir tümör geliştirme riskini azaltmak amacıyla var olan tedavilere ek farklı tedavi seçenekleri üzerinde çalışılmaktadır. Günümüzde önemli araştırma alanları olarak anti-inflamatuar ilaçlar, probiyotikler ve altın türevi ilaç tedavileri karşımıza çıkmaktadır [9,18,19]. Tüm bu tedavilerin yanı sıra kanserli hücrelerin biyolojik yapısını anlamamızı sağlayan ve bu doğrultuda tedavi amaçlı ilaç tasarımlarını geliştirmeye olanak veren çalışmalar önemli gelişmelere yol açmaktadır. Bu bağlamda fotodinamik terapi (FDT) karşımıza çıkmaktadır. Gelişimini devam ettiren FDT birçok tıbbi gerekliliği karşılayacak potansiyelde olmakla birlikte başarılı ve klinik olarak onaylanmış terapötik tedavi yöntemidir [6]. Bu yöntem ile kolon kanseri tedavisinde yapılan çalışmalar umut vaat etmekle birlikte gelecekte yapılacak klinik çalışmaların ışığında neoadjuvan terapi planlamalarıyla kullanılabilir [20].

BÖLÜM 3. KANSER TEDAVİSİNDE YENİ BİR YAKLAŞIM: FOTODİNAMİK TERAPİ

3.1. Fotodinamik Terapi

Işık binlerce yıl önceden beri bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Ancak araştırmacılar 100 yıldan daha fazla bir süre önce ışığın bazı kimyasallar ile etkileşiminin hücre ölümü gerçekleştirebildiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmaların incelenmesine yönelik çalışmalar ise fotodinamik terapinin (FDT) gelişimini sağlamıştır [21].

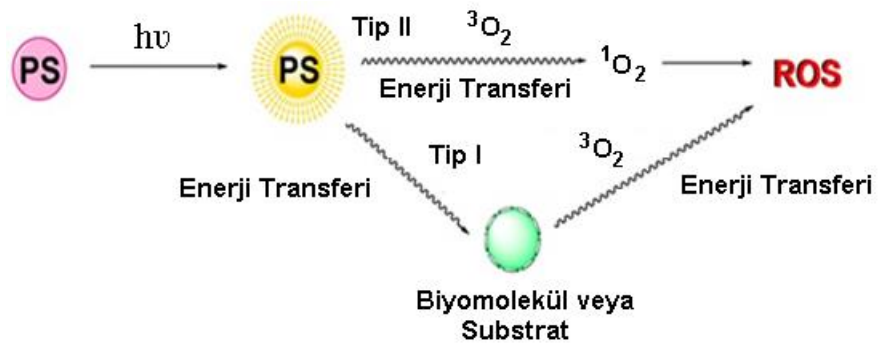
FDT, bazı hastalıklar ve kanser hücrelerine karşı fotoduyarlaştırıcı (FD) bir maddenin uyarılması ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi ve hedef hücre ölümünün gerçekleştirilmesi prensibiyle çalışan tedavi yöntemidir. FDT’de hedef hücrelerde sitotoksik bir durum oluşması sağlanmaktadır. Bu doğrultuda hastanın taşıyıcılığını yaptığı lezyonlar için hastaya sistemik, topikal ya da lokal şekilde ışığa duyarlı ilaç uygulanmaktadır. FD’nin uygulanmasının ardından gerekli inkübasyon süresi sonunda, uygulanan FD’nin lezyonda hücre ölümü ve doku yıkımına yol açabilecek uygun dalga boyundaki ışıkla uyarılması gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.1) [6,20,22].



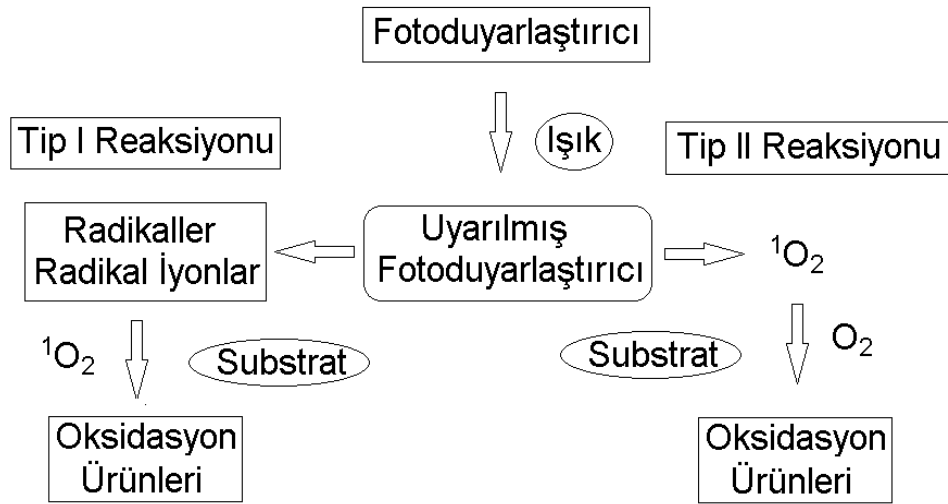
Şekil 3.1: FDT'de temel ilkeler [23].

3.2. Fotodinamik Terapi Mekanizması

FDT'nin mekanizmasını anlayabilmek için gerekli olan bileşenlerin kombinasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. FDT üç bileşen içerir: Işık, FD, oksijen. FD, ışığın belli dalga boylarına maruz bırakıldığında uyarılmış enerji seviyesine geçiş yapmaktadır. Temel enerji seviyesine geri dönüşünde ise singlet oksijen (1O_2) ve serbest radikaller gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu (Şekil 3.2) için oksijene aktarılan enerjiyi serbest bırakarak hücrel toksisite oluşturmaktadır. FDT yaklaşımında, FD kan dolaşımına enjekte edilmektedir. Enjekte edilen FD vücuttaki hücreler tarafından emilir fakat normal hücrelere nazaran kanser hücrelerinde, bu hücrelerin doğası gereği daha fazla birikmektedir. Enjeksiyon sonrası inkübasyon ardından FD çoğu hücreden büyük oranda ayrılmışken kanser hücrelerindeki varlığını önemli miktarda korumaktadır. Bunun ardından uyarılmış bir enerji seviyesine ulaşabilmek adına FD için uygun bir dalga boyunda ışığa maruz bırakılmaktadır. Işığı emen FD absorbe ettiği enerjiyi oksijen gibi moleküllere aktarabilir ve bu durum 1O_2 oluşumuna sebep olur. Beraberinde kanser hücrelerini yok eden ROS oluşmaktadır. Bu durum Tip II mekanizma ile ilişkilidir. Tip I mekanizması ise FD enerjisinin biyomoleküle ya da substrata aktarılması ile ilgilidir (Şekil 3.3). Bu durumdaki ara maddeden enerji oksijene iletilerek tekrar ROS oluşumuna ve süreç sonrasında ise hücrelerin apoptotik ya da nekrotik ölümlerine sebep olmaktadır [21,22,24,25].



Şekil 3.2 : FDT işlemi ve ROS oluşumu [25].



Şekil 3.3: FDT Tip I ve Tip II reaksiyonları [21].

FDT’de FD’ler bir katalizör görevi görmeye birlikte FDT mekanizması gereği FD, kan dolaşımına enjeksiyonu sonrasında ışık uyarımı ile bazı reaksiyonlar gösterebilmektedir. FD, toksik radikaller (peroksit, hidroksi radikali, süperoksit anyonu vb.) üretmek için ROS’un Tip I (elektron transferi) reaksiyonları ya da 1O_2 üretmek için ROS Tip II (enerji transferi) reaksiyonları oluşturabilmektedir. Bilinen FD’ler çoğunlukla ROS Tip II mekanizmasını oluştururken birkaç yöntem Tip I ROS mekanizmasını oluşturabilmiştir. Yüksek ROS seviyeleri hücrede önemli bir toksisiteye neden olarak kanser hücresi ölümünü gerçekleştirebilir. ROS’un sebep olduğu toksisite ile hücrelerde farklı yollar ile hücre ölümü gerçekleşebilir. Hücre apoptoz, nekroz, otofaji şeklinde ölüm yollarından birini gerçekleştirebilir [26-28].

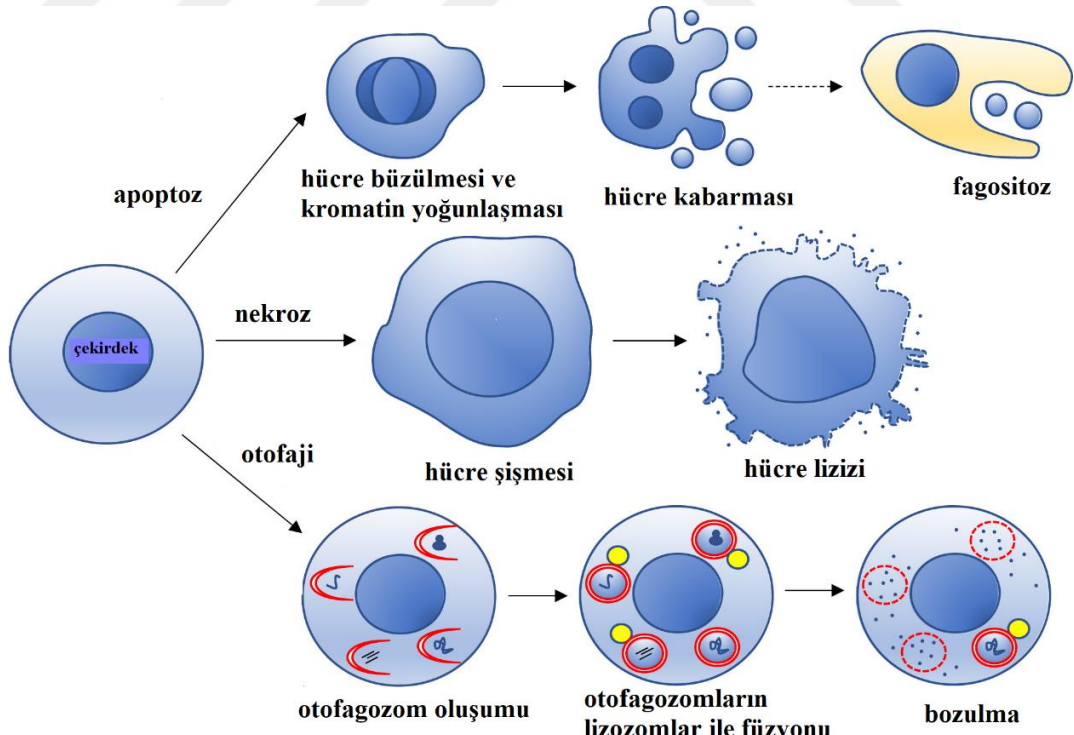
3.3. FDT’de Hücre Ölüm Mekanizmaları ve FDT’nin Tümörler Üzerindeki Etkileri

FDT hücre ölüm yolları incelendiğinde hangi ölüm yolağının gerçekleşebileceği birçok faktöre bağlıdır. Yüksek ROS aktiviteleri ile fotohasar ve sitotoksikite etkisinin de birçok faktöre bağlı olduğu görülmektedir. Burada FD tipi, FD’nin hücrede veya hücre dışında konumlandığı bölge, uygulanan miktar, ışığa maruz bırakılma dozu, oksijen varlığı, aydınlık ve karanlık evre arasındaki süreler gibi faktörlere bağlıdır. Her bir faktör birçok farklı sonuca yol açabilmektedir [21].

FDT’de hücre ölümleri, fototoksikite sonucu oluşmaktadır. Kanserli hücreye göre belirlenen FD’ye uygun dalga boyundaki ışık ve FD’nin gerçekleştirdiği tepkimeler

sonucunda oluşan ROS tipi ile tümörlü bölgedeki hücrelerin ölümü sağlanmaktadır [29]. FDT temelinde ışık ve FD ile başlatılan bu mekanizmada hücre ölümü üç ana prensibe dayanmaktadır (Şekil 3.4). Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan bu sistemler genetik kodlamaya sahip bir hücre intihar mekanizmasıdır. FDT kapsamında da bu hücre ölüm yolları apoptoz, nekroz ve otofaji olarak karşımıza çıkmaktadır [6,30]. Programlanmış Tip I hücre ölümü olan apoptozun, fenotipik değişkenler ile karakterizasyonu belirlenmektedir. Otofaji ise hücrenin lizozomal bağımlı sindirimi ve otofagosomlar ile varlığı ayırt edilen bir hücre ölüm yolağı olarak belirlenmektedir. Hücresel şişlik ve plazma membran bütünlüğünün kaybedilmesi durumu da ölüm yolağı olarak nekrozu göstermektedir.

Bu üç ana mekanizmada geri döndürülemez ve en yaygın olarak belirlenen hücre ölüm yolağı apoptoz olurken, bu mekanizma 1991 yılında ilk kez FDT'ye cevap olarak kaydedilmiştir. Ayrıca genel olarak apoptozun, FDT ile hücrelerin *in vitro* olarak tedavisinde hücre ölümünün başlıca yöntemi olduğu kabul edilmektedir [30,31].



Şekil 3.4: Hücre ölüm yolları [32].

3.3.1. Apoptotik hücre ölümü (apoptoz)

Apoptoz, kanser vb. durumlarda patolojik ve fizyolojik olarak önemli bir biyolojik durumdur. Çok yollu ölüm programlarından en iyi çalışan ölüm yolağıdır. Apoptotik hücrelerde biyokimyasal modifikasyonlar olarak protein bölünmesi, DNA parçalanması vb. olaylar görülmektedir. Nükleer ve membran bozunması, hücre ölümünü isteyen bir tepki oluşturmak için gerekli faktörlerin aktifleşmesine yol açan sinyaller ile tetiklenmektedir. Bu da göstermektedir ki apoptoz, kaspaz olarak bilinen protein ailesini ve hücre içi bazı materyalleri bozan düzenlenmiş bir mekanizmadır. Apoptoz, ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ya da sitokrom c'nin mitokondriyal olarak salınması şekliyle de başlatılabilmektedir. Bu iki durumda kaspaz ailesindeki cellat kaspazlar olarak bilinen kaspaz-3-6-7 kaspazlarının aktive olmasına neden olmaktadır. Kaspazların aktive olmasının ardından bir dizi hücresel olay yaşanmaktadır ve DNA parçalanmasına neden olmaktadır. Bu süreçte hücre iskeletinin protein hücreleri de bölünürken bu durum hücre parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu durum tümör hücresi ölümü için var olan bazı ölüm mekanizmalarından (Tablo 3.1) ana ölüm mekanizması olarak apoptotik hücre ölümüne doğrudan yol açabilmektedir [33-35]. Klinik FDT incelendiğinde FDT'nin ilaca dirençli hücre tiplerine karşı etkili olduğu gözlenmektedir. Fakat her zaman FDT'ye apoptotik bir tepki oluşmasa da bunun, fotohasarın hücre içi konum farklılıkları ya da eksik tespit sistemleriyle ilgisi bulunmaktadır [8].

3.3.2. Nekrotik hücre ölümü (nekroz)

Nekroz, morfolojik olarak sitoplazma vakuolizasyonu ve hücre içinde bir dizi moleküllerin salınımı sonucu gerçekleşen reaksiyonlarla plazma zarının şişmesi ve parçalanması olarak ifade edilir. Hücreye karşı fiziksel ve kimyasal zarara sebep olarak gerçekleşen hücre ölümü olarak da bilinmektedir [6, 35]. Yıllarca programlanmamış hücre ölüm yolağı olarak belirtilmişse de yapılan güncel çalışmalar nekrotik hücre ölümünün sinyal iletim yolu şeklinde aktif yayılım gösterebileceğini düşündürmektedir. Bazı reseptörler ile (TNF- ve Fas) belirli hücre hatlarına giriş yapılarak, kaspaz inhibisyonu koşulu ile reseptörle etkileşen protein 1 (RIP1) kinazın aktive olmasıyla nekrozu tetiklediği tespit edilmiştir [30]. Yedi tip nekrotik hücre varlığından söz

edilmektedir ve bu modeller incelendiğinde yedi farklı nekrotik tip tanımlaması yapılsada dizilimlenmiş olaylar sıralamasının bütün tiplerde aynı sıralamayı koruduğu gözlemlenmiştir. Membran geçirgenliği, lizozomal yırtılma, hücre bileşenlerinin bozulumu vb. olayları bu dizilim arasında yer almaktadır. Apoptoz ve otofajinin sahip olduğu ayırt edici özelliklere (Tablo 3.2) sahip olmayan nekroz buna rağmen kesin ardışık olaylar dizilimine sahiptir. Bu nedenle kontrollü oluşum gerçekleştirilebilmektedir [34]. FDT’de nekroz oluşumuna sebep olan faktörleri incelemek apoptoz kadar kolay olmamaktadır. FDT sonrası hücre ölüm yolağı tespit edilerek hücre tipi, FD’nin hücre altı yerleşimi, FD’ye uygun dalga boyundaki ışık dozu kullanımı, oksijen kısmi basıncı gibi etmenler önemlidir ve bu etmenlere bakılarak ölüm yolağı oluşum sebepleri incelenebilir [35].

FDT’de tercih edilen hücre ölümü apoptoz yöntemiye de apoptozdan nekroza geçiş mümkün olup bu durum FD dozuna bağlıdır. Işık, oksijen ve FD kısıtlaması bulunmadığında (yüksek FDT dozu) nekroz ya da apoptoz oluşumunun varlığının mümkün olduğu bilinmektedir [30]. Apoptoz ve nekroz kıyaslaması yapılarak gerçekleşen ölüm yolağı tespiti de daha rahat yapılabilmektedir (Tablo 3.3).

3.3.3. Otofaji

1963’de Çibo Vakfı Lizozomlar Sempozyumu’nda ortaya çıkan otofaji terimi, parçalanmış organeller ve sitoplazma öğelerinin yer aldığı kesecikleri belirtmek amacıyla kullanıldı. Bu tanımlamalar üzerine yapılan çalışmalar ile otofajinin uyarlanabilir, enerji oluşturma yetkinliği olan bir mekanizma olduğu belirtildi [35]. Hücre ölüm yolağı olarak otofaji sistemi incelendiğinde, vakuol içerisine alınan makro moleküllerin ve organellerin lizozomlar ile bir araya gelerek parçalanması üzerine işleyen bir sistem olduğu kabul edilmektedir. Böylece varlığı istenmeyen organeller yok edilmektedir ve sindirimi sağlanan yapılar geri dönüşüm yoluyla hücre büyümesi ve gelişmesi için kullanılmaktadır [36]. Bu sürece bakılarak hücre üretilmesi, geri dönüşümü vb. arasındaki dengenin korunmasına olanak sağlayan katabolik bir mekanizma olarak da otofajiyi tanımlayabiliriz. Otofajiyi tanımlayabilecek en iyi süreç şu şekilde aktarılmıştır: Çift zarlı bir oluşum olarak tanımlanan otofagozom belirlenmiş bir alanı kapsayarak kendini sitoplazma dışındaki bölgeden ayıracak küçük hücre içi bir kese oluşturur. Bu kesenin

taşınmasıyla lizozomla birleşerek otofagolizozom yapısını oluşturur ve lizozomal hidrolazlar olarak adlandırılan bir yapı tarafından otofagolizozom parçalanır.

Otofajinin ilişkili olduğu ilk hastalıklar arasında kanser bulunmaktadır. Bu araştırmalarda otofajinin temel proteinlerinden olan Beclin1'in tümör engelleyici olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra ilk etapta Beclin1'in üretimi yoluyla otofaji tümör baskılayıcı olarak çalışırken aynı tümör daha da ileri durumda olduğunda otofaji, tümörün hayatta kalmak için ihtiyaç duyduğu enerjiyi gerekli bölgelere mekanizma oluşturarak tümörün ilerlemesine olanak sağlamaktadır.

Otofaji ve FDT etkileşimi henüz tam olarak belirlenemese de otofajide sürece dahil olan birçok proteinin FDT'nin sebep olduğu ROS aracılığı ile zarar gördüğü bilinmektedir. Birçok biyolojik yolda çeşitli etkilere sahip olan bu hücre ölüm mekanizması otofagozom oluşturması sebebiyle farklılık göstermektedir. FDT varlığında otofajik sürecin düzenleyicisi olan bazı proteinlerin bazı FD'ler tarafından etkilendiği belirtilmektedir. Bu nedenle otofaji ile FDT etkisinin, tümör hücresi üzerinde kullanılan FD'lerin türüne bağlı olarak değişim gösterebileceği kanısına ulaşılabılır. Otofaji ve apoptoz için FDT ile etkileşim üzerine değerlendirme yapıldığında apoptozun çoğunlukla otofajiye maruz kalan hücreler olduğu görülmektedir. Otofaji de ise hücre tipine göre FDT ile hücre ölümüne teşvik edici ya da engelleyici olduğu görülmektedir. Yapılan araştırma sonuçlarıyla görülmektedir ki otofaji; FD, ışık, ışık dozu, hücre tipine bağlı olarak tümörü baskılayıcı veya ilerlemesi adına ikili roller oynayabilir. Fotohasarı da otofaji indüksiyonuna yol açabileceği de gösterilmektedir. Otofaji aslında bir hayatta kalma mekanizmasıdır. FDT sürecinde tümör baskılayıcı olabileceği gibi hücre ölüm sinyallerini engelleyerek tedavi sürecine direnç oluşturma ihtimali de göz ardı edilmemelidir [26,34,35].

Tablo 3.1 : Fotodinamik terapi (FDT) ile aktive edilen ana hücre ölüm mekanizması [35].

Anti-tümör FDT mekanizması		
	Organeller	Süreçler
	Mitokondri Sitokrom c salınımı Bcl-2 hasarı	Apoptoz
	Sitoplazma NFkB hasarı	Apoptoz
Doğrudan Hücre Hasarı	Endoplazmik Retikulum Beclin 1 mTOR aktivasyonu	Otofaji
	Hücre zarı parçalanması	Nekroz
Damar kapatma	Oksijen ve besinlerin yerel olarak tükenmesi	Apoptoz, Nekroz, Otofaji
Bağışıklık yanıtının aktivasyonu	Sitotoksik T hücreleri	Granzim aracılı apoptoz

Tablo 3.2 : Hücre ölüm yollarının ayırt edici özellikleri [34].

Ayırt edici özellikleri	Apoptoz	Otofaji	Nekroz
Morfolojiler	Büzülme, kabarma, kromatin yoğunlaşması; DNA bozulması, nükleer parçalanma, apoptotik cisimler	Azalan hücre boyutu; çift zarlı veziküller; organel bozulması	Hücre şişmesi; membran büyüklüğünün kaybı; organel şişmesi; DNA merdiveni yok
Düzenleyiciler	Ölüm reseptörleri, Bcl-2 ailesi; Beclin 1, kaspazlar; IAP'ler; adaptör proteinleri; kinazlar; fosfatazlar; kalsiyum iyonları, kalpainler, BCNI 1	mTOR; PI3 kinaz; ATG ailesi; UPR stres sensörleri; Beclin 1; kinaz (JKN); Bcl-2 ailesi; IP3 reseptörü	Kalsiyum iyonları; iyon kanalları; metabolik başarısızlık; PARB, kalsiyum tarafından düzenlenen proteinler, RIP kinaz; ölüm reseptörleri, seramidler
Uyaranlar	ROS; DNA hasarı; ölüm reseptörleri ligandları; gelişim programları; organel stresi; kanser önleyici ilaçlar; ER kalsiyum salınımı	Besin açlığı; protein agregasyonu; acil durum stresi; aşırı kalsiyum; gelişim programları; hipoksi; iskemi; hasarlı organeller; proteazom bozukluğu	Bakteriyal toksinler; metabolik zehirler, iskemi; felç; kalsiyum aşırı yüklenmesi
Cevap	Programlanmış, fizyolojik	Hayatta kalma, tesadüfi, fizyolojik	Kazara, patolojik

Kısaltmalar: ATG, otofaji; Bcl-2, B hücreli lenfoma 2; IAP'ler, apoptoz proteinlerinin inhibitörü; IP3 reseptörü, inositol 1, 4, 5-trisfosfat (IP3) reseptörleri; ER, endoplazmik retikulum; mTOR, (memeli) rapamisininin hedefi; PAR, poli (ADP-riboz); NO, nitrit oksit; PARB, PAR bağlama bölgesi; PI3 kinaz, fosfatidilinositid 3-kinazlar; UPR, katlanmamış protein yanıtı; ROS, reaktif oksijen türleri; RIP 1, ölüme neden olan sinyal kompleksine katılan spesifik bir kinaz.

Tablo 3.3 : Apoptoz ve nekrozun özellikleri yönüyle kıyaslaması [36].

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Sebeplere Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Hücre yaşlanması, Sitotoksik T lenfositleri, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu.	Hipertemi, Hipoksi, İskemi, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres, Litik viral enfeksiyon.
Morfolojik Özellikler	Hücre küçüktür ve membranı sağlamdır. Biebler oluşup, kromatin yoğunlaşması gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşumu gözlenir. Fosfatidil serin translokasyonu erken evrede gözlenir.	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur ve hücre şişmesi gözlenir. Büyük vakuoller oluşur. Organeller parçalanır. Hücre parçalanması gerçekleşir. Fosfatidilserin translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal Özellikleri	Programlı bir ölüm yolağıdır. ATP'ye ihtiyaç duyulur. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	İyon dengesi bozulur. ATP gerekli değildir. DNA'nın rastgele parçalandığı görülür (jel elektroforezinde smear).
Diğer Özellikler	Hücrelerin tek tek veya birkaçının birarada öldüğü görülür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilmesi mümkündür. Enflamasyon görülmez. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler.	Hücrelerin gruplar halinde öldüğü görülür. Patolojik etkiler sonucunda oluşur. Lizozomal enzimler salınımı gerçekleşir. Enflamasyona sebep olur.

3.3.4. Fotodinamik terapinin tümörler üzerindeki etkisi

FDT'nin tümör yıkımı için aracı olduğu üç ana sürecin varlığı bilinmektedir. FDT ile üretilen ROS, tümör hücreleri için doğrudan öldürme etkisine sahipken öte yandan FDT ile tümörün etkileşimli olduğu damarlarda hasara sebep olarak tümör enfarktüsüne sebep olur. Ayrıca FDT ile tümör hücrelerine karşı bağışıklık tepkisinin aktifleşmesini sağlayabilir. FDT'nin etkinliği birçok parametreye bağlı olmakla birlikte bazı engeller ile de karşılaşmaktadır. Tümör dokuları çoğunlukla hipoksiden şikayetçidirler ve oksijen tüketen FDT tümör hipoksisini daha da artırarak tümör istilası ya da tümör metastazı gibi birçok olumsuz sonuca yol açabilme ihtimalini de barındırmaktadır. FDT ile tümör hücrelerinin *in vivo* şekilde etkilenmesinin sağlanması sayesinde fotohasar sebebiyle tümör hücrelerinde azalma gözlenmiştir. Fakat birçok parametre dolayısıyla doğrudan tümör hücrelerinin yok edilmesi her zaman tam olarak mümkün olmamaktadır [21,37].

Yaşamlarını devam ettirebilmek için besine ihtiyaç duyan tümör hücreleri, bu besinleri kan damarları aracılığı ile elde etmektedirler. Bununla birlikte kan damarlarının oluşumu ve bakımı, tümör hücrelerince üretilen büyüme faktörlerine de bağımlılık göstermektedir. FDT'ye maruz bırakılan tümör hücrelerine ve damarlarına yüksek ROS üretimi ile hasar verilmektedir. FDT ile damara zarar verilmesi tümörde inflamatuvar bir yanıt başlangıcına sebep olmaktadır. Damar hasarı ve doku kanamaları tümör hücrelerinin yıkımına neden olmaktadır [21,38].

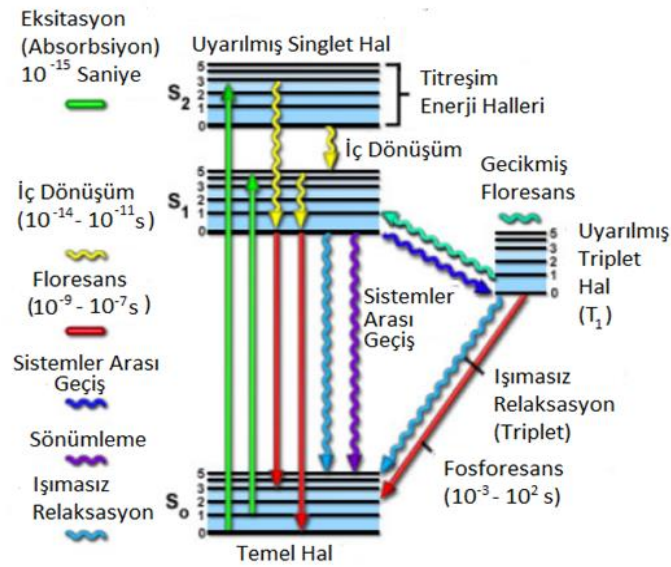
Etkili bir tümör tedavisi için tümörün yok edilmesi ya da gerilemesini sağlamanın yanı sıra sağlıklı doku hücrelerine zarar vermeden metastatik kanser hücrelerini yok edebilecek bir sistemik anti-tümör bağışıklığının başlatılmasının sağlandığı bir yöntem değerlendirilebilir. Birçok çalışma FDT'nin bağışıklık tepkisi için farklı sonuçlar oluşturacağını göstermektedir. Bazı çalışmalar bağışıklığın güçlenmesine sebep olduğunu, bazı çalışmalar ise bağışıklığın baskılanmasına yönelik etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Fakat baskılanmasına yol açan mekanizmanın belirsizliği bulunmaktadır. Ayrıca FDT'nin bağışıklık sistemi üzerine tepkileri incelendiğinde bu sürecin tedavi alanına ve FD'nin tipine göre etkisinin farklılaşacağı görülmektedir [6].

3.4. FDT'de Fotofiziksel Olaylar

Fotofiziksel olaylar olarak adlandırılan durum, ışık madde etkileşimi esnasında ortaya çıkan fiziksel durumlardır. FD'nin kendisine uygun dalga boyu ile uyarılması sonrasında S_0 temel enerji seviyesinden S_1 enerji seviyesine bir geçiş gerçekleşmektedir. Spin değiştirmeden yüksek seviyelere çıkan elektron uyarılmış singlet hal olarak adlandırılmaktadır. Uyarılmış durumda olan molekülde diamanyetik özellik değişim göstermez. Temel hale geri dönen uyarılmış bir molekülün bu davranışına iç dönüşüm (IC) denmektedir. Temel enerji seviyesine iç dönüşüm yahut floresans yayarak dönüş sağlayabilir. Floresans yayımı uyarılmış molekülün ışın yaymak için yeterli ömür kazanması ve kalan fazla enerjiyi ışın olarak yayması olayıdır.

Bu geçişlere ek olarak temel hale dönmek için triplet (T_2) seviyesine de sistemler arası geçiş (ISC) ile geçiş yapabilir. Fakat bu enerji sayesinde molekül paramanyetik özellik kazanmıştır. Uyarılmış triplet haldeki molekül T_1 durumuna, fazla enerjisini moleküller arası çarpışmalar ya da titreşim enerjisine dönüştürerek geçmektedir. Yahut fosforesans

olarak adlandırılan ışığa ile fazla enerjisini kaybederek temel duruma dönmektedir. Bir başka seçenek ise sahip olduğu enerjiyi triplet haldeki oksijen ($^3\text{O}_2$) molekülüne aktararak $^1\text{O}_2$ oluşturmasıdır (Şekil 3.5). Ancak uyarılmış triplet durumdaki molekülün sahip olduğu nispeten uzun ömrü doğrudan teklî duruma geçeceğinden ve spin koruma kuralı gereği teklî durumdan triplet hale ya da tam tersi enerji aktarımı spin yasaklı olduğundan fosforesans yoluyla açıklanmaktadır. Triplet hali, aktifleşen FD'nin oksijen gibi diğer çevre moleküller ile etkileşimine sebep olurken bunun gerçekleşmesi için Tip I ve Tip II reaksiyonları şeklinde farklı yollar izlemektedir [6,39-42].



Şekil 3.5: Jablonski diyagramı [43].

3.5. FDT'de Fotokimyasal Olaylar

Fotokimyasal tepkimeler ışık absorpsiyonundan sağlanan kimyasal olaylara denmektedir. Işık absorpsiyonu ile moleküllerin dönme, titreşim ve enerji düzeyinde yükselme oluşması ya da radikal oluşumuna sebep olan aktivasyon enerjisi tahsis edilmektedir [40]. FDT mekanizma işleyişine göre ışık ile uyarımı gerçekleştirilen FD, triplet hale geçmektedir. Triplet durumdaki FD biyomoleküllerle etkileşim gösterebilmek için FDT'de iki farklı yol olarak Tip I ve Tip II reaksiyonlarını barındırır.

Tip I mekanizması elektron transferi reaksiyonları ile ROS oluşumuna neden olmaktadır. Tip II mekanizmasında ise enerji transferi reaksiyonları ile $^1\text{O}_2$ oluşumu gerçekleşmektedir [41]. Tip I mekanizmasında elektron transfer süreçlerinde FD

bulunmaktadır ve radikaller ile radikal iyonlar üretmektedir. Oksijenlenmiş ürünlerin oluşması yüksek reaktif özellikte radikaller ile hidroksi ve hidrojen peroksit radikallerinin moleküler oksijenle reaksiyonlara girmesiyle sağlanmaktadır [44]. FDT’de genellikle kullanılan FD’ler etkilerini göstermeyi $^1\text{O}_2$ üzerinden Tip II mekanizmasını oluşturarak sağlamaktadırlar. Tip II ile uyarılmış enerji seviyelerindeki FD, enerji aktarımı ile $^1\text{O}_2$ oluşumuna neden olmaktadır. $^1\text{O}_2$ ise biyomoleküllerin oksitlenmesine sebep olarak hücrel hasar oluşturmaktadır [41]. Hem Tip I hem Tip II reaksiyonu aynı anda gerçekleşebilir. Bu mekanizmalar için FD tipi, substrat ve oksijen konsantrasyonu önemlidir [44]. Yapılan çalışmalar ile FDT’de ROS üretiminde Tip II’nin Tip I’e göre daha basit olduğu ve FDT’de kullanılan birçok FD’nin Tip I yerine Tip II mekanizmasına uygun çalıştığı düşünülmektedir [34].

3.6. FDT Bileşenleri

FDT etki mekanizması incelendiğinde üç önemli bileşenin etkisi söz konusudur. Bu bileşenler; FD, ışık ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) olarak ifade edilmektedir.

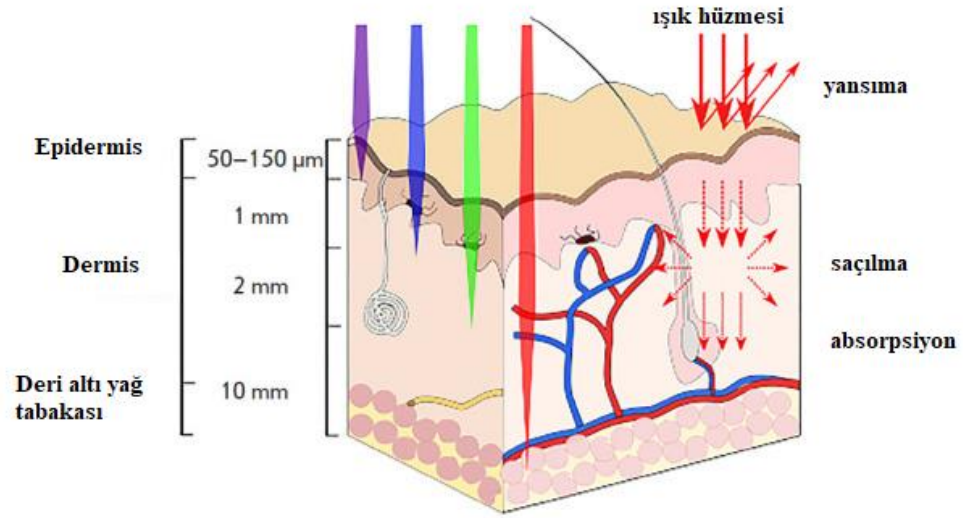
3.6.1. Singlet oksijen

FDT için tümörün barındırdığı oksijen önem arz etmektedir. Bunun nedeni oksijenin fotokimyasal süreçler için gerekliliğidir. Oksijenin FDT için ayrıcalıklı olmasının sebebi ise FDT esnasında ışık ile uyarımın gerçekleştirilmesi ardından oksijenin daha önce dokudaki tüketim hızına göre daha hızlı bir tüketim oranına sahip olmasıyla ilgilidir. Ayrıca önemli bileşen olmasının asıl sebeplerinden bir diğeri ise oksijenin, FDT’de Tip I ve Tip II mekanizmaları ile ilişkili olmasıdır. Bu önemin asıl sebebi, oksijenin hücre ölümü için ihtiyaç duyulan $^1\text{O}_2$ formuna dönüşümüdür. $^1\text{O}_2$ ’nin yapılan araştırmalar ile yüksek reaktifliğe sahip olduğu bilinmektedir. Sahip olduğu enerjiyi diğer moleküllere yüksek reaktifliği nedeniyle etkileşime girerek aktarabilir. Tüm bu araştırmalar ışığında FDT etkisinin, tümörlü dokuda gerçekleşen reaksiyonlar aracılığı ile üretilen $^1\text{O}_2$ miktarına bağlı olduğu görülmektedir [30,40-42].

3.6.2. Işık

FDT’de ışık için kullanılan kaynaklar önemli bileşenlerdir. Dokudan en az verimle mavi ışık geçişi olurken kırmızı ve kızılötesi radyasyonların daha iyi bir penetrasyona sahip oldukları görülmektedir (Şekil 3.6). FDT’de önemli bir bileşen olan 1O_2 gerekli enerjiye sahip dalga boylarındaki ışımalar aracılığı ile üretilebilmektedir. Bu nedenle dalga boyu önemlidir. Çünkü yalnız 800 nm’ye kadar olan ışık, 1O_2 üretimi yapabilmektedir. Dalga boyunun bir diğer önemi ise doku içerisine ışığın ulaşabileceği penetrasyon durumudur. Uygulamada yüksek dalga boyuna sahip ışığın yan etkilerini minimum seviyeye indirmek önemlidir. Çünkü ışığın dalga boyu ile enerjisi arasında ters orantı bulunmaktadır. 1200 nm üzerindeki dalga boyları ise su absorpsiyonu oluşturduğundan ve su absorpsiyonu da dokuda penetrasyonun azalmasına neden olduğu için en uygun aralık olarak 650-850 nm olarak belirlenmiş olup bu aralığa “Fototerapötik pencere” denilmektedir. İnsan dokularına yüksek penetrasyon derinliğine sahip olan fototerapötik pencere, görünür ve yakın kızılötesi (NIR) ışığın spektral aralığıdır. Bu aralıktaki dokular aynı zamanda en şeffaf olanlardır. FD’ler için dalga boyu önemlidir. Bu nedenle farklı FDT süreçlerinde aynı FD kullanılacaksa dahi, ışık kaynağının uygunluk durumu değerlendirilmelidir. FD absorpsiyonu, hastalık (lezyon durumu, lokasyonu, doku özellikleri vb.), maliyet vb. parametreler bu hususta incelenmeli ve en ideal FD ve ışık kaynağı tercih edilmelidir.

FDT süreçleri için farklı ışık kaynakları tercih edilmektedir. Lazerler, akkor ışık kaynakları ve LED’ler FDT sürecinde kullanılmıştır. Lazerler, FDT mekanizmasında güvenilir olmalarına rağmen maliyetleri sebebiyle yeni ışık kaynağı olarak LED’ler geliştirilmiştir. Bu gelişimin ardından FDT prosedüründe LED’ler endoskopi yoluyla ya da ameliyat sırasında hastanın tümörlü bölgesine yerleştirilerek tedavi seçenekleri geliştirilmiştir. Tüm gelişmeler ışığında başarılı bir FDT süreci için ışık kaynağı seçimi ve kullanımı tedavi parametreleri göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. [6,24,42,45].



Şekil 3.6: Dokulardaki ışık yayılımı [46].

3.6.3. Fotoduyarlaştırıcılar

FD'ler, hedeflenen bölgede oksijen varlığı ile kendilerine uygun dalga boyuna sahip ışık ile uyarılarak, aldıkları enerjiyi biyomoleküllere aktararak, ROS oluşumu gerçekleştiren ve bu sayede sitotoksik etki oluşturarak hücrel hasara neden olan kimyasal bileşiklerdir [30,33,42,47]. Yapısal olarak kimyasal farklılıklar barındırmaktadırlar. Bu farklılıklardan dolayı tetrapireol türevi fotoduyarlaştırıcılar çeşitli biyolojik davranışlar sergileyebilirler [47]. Tetrapireoller, 400 nm, Soret bandı olarak adlandırılan bölgede şiddetli soğurma bandına sahiptir [39]. Doğada en yaygın olarak bulunan tetrapireol türevi Protoporfirin IX (PpIX)'dir. FDT tedavilerinde kanser ve bazı otoimmün hastalıklarda kullanılmıştır [47]. FDT'de kullanılan FD'ler 600-800 nm arasında absorpsiyon yapacak şekilde tasarlanabilir. İdeal FD bu aralıklarda iyi bir absorpsiyon katsayısı değerine sahip olmalıdır [31]. FDT sürecinde, uygulamada kullanılan FD'lerin tümör hücrelerine dağılımı beklenmektedir. Uygulanan FD'nin hem sağlıklı dokularda değil lezyonun bulunduğu dokularda toplanması beklenirken hem de ışığın aktif olmadığı durumlarda toksik etki göstermemesi ve hücrel hasara neden olan 1O_2 'i yüksek verimlilik ile oluşturmaya yatkın olması beklenmektedir [42].

800 nm'den daha uzun dalga boyuna sahip fotonların absorpsiyonu 1O_2 oluşması için gerekli enerjiyi verememektedir. Etkin bir FDT tedavisinde ideal FD'de aranan özellikler; iyi bir ROS oluşumu sağlanması, karanlık toksisitesi bulunmaması, ilgili hedef dokularda

birikmesi ve normal dokularda bulduklarında süratle arınmaları, muhtemel yan etkilerini en az seviyeye indirmeleri, vücut dokularında kolay çözünürlüğe sahip olmaları, kolay sentezlenmeleri, düşük maliyetler ile elde edilmeleridir [30,31].

Kanser terapisi için ilk FD, suda çözünebilir bir Hematoporfirin türevidir. Bu madde, suda çözünebilir olup bazı saflaştırma işlemlerinin ardından Photofrin (HPD Porfimer Sodyum) olarak yaygın şekilde kullanılmıştır [6]. Photofrin'in ciltte uzun süreli duyarlılığa neden olduğu bildirilmekle birlikte FDT alanında kullanılan FD'ler arasında başarılı sayılmıştır. Birinci nesil FD grubundan olup yemek borusu, mide kanseri vb. kanserlerin tedavisi için Gıda ve İlaç Uygulaması Derneği (FDA) tarafından onaylanmıştır [47]. FD'lerin binlerce çeşidi olmasına rağmen klinik deneylerde çok az bir kısmı kullanılmış olup dünyada da sadece birkaç FD'nin resmi olarak onaylandığı da görülmektedir [24,47]. Onaylanan FD'lerin fotokimyasal özellikleri önem arz etmektedir. İlk kullanılan FD olan Photofrin de başarılı olmasına rağmen sahip olduğu dezavantajlar nedeniyle uzmanları daha verimli FD'ler araştırmaya yönlendirmiştir. FD'leri daha etkin, daha seçici bir yapıya dönüştürmek daha iyi bir penetrasyona uygun olmalarını sağlamak için yapılan araştırmalar ışığında ikinci nesil FD'ler keşfedilmiştir. Bu bileşikler anti kanserler için FDT'de uygulamanın faydalı olacağı düşünülerek yapılan çalışmalarda kullanılırken üçüncü nesillerde ise daha çok antikora yönelik FD gibi belirli hedefleri olan bir çalışma olarak karşımıza çıkmaktadır [6,47].

3.6.3.1. I. Nesil fotoduyarlaştırıcılar

Fotodinamik etkinin fark edilmesinin ardından 1900 yılında Schwartz, Hemotoporfirin türevini (HPD) elde ederek ilgili lezyonda toplandığını fark etmiştir. İlk nesil FD olarak çalışmalarda kullanılmış olup insanda tümörlü dokuları teşhis ve bu dokuların tedavisinde uygulanmıştır.

İlerleyen zamanlarda Photofrin adıyla anılan hemotoporfirinin, suda çözünebilir türevi olan HPD Porfimer Sodyumun FDT'de kullanımı üzerine çalışılmıştır. HPD Porfimer Sodyumun sınırlı bir deri penetrasyonu gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır [40,41,48]. Buna rağmen FDT'deki en başarılı FD'lerden biri olarak Photofrin karşımıza çıkmaktadır [47]. FD'lerde Porfirinler (HPD, 5-ALA vb.), klorofil türevleri (bakteriyolinler) ve boya maddeleri (ftolosiyoninler vb.) olarak üç geniş kimyasal ailede sınıflandırma yapılabilir.

İlk nesil FD'lere dahil olan Photofrin FDT'de daha etkin sonuçlar elde etmek için ikinci nesil FD'lerin keşfine öncü olmuştur [41]. İkinci nesil FD'ler kimyasal anlamda saftır ve ROS üretimi için yüksek verim sunarlar [48].

3.6.3.2. II. Nesil fotoduyarlaştırıcılar

İkinci nesil FD'ler yapısal ve bileşim olarak birinci nesillere göre daha açık bir yapıya sahiptir. I. nesile göre ışığa duyarlılıkları, ışık kaynaklarının daha derine erişimi ile sağlanan ışık emilimi, tümörlü hücreler için hedef dokuda birikimi önemli oranda geliştirilmiştir. İkinci nesil FD'ler benzoporfirinler, ftalosiyeninler (Pc'ler), gibi porfirin yapılarına dayanan, birinci ve üçüncü neslin sahip olduğu kısıtlamalardan kurtarılmasını hedefleyen porfirin türevlerini içermektedir (Tablo 3.4) [30,47,48]. Photofrin®, ikinci nesil kategorisinde kabul edilen ve FDT için en yaygın kullanılan FD'lerden biri olup çeşitli kanser türleri için klinik onayları mevcuttur [49]. İkinci nesil FD'ler, 650-800 nm dalga boyu aralığında sahip oldukları karakteristik özellikleri sayesinde (derin dokularda penetrasyon etkinliği, kimyasal anlamda saflık vb.) daha az yan etki göstermektedir. [30].

Tablo 3.4 : İkinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar [30].

Metalloporfirinler	Lutrin
Klorlar:	N-aspartiklor e-6(Npc6 Benzoporfirin türevi-BPD)
Porfeni:	N-propil porfeni Kloralüminyum ftalosiyenin (AlPcCl)
Ftalosiyeninler:	CASPc Çinko ftalosiyenin Silikonftalosiyenin(Pc4)
Protoporfirin:	Levulan, Metvix Tin Etiopurpurin-SnET2
Purpurinler:	Purlitin
Klorofil türevleri:	Feoharbid a

3.6.3.3. III. Nesil fotoduyarlaştırıcılar

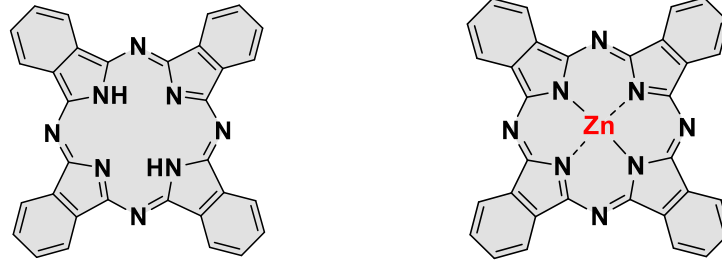
Üçüncü nesil FD'ler, kanser terapilerinde uygulanacak olan FD'nin yalnızca tümörlü dokularda birikimini sağlayarak sağlıklı dokulardaki zararı minimuma indirmeyi hedefleyen maddelerdir. Bu amaçla FD'ler üzerinde modifikasyonlar yaparak da gelişmiş

FD'ler oluşturulması amaçlanmaktadır. Yapılan son çalışmalar, FD'lerin bazı özel hücre altı yapılarda hedef bölge seçimi ile terapinin gerçekleştirilebildiğini aktarmıştır [30,42].

3.6.3.4. Ftalosiyaninler

Ftalosiyaninler (Pc), FDT'de sahip oldukları özellikler nedeniyle ilgi çekici FD'lerdir. Pc'leri daha da geliştirmek adına sahip oldukları fotokimyasal ve tümör hedefleme gibi özelliklerinin gelişimi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır [50]. En önemli boyar madde grubundan olan Pc'ler, Braun ve Tcherniac adındaki araştırmacılar sayesinde kimyasal bir sentez sonucu yan ürün olarak tesadüfen bulunmuştur (Şekil 3.7) [40]. Porfirinler ile benzer olan Pc'ler yapısal olarak ilişkili olsalar da daha büyük makrohalkalı bir moleküldür [40,51,52]. Sahip oldukları 1O_2 'i verimli üretme kabiliyetleri, yoğun absorpsiyonları sayesinde sıklıkla FDT'de kullanılmaktadır. Önemli özellikleri arasında hedeflenen bölgeyi etkileme ve karanlık aktivitede toksik etki göstermemesi dikkat çekmektedir [53]. Aktivitesini 650-800 nm dalga boyu aralığında gösterdiği yüksek emilim ve hedefli dokuda kısa zamanda birikmesi ile göstermektedir. Terapide sınırlama getiren özelliği ise hidrofobik ve su da az çözünür olmasıdır fakat bu problem güncel çalışmalar ile giderilmiştir [54].

Modifiye edilebilme özelliğine sahip Pc'ler, kullanılan fonksiyonel grupların türlerine ve konumlarına göre farklı özellikte hazırlanabilirler. Çinko içeren Pc'ler ise farklı reaksiyonlar ile sentezlenebilir. Ftalonitril ve çinko tuzu eşliğinde veya yüksek kaynama noktalı alkol kullanılarak lityum Pc elde edilmektedir ve devamında metalsiz hale getirilen Pc çinko klorür ile elde edilebilir. FD'ler arasında çinko(II)-ftalosiyanin (ZnPc) tümör hedeflerindeki başarısını çalışmalarda kanıtlanmış olup *in vivo* ve *in vitro* olarak sitotoksik etkileri belirtilmiştir [52,54]. FD'ler için iyi çözünürlük özelliğinin önemi aşikardır. Hidrofilik Pc'lerin sülfonatlı türevleri de FD olarak büyük ilgi görmüştür. Ayrıca FDT'de kullanılmak üzere çinko içeren suda çözünür Pc'lerin de en çok tercih edilen FD'lerden olduğu bildirilmiştir. Makhseed ve ark. (2013), yaptığı çalışmada çinko Pc'nin suda yüksek 1O_2 verimi ve yüksek çözünürlüğe sahip olması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca kullanılan ZnPc türevi FD ile etkin FDT cevabı ve dokulara karşı düşük karanlık toksisite gözlemlendiğini belirtmişlerdir [55,56].



Şekil 3.7: Metalsiz (sol) ve çinko (sağ) ftalosiyaninlerin moleküler yapıları.

3.7. Hücre Lokalizasyonu

Etkin FDT için kanserli hücrelerin FD'yi hücre içine alımları çok önemlidir. Kısa yarı ömre sahip ROS'un üretim bölgelerine yakın hareket etmesi ve hücrelere alınan FD'nin aydınlatılarak oluşturduğu hasar türü FD'nin hücre altı konumuna bağlıdır. Konumunun önemi anlaşılacak FDT uygulaması için en doğru FD tercihi yapılmalıdır. FD'lerin hücre altı konumu çoğunlukla konfokal floresan mikroskop kullanılarak belirlenebilir [39,57].

3.8. FDT ve Kolon Kanseri Çalışmaları

Kolon kanseri tedavisi için FDT çalışmaları geçmişten günümüze kadar devam etmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar (Tablo 3.5) ile tedaviye yönelik daha detaylı bilgiler elde edilmektedir.

Tablo 3.5 : Literatürde Yapılan Kolon Kanseri Çalışmaları.

KLİNİK DENEMELER	FOTODUYARLAŞTIRICILAR	DALGA BOYU	KAYNAKÇA
İlerlemiş Kolon Kanseri	Fotofrin	630 nm	[48]
Tekrarlayan Kolon Kanseri	Fotofrin	630 nm ,	[20]
Kolon tümörleri	Fotofrin	628 nm	[20]
Ameliyat Edilemeyen Kolon Kanseri	HpD	630 nm	[20]
Kolon Kanseri	Talaporfin	660 nm	[6]
Kolon Metastazları	Talaporfin, mono-L-aspartil klorin e6 , NPe6, LS11	660 nm	[47]

Yapılan çalışmalarda HCT116 ve SW480 hücreleri 8 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda meso-tetrahydroxyphenylchlorine (Foscan) (m-THPC) veya

verteporfinin (VP) kullanılarak 10 mW/cm^2 ışık gücü yoğunluğu ve 3 J/cm^2 ışık dozu ile aydınlatılmıştır. Hücreler daha sonra 24 saat karanlık ortamda bekletilerek ve gerekli prosedürler uygulanarak yapılan testler akabinde sonuçların $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiği belirtilmiştir [26].

Başka bir çalışma ise HT-29 hücre hattı için incelenen dört molekül arasında ZnPc türevleri (0,73 1b – 0,70 2b) ile en güçlü fotodinamik aktivitenin bulunduğunu bildirmiştir [58].

Bir diğer çalışma fareler üzerinde Pc türevi FD kullanılarak SW480 kolon kanseri hücrelerinin etkinliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Kullanılan FD enjeksiyonu sonrasında hücrelerin 48 saat inkübasyonu ardından 150 mW/cm^2 de diyot lazer ile 150 J/cm^2 ve 672 nm ışıkta aydınlatıldığı belirtilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda tedavi edilen tümörlü hücrelerde önemli gerilemelerin gözlemlendiği bildirilmiştir [59].

MC-38 kolon kanseri hücre hattı için yapılan çalışmada hücre kültürü prosedürleri uygulanarak FDT, ZnPc ile yapılmıştır. ZnPc'nin intravenöz veya intratümöral enjeksiyonu sonrasında tümörde birikimi gözlenmiş ve belirli süre sonunda (16 gün) güçlü bir tümör inhibisyonu tespit edilmiştir [60].

BÖLÜM 4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

4.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışma için gerekli olup kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

- – 80 °C derin dondurucu (Arktiko, Danimarka)
- (+4) – (–20) Buzdolabı (Altus, Türkiye)
- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II A2 (Miprolab)
- CO₂ İnkübatör (Nüve, Türkiye)
- Inverted Mikroskop (Motic)
- Mikroplaka Okuyucu (Spektrostar Nano, BMG Labtech)
- Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Eppendorf Centrifuge 5702 R)
- Optik Güç Ölçer (PM100 Thorlabs, Almanya)
- Fotodinamik terapi LED Sistemi (Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sakarya)
- Su banyosu (Stuart, Birleşik Krallık)

4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada gerekli olup kullanılan kimyasal malzemeler aşağıda listelenmiştir.

- Dimetil Sülfoksit (DMSO)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/l) ile L – Glutamine Capricorn, DMEM-HA
- Tripsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Dulbeccos's Fosfat Tamponlu Salin (1X) w/o Ca&Mg w/o Fenol Kırmızısı Capricorn, PBS-1A
- Penicilin/ Streptomycin Çözeltisi (100x) Capricorn, PS-B
- Fetal Bovine Serum (FBS) Sigma
- Trypsin- EDTA Çözeltisi Sigma
- CCK-8 Hücre Sayım Kiti (Cell Counting Kit-8)
- Tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

4.3. Hücre Kültürü

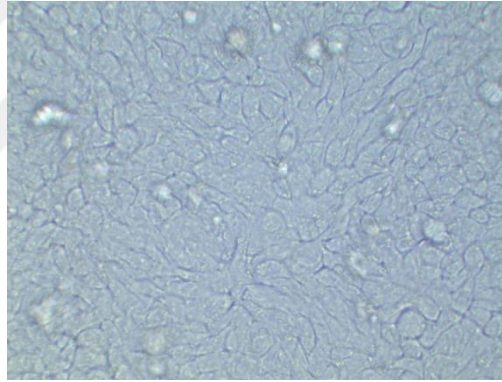
4.3.1. Hücre hatlarının temin edilmesi ve özellikleri

Bu çalışma için HT-29 (ATTC® HTB-38™) kolon kanseri hücre hattı ve WI-38 (ATCC® CCL-75™) normal akciğer fibroblastik hücre hattı ATCC'den temin edildi. HT-29 kolon kanseri hücre hattı, 1964 yılında 44 yaşındaki Kafkas bir kadın bireyden türetilen hücre hattıdır. WI-38 normal akciğer fibroblastik hücre hattı ise 3 aylık gebeliği durdurulmuş bir dişi fetüsün akciğer dokusundan türetilmesiyle elde edilmiş bir insan fibroblast hücre hattıdır.

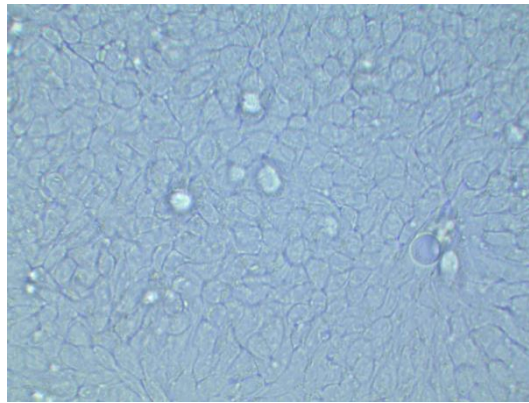
4.3.2 Hücre kültürü besiyeri hazırlığı ve inkübasyon şartları

Kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve normal akciğer fibroblastik hücre hattı WI-38 için Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose ile L-Glutamine (DMEM-HA L-Glutamine) besiyeri kullanıldı ve %1 Penisilin/Streptomisin ve %10 FBS eklendi. Ardından HT-29 ve WI-38 hücreleri hazırlanan uygun besiyerleri içerisinde, 37°C'de %5 karbondioksit (CO₂) barındıran inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin çözünmesi ve bununla birlikte canlılık kontrollerinin yapılabilmesi adına hücre stokları, – 80°C'den çıkarılarak 37°C su banyosunda çözüldü. Su banyosunda çözdürülen hücre stokları içerisine, hazırlanan uygun besiyeri eklenerek 25 cm² filtreli flasklara ekilme işlemi yapıldı. Hücrelerin çoğalması her gün invert mikroskop ile kontrol edildi ve besiyerleri yenilendi (Şekil 4.1).



a) HT-29 invert mikroskop görüntüsü.



b) WI-38 invert mikroskop görüntüsü.

Şekil 4.1 : a) İvert mikroskop görüntüleri a) HT-29 ve b) WI-38.

4.3.3. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler flasklarda % 80 - 90 doluluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için hücre besiyerleri ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra 1X PBS ile hücreler 1 kez yıkandı. Ardından Tripsin/EDTA çözeltisi (% 0.25) eklenerek hücreler flasklardan kaldırıldı. Serolojik pipet yardımıyla süspansiyon halindeki hücre solüsyonu 15 ml hacimli falkon tüp içerisine alındı. Tüp içerisine alınan solüsyon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ardından, hücre pelleti üzerine 1 ml taze besi yeri eklenerek hücreler homojenize edildi. Hücreler sayılarak 75 cm²'lik flasklara uygun sayılarda bölünerek pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

4.3.4. Hücrelerin sayımı, dondurulması ve saklanması

Süspansiyon halindeki hücreler, hücre sayımı için endorf tüp içerisine 10 µl alınıp 10 µl tripan mavisi aktarımı ile pipetlendi. Boyanan hücreler Thoma lamının sayım bölgesinde invert mikroskop altında incelenerek sayıldı. Tripan mavisinin yalnızca ölü hücrelerin içine girebilmesi özelliği ile canlı hücreler ile ölü hücrelerin ayrımı yapılarak sayımı gerçekleştirildi. Ardından gerekli dondurulma işlemi için hücre pelleti 900 µl besiyeri kullanılarak süspanse edildi ve endorf tüplere aktarımı sağlandı. Daha sonra 100 µl DMSO'nun üzerine eklenmesiyle hücreler önce – 20°C de 1 saat kadar bekletilip ardından – 80°C de muhafaza edilmek üzere stoklandı.

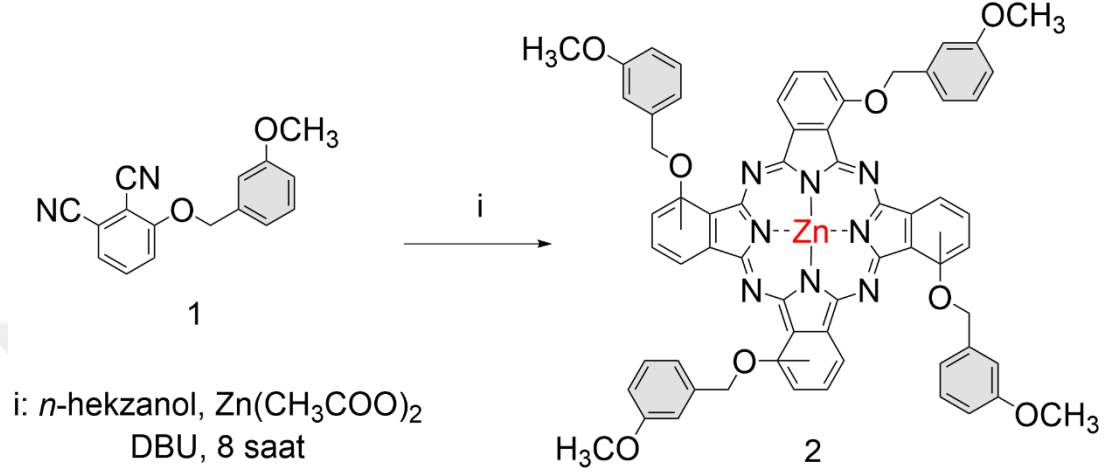
4.4. Fotodinamik Terapi Prosedürü

4.4.1. FDT için optimizasyon çalışmaları

Bu tez çalışması esnasında çinko ftlosiyenin (ZnPc) türevi fotoduyarlaştırıcı (FD) dozu ve ışık dozu için literatür tarama çalışmaları yapıldı. Uygun ışık ve ZnPc türevi FD dozları CCK-8 (Cell Counting Kit-8) sitotoksitesite deneyi ile belirlendi. Bununla birlikte HT-29 ve WI-38 hücre hatları için bu deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

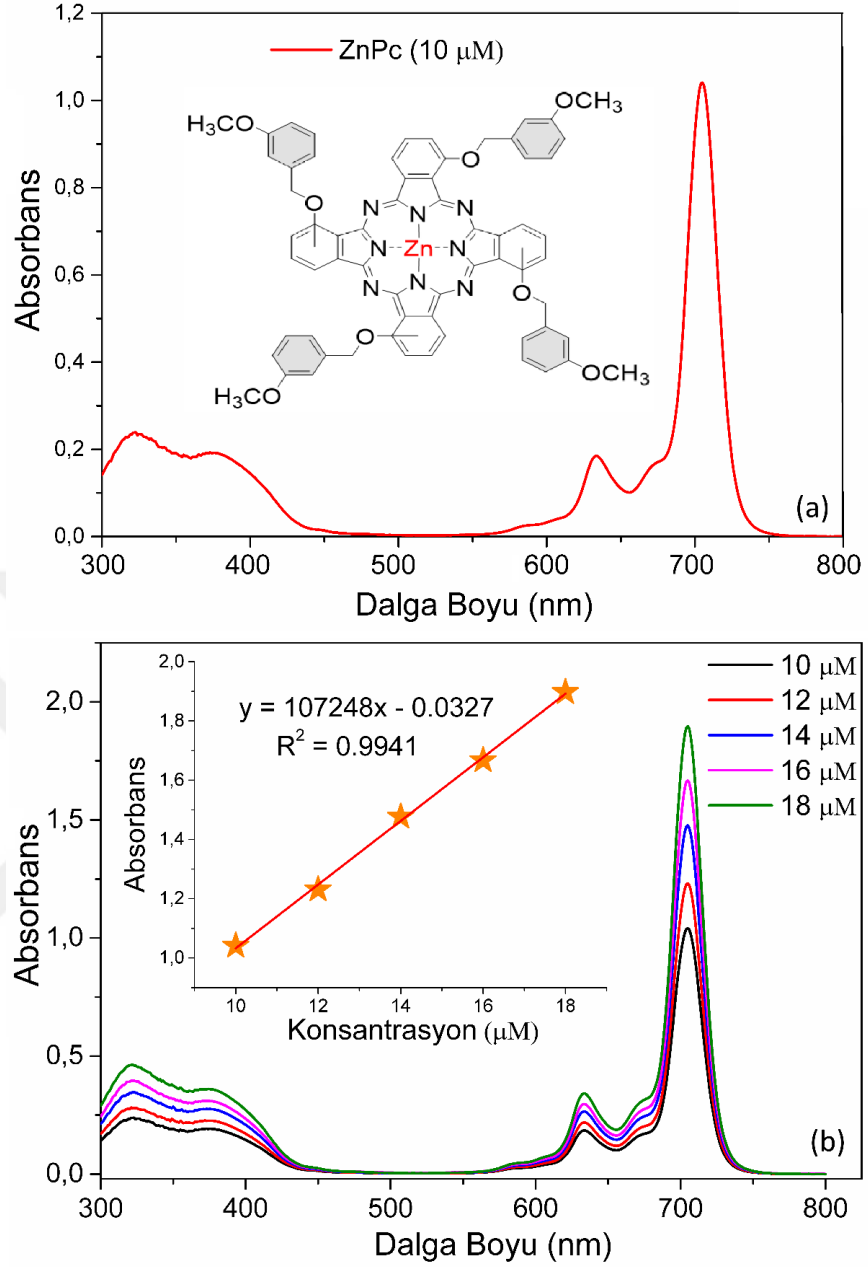
4.4.2 Çinko ftalosiyanın yapısı ve çinko ftalosiyanın absorpsiyon özellikleri

Bu çalışma kapsamında hazırlanan ZnPc moleküler yapısı ve sentez şartları Şekil 4.2.'de görülmektedir.



Şekil 4.2 : Çalışma kapsamında hazırlanan çinko ftalosiyanınin moleküler yapısı ve sentez şartları.

ZnPc'ler çeşitli başlangıç bileşiklerinden sentezlenebildiği gibi metallsiz Pc kullanılarak çinko tozu ile birlikte uygun çözücüler ile de sentezlenebilmektedirler. UV-Vis absorpsiyon spektrofotometresi sentez sonrasında Pc yapısının oluştuğunu pratik olarak anlaşılmasını sağlamaktadır. Pc'ler 18- π konjuge elektron sistemine sahip yapılarından dolayı UV-Vis bölgede şiddetli karakteristik absorpsiyon pikleri göstermektedirler. Pc'lerin absorpsiyon spektrumları incelendiğinde, π - π^* geçişlerine karşılık gelen 600-750 nm aralığında gözlenen Q bandı ve 350 nm B (Soret) bandı en belirgin karakteristik absorpsiyon pikleri olarak bilinmektedir [58,61]. ZnPc türevleri, diamanyetik metal iyonu ile FDT için tercih edilen duyarlaştırıcılar olup, *in vitro* ve *in vivo* FDT çalışmaları için avantajlıdır [55,62,63]. Tez çalışması kapsamında hazırlanan çözünürlüğün artırılması amacıyla (3-metoksifenil)metanol gruplarının süstitüe edildiği ZnPc UV-Vis spektrofotometrik özelliklerine ait grafikler Şekil 4.3.'de gösterilmektedir.

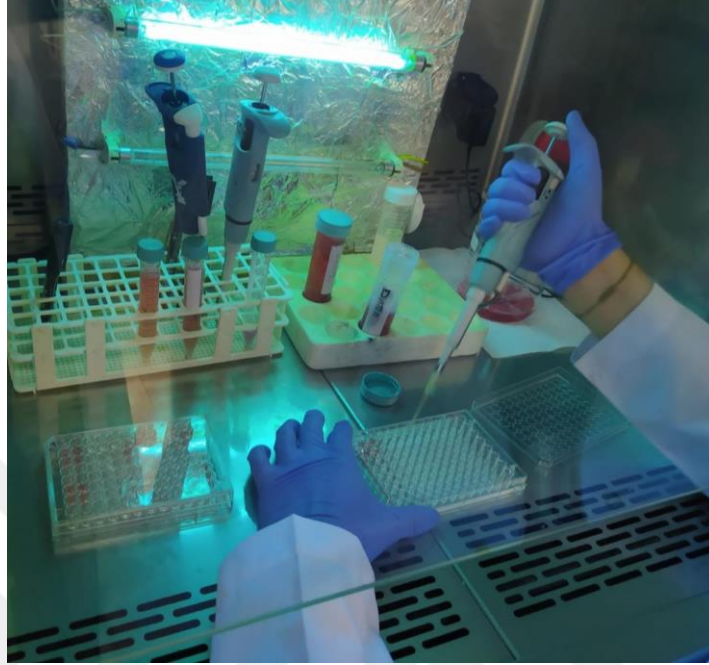


Şekil 4.3 : Çalışma kapsamında hazırlanan çinko ftalosiyanın UV-Vis spektrofotometrik özellikleri (a) Çinko ftalosiyanine ait DMSO çözücüsü içindeki UV-Vis absorpsiyon spektrumu UV-Vis (DMSO): λ_{maks} (nm) (log ϵ)= Q: 705 nm (5.03), Q': 633 nm (4.29), B: 321 nm (4.44) – (Konsantrasyon: 10 μM) (b) Çinko ftalosiyanine ait UV-Vis seyrelme çalışması.

4.4.3. Çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcı uygulanması

ZnPc türevi FD için uygun konsantrasyon ve sürenin belirlenmesi için öncelikle hücreler, DMEM besiyeri ile 96 kuyulu hücre kültürü plakasına (2×10^4 hücre/kuyu) ekildi. Hücreler (1, 3, 5, 8, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 125 ve 150 μM) ZnPc türevi FD uygulaması

(Şekil 4.4) yapılarak 24, 48 ve 72 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Çalışma için gerekli olan kontrol grubuna ZnPc türevi FD uygulaması yapılmadı.



Şekil 4.4 : Hücre kültürü uygulaması yapılması.

Hücre canlılığını belirlemek için CCK-8 (Cell Counting Kit-8) hücre canlılık testi kullanıldı. Bu amaçla CCK-8 protokolüne uygun olarak hücre canlılık analizi yapıldı. Mikroplaka okuyucuda (SPECTROstar Nano) 450 nm dalga boyunda absorbanlar tespit edildi. WI-38 ve HT-29 hücre hatlarına 24 saat sonra ZnPc türevi FD uygulaması sonrası elde edilen canlılık değerleri, GraphPad Prism 9.0 yazılımı (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak hesaplandı.

4.4.4. FDT için LED sistemi

Çalışmada kullanılan LED düzeneği, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (BIYOTAM)'a ait bir sistemdir. Bu sistem hataları engelleyerek istenen optik gücü üretme yeteneğine sahip denetleyici bir düzenekten oluşmaktadır. LED ışık kaynağı sistemi optik güç üretmek için 0-100 mW arasında yüksek optik çıkış kararlılığı ile tasarlanmıştır. LED bağlantı sıcaklığının termoelektrik soğutma sistemi (TEC) ile dengede kalması sağlanmıştır.

Tüm deneylerde dalga boyu ± 10 nm ile 705 nm dalga boyuna sahip LED ışık kaynağı sistemi kullanıldı. Deney öncesi çıkış gücü güç-ölçer (PM100 Thorlabs Almanya) ile ölçüldü. Farklı güç yoğunlukları elde etmek için akıcılık hızı 30 mW/cm^2 'de kullanıldı.

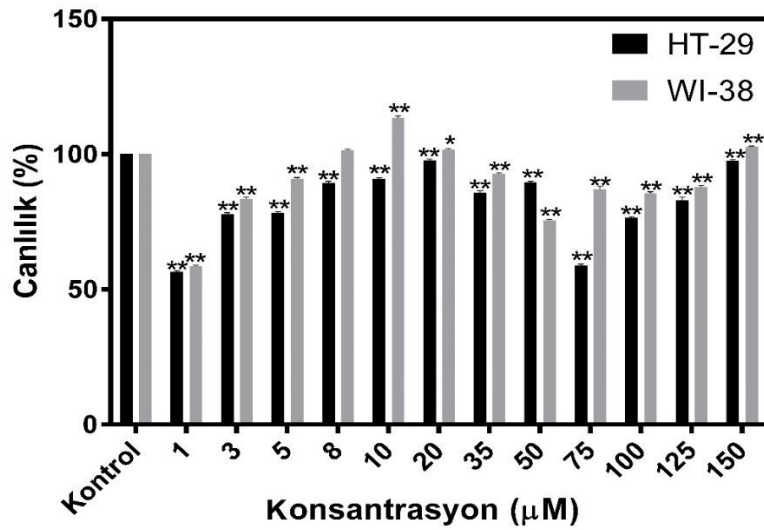
4.4.4.1. LED uygulaması

Hücreler 96 kuyulu plakaya ekildikten sonra 37° C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Hücre yapışmasının gerçekleşmesinin ardından karanlık evre deneyleri ile belirlenen etkin dozda olan ZnPc türevi FD'nin hücrelere uygulaması gerçekleştirildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreci sonrasında çinko ftalosiyanın türevi FD'nin maximum absorbans değeri olan 705 nm dalga boyuna sahip kırmızı ışıkta ısıtma için 1 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , 8 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 12 J/cm^2 güç yoğunlukları belirlendi. Belirlenen güç yoğunlukları hücrelere uygulandı. Kontrol hücreleri, ısıtma olmadan aynı ortamda inkübe edilmiştir.

BÖLÜM 5. BULGULAR

5.1. Çinko Ftalosiyanin Türevi Fotoduyarlaştırıcının Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Çalışma için hücelere (1, 3, 5, 8, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 125 ve 150 μM) çinko ftalosiyanin (ZnPc) türevi fotoduyarlaştırıcı (FD) madde uygulaması yapılarak (Şekil 5.1) uygun dozun tespiti için kullanılan CCK-8 (Cell Counting Kit-8) protokolü ile birlikte hücre canlılık analiz çalışmaları tamamlandı. Bu doğrultuda hücre canlılık verilerinin, GraphPad Prism 9.0 yazılımı (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak hesaplanması ile birlikte elde edilen verilerin (Tablo 5.1, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$) değerlendirilmesi ile 24 saatlik inkübasyon sonrası WI-38 hücrelerinde toksik etki göstermeyen (% $101,69 \pm 11,49$) ve HT-29 hücreleri için % $89,75 \pm 7,9$ canlılık oranı ile 8 μM ZnPc türevi FD'nin fotodinamik terapi (FDT) uygulaması için en etkin doz olduğu belirlendi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).



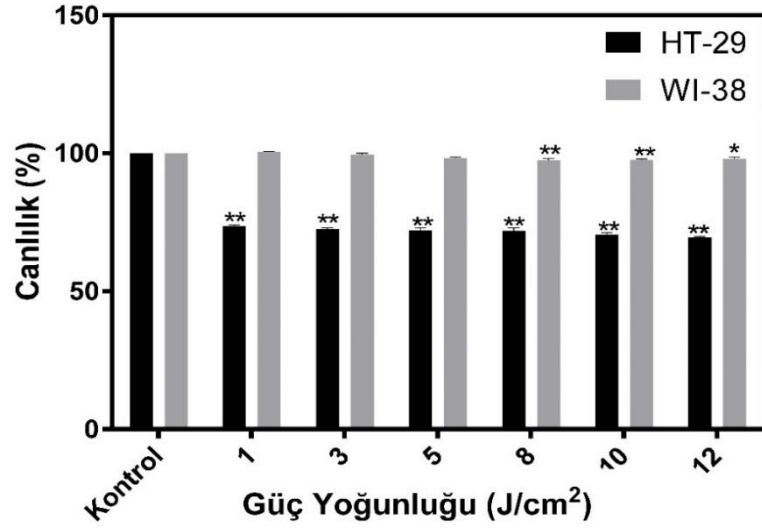
Şekil 5.1 : WI-38 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan çinko ftalosiyanin türevi fotoduyarlaştırıcının 24 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılık değerleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

Tablo 5.1 : WI-38 ve HT-29 Hücrelerinde çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi (*p<0.05, **p<0.001).

Konsantrasyon	HT-29	WI-38
Kontrol	% 100	% 100
1 µM	% 56,88±24,97**	% 58,14±32,06**
3 µM	% 77,53±4,32**	% 83,93±6,27**
5 µM	% 78,61±3,24**	% 90,61±0,41**
8 µM	% 89,75±7,9**	% 101,69±11,49
10 µM	% 90,71±8,86**	% 113,22±23,02**
20 µM	% 97,3±15,45**	% 102,03±11,83*
35 µM	% 86,27±4,42**	% 92,61±2,41**
50 µM	% 89,27±7,42**	% 75,4±14,8**
75 µM	% 58,59±23,26**	% 87,8±2,4**
100 µM	% 76,33±5,52**	% 85,87±4,33**
125 µM	% 83,76±1,91**	% 88,31±28,31**
150 µM	% 97,3±15,45**	% 102,89±12,69**

5.2. WI-38 ve HT-29 Hücrelerinde Çinko Ftalosiyanın Türevi Fotoduyarlaştırıcı /FDT'nin Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

WI-38 ve HT-29 hücrelerinde ZnPc türevi FD/FDT'nin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm², 8 J/cm², 10 J/cm², 12 J/cm² güç yoğunluklarında ışıltma yapılan, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilen hücreler ile ZnPc türevi FD ve ışıltma olmadan aynı ortamda inkübe edilen kontrol grubu hücrelerine inkübasyondan sonra CCK-8 protokolü uygulandı ve mikro plaka okuyucuda 450 nm'de canlılık analizi sonucu tespit edildi (Şekil 5.2, *p<0.05, **p<0.001). ZnPc türevi FD ile uygulama yapılmayan kontrol grubu canlılığı %100 olarak kabul edilmiş olup uygulaması yapılan hücrelerin canlılık oranları hesaplaması kontrol grubuna göre % olarak yapıldı.



Şekil 5.2 : WI-38 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcının LED uygulama çalışması (*p<0.05, **p<0.001).

ZnPc türevi FD (8 µM) uygulanan WI-38 ve HT-29 hücrelerinde 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm² güç yoğunluklu LED ışıltma sonrası hücreler üzerinde ZnPc türevi FD'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen CCK-8 canlılık analizi sonuçları Tablo 5.2'de verilmiştir (*p<0.05, **p<0.001).

Tablo 5.2 : WI-38 ve HT-29 8 µM çinko ftalosiyanın türevi fotoduyarlaştırıcı/ FDT sitotoksosite sonuçları (*p<0.05, **p<0.001).

Güç Yoğunluğu	HT-29	WI-38
Kontrol	% 100	% 100
8 µM 3M-Zn	% 89,75±7,9**	% 101,69±11,49
1 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	% 73,95±2,19**	100,63±1,88
3 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	72,91±1,15**	99,89±0,14
5 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	72,76±1**	98,62±0,13
8 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	71,19±0,57**	98±0,07**
10 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	70,07±1,69**	97,89±0,75**
12 J/cm ² +8 µM 3M-Zn	69,7±2,06**	97,5±1,25*

ZnPc türevi FD (8 μ M) uygulanan HT-29 hücrelerinde 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm² güç yoğunluklu LED ışıltma sonrası 24 saatte canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ve WI-38 hücrelerinde toksik etki göstermediği belirlendi (*p<0.05, **p<0.001).



BÖLÜM 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon kanseri, dünyanın önde gelen ölümcül hastalıklarından biri olup tüm kanser türlerinde % 9'dan daha fazla bir pay oranına sahiptir. Kolon kanseri, rektal kanserden daha çok görülmekte olup sanayileşme gelişimi göstermiş ülkelerde bu oranın daha fazla olabileceği görülmüştür. Avustralya ve Yeni Zelanda en yüksek vakaların olduğu ülkeler arasında görülürken, Çin ve Hindistan'ın en düşük insidansa sahip ülkeler arasında yer aldığı görülmektedir [4,64].

Kolon kanseri birbirini takip eden gen kaybını barındıran birden fazla adımlı süreçlerin oluşumu ile gelişmektedir. Kalıtsal sendromlar ile ilişkili olduğundan hastalıktan şüphe duyulan kişilerin aile öyküsü sorgulanmalı ve risk değerlendirmeleri yapılmalıdır. Ailesel öykü beraberinde, semptomlar ve tarama yöntemleri ile de hastalık teşhisi yapılabilmektedir. Ancak kolon kanseri, özellikle erken evrelerde genellikle çok az belirti gösterdiğinden ya da hiç belirti göstermediğinden kolon kanseri için tarama yöntemlerinin yapılması önem arz etmektedir [4,65-67].

Kolon kanseri beslenme dışında, genetik ve kazanılmış risk faktörleri ile ortaya çıkabilmektedir. Örneğin, egzersiz eksikliği, sigara ve obezite gibi yaşam tarzı faktörleri yahut pelvik ışınlama, kolesistektomi ve üreterokolik anastomoz gibi bazı cerrahi müdahalelerin yan etkileri olarak veya diyabet, akromegali ve enflamatuvar bağırsak hastalığı gibi risk faktörleri ile oluşabilmektedir [68]. Ayrıca birinci derece akrabalarında meme, yumurtalık, prostat vb. kanseri bulunuyorsa da kişilerin kolon kanserine yakalanma riski daha da yükselmektedir [69].

Kolon kanseri tedavisi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu farklı tedaviler bilimsel ve alternatif birçok yöntemi barındırmaktadır. Tedavi seçenekleri arasında bulunan cerrahi, immünoterapi, kemoterapi, kemoradyoterapi ve hedefe yönelik tedaviler, ameliyat öncesi ve sonrası olumlu sonuçlar doğurmaktadır. Fakat bu yöntemlerin kolon

kanserinin tedavisinde kullanılmasına rağmen tedavi sonrası zararlı etkiler oluşturduğu anlaşılmıştır. Ayrıca tümör hücrelerinin, uygulanan kemoterapötik ve biyolojik ilaçlara gösterdiği artan direnç unsuru ile sağlıklı dokular üzerinde hasar oluşturması da başka tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Halihazırda bulunan yöntemlerin tedavilere yetersiz ve zararlı yanıt verme gibi etkilerinden dolayı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Bu tedavi yöntemlerinin uygulanabilirliği de kanser evrelerine, tümör büyüklüğüne ve ilerleyişine bağlıdır. Ayrıca nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ışığında, teşhis ve tedavi alanında geleceğe yönelik ilerlemeler sağlanması hedeflenerek çalışmalar devam etmektedir [70-72]. Bu ihtiyacı karşılamaya yönelik bir yöntem ise ışık, oksijen, fotoduyarlaştırıcı (FD) arasındaki etkileşim ile tümör dokusunu yok etme prensibini içeren fotodinamik terapi (FDT)'dir. Bu yaklaşım, geleneksel tedavi yöntemlerine nazaran umut verici bir yaklaşımdır. FDT tümörün hızla yok edilmesine olanak sağlayan ve metastaza karşı dayanıklı bir koruma gerçekleştiren bir yaklaşımdır [4,73,74].

FDT protokolü incelendiğinde, özellikle serbest radikallerin yoğun bir şekilde incelenmesi gerektiği görülmektedir. FDT ile oluşan radikal türler kanser ve bazı cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [75]. Geleneksel tedavilere nazaran pek çok avantajı bulunan FDT, kemoterapiye göre daha iyi bir tümör seçiciliğine, geniş toplam ışık ve ilaç dozu aralığına ve aynı tümöre birden fazla kez FDT uygulaması yapılması gibi avantajlara sahiptir [74]. FDT'de üç ajanın kombine etkisinden faydalanılır. Işık, oksijen ve FD. FD'ler ışığa maruz kaldıklarında yapılarındaki elektronlar düşük enerjiden yüksek enerji haline geçiş yaparlar. Bazıları ise uyarılmış triplet hale geçiş yapabilirler. Uyarılmış triplet durumun diğerlerine göre daha kararlı bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir ve oksijenle etkileşime, enerjinin oksijene aktarılmasına ve ROS üretimine izin verir. ROS üretimi ile apoptoz, nekroz, otofaji ile bağlantılı hücre ölüm yolları oluşarak hücre ölümü gerçekleşir. FDT esnasında kullanılacak FD, ışık kaynağı, ışık ve FD dozu dikkatle belirlenmelidir [76]. Çinko ftalosiyanın (ZnPc) türevi FD'ler FDT tedavisinde üstün özellikleriyle dikkat çekmektedirler. ZnPc FD'lerin tümörlü hücreler ve dokulara alımı da elektrik yükü özellikleri, kimyasal yapıları vb. özellikleriyle ilişkilidir. Uygun dalga boylarında ışımaya maruz bırakılan FD'ler, enerji seviyelerinde geçişler yaşarlar ($S_0 \rightarrow S_1$). Ardından ışığa duyarlılık durumlarını doğrudan belirleyen sistemler arası geçiş (ISC) yoluyla triplet duruma (T_1) geçiş yapılır. Ftalosiyaninlerde (Pc)

çinko, alüminyum, silisyum gibi diamanetik özellikteki metallerin ISC artışını teşvik ettiği ve bu sayede fotodinamik sürece olumlu etki ettiği araştırmalarda görülmektedir [77].

Literatür incelendiğinde, Zamani ve arkadaşları (2018) ZnPc'nin meme kanseri ZR-75-1 hücre hattı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Hücrelere 0,01 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda FD uygulaması gerçekleştirdikten sonra 24 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonrasında 675 nm dalga boyunda lazer kullanarak 70 mW'da 60 saniye boyunca hücreleri ışığa maruz bırakmışlardır. Çalışmadan elde edilen deneysel sonuçlarda, ZR-75-1 hücre hattının canlılık ve proliferasyonunun inhibisyonuyla sonuçlandığı bildirilmiştir. 5 µg/ml'de FD ile tedavi edilen hücrelerde en yüksek sitotoksitenin gözlemlendiği bildirilmiştir. Bununla birlikte ZnPc uygulamasında hücre canlılığı oranının doza bağlı bir şekilde azaldığı belirtilmiştir. 0.01 µg/ml ZnPc'nin altındaki konsantrasyonlarda ise ZnPc türevi FD'lerin toksisite ve fototoksisite değerlendirmelerinde, hücrelerin % canlılık oranında hiçbir fark saptanmamıştır [78].

Zeinali ve ark. (2021), tetra tert-bütül süstitüe çinko ftalosiyanın (ZnPc) konsantrasyonlarının ışıkla uyarılmasıyla MeWo (insan melanom hücreleri) ve HaCaT (normal insan keratinosit hücreleri) üzerindeki FDT etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla gerçekleştirdikleri çalışma ile MTT canlılık testi verilerinden elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda, 12,5 µM ZnPc konsantrasyonunun melanom kanser hücreleri için sitotoksik olduğunu ancak bu ZnPc konsantrasyonunun HaCaT hücre hattı için sitotoksik olmadığı görülmüştür. MeWo hücre hattı için 12,5 µM FD dozunun, hücrelerdeki canlılık oranını %50'ye kadar düşürdüğü belirlenmiştir. Hücrelere uygulanan FD sonrası 24 saat inkübasyonu sağlanmış ve sonrasında FDT çalışması için 12 mW/cm² çıkış akısı ile 0, 20, 30, 40, 50 J/cm² güç yoğunluklarına ulaşmak için hücreleri 28, 41, 55, 69 dakika boyunca sürekli kırmızı ışığa maruz bırakarak optimum doz-yanıt çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, doz olarak 12,5 µM ZnPc konsantrasyonunun etkin olduğunu ve FDT için etkin güç yoğunluğunun 50 J/cm² olduğunu belirlemişlerdir [79].

Velazquez ve ark. (2019), glioblastoma hücrelerini inaktive etmek için süstitüe edilmemiş ZnPc ve tetraminoftalosiyanın (TAZnPc) FD'lerinin etkinliğini araştırmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla Pc türevi FD'leri, 0. 125, 0. 25 ve 0. 5 µM olmak üzere üç

farklı konsantrasyonda glioblastoma hücrelerine uygulamışlardır. Hücre canlılık analizi sonrasında etkin konsantrasyon değeri 0.5 μM olarak tespit edilmiştir. Ardından fototoksisite deneyleri için, 27 J/cm^2 ışık dozuyla birlikte 0,5 μM ZnPc veya TAZnPc kullanılarak hücre sağkalımında \sim %90'lık bir azalma elde edilirken, daha düşük bir ışık dozu kullanıldığında (10 J/cm^2) ZnPc-FDT hücre canlılığını \sim %80 oranında azaltabilmiştir, TAZnPc ise daha düşük bir ışık dozu (10 J/cm^2) kullanarak glioblastoma hücrelerini fotoinaktive etmede daha az etkili olmuş ve hücre canlılığında \sim %46'lık bir azalma göstermiştir. Bu sonuçlar, foto inaktivasyon kapasitesinde Pc konsantrasyonu ile verilen ışık dozu arasında açık bir ilişki olduğunu göstermiştir [80].

Gholizadeh ve ark. (2021), ZnPc-FDT kombinasyonunun kolon kanseri hastalarının prognozunu iyileştirmedeki ve kolon kanseri gelişimini durdurmadaki potansiyel rolüne dikkat çekmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla farklı konsantrasyon ve ışık dozları ile SW480 hücreleri üzerinde deneyler yapmışlardır. Çalışmalarda ZnPc-FDT kombinasyonunun sitotoksik etkisini belirlemek için farklı ZnPc türevi konsantrasyonları (0,00017-8,651 μM) ve ışık dozları (12 J/cm^2 ve 24 J/cm^2) kullanıldığı belirtilmiştir. ZnPc/FDT birlikteliği ile SW480 hücrelerinin, hücre canlılığının kayda değer bir ölçüde azaldığı görülmüştür ($p < 0.0001$). Uygulanan ışık dozları kıyaslamasında da 24 J/cm^2 'nin 12 J/cm^2 'ye nazaran ZnPc kombinasyonunda daha fark edilir bir sitotoksik etkiye yol açtığı bildirilmiştir [81].

Bu tez çalışmasında, ZnPc türevi FD ile FDT kombinasyonu sağlayarak HT-29 ve WI-38 hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve fototoksik etkinliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücre kültürü deneyleri ile hücrelere farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 5, 8, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 125 ve 150 μM) ZnPc türevi FD uygulaması yapıldı. Her iki hücre hattı için inkübasyon süreleri sonucunda yapılan sitotoksik deneyler doğrultusunda, 24 saat inkübasyon ve 8 μM konsantrasyon değeri etkin bulunmuştur. Etkin bulunan konsantrasyon değeri ardından gerçekleştirilen FDT çalışmaları için 96'lık mikro plakaya ekilen hücrelere ZnPc türevi FD'nin etkin konsantrasyonu (8 μM) uygulaması gerçekleştirildikten sonra 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 1, 3, 5, 8, 10, 12 J/cm^2 güç yoğunluklu ve deneylerimizde kullanılan çinko ftalosiyenin türevi FD'nin maximum absorbans değeri olan 705 nm dalga boyundaki kırmızı ışıkla uyarıldı. Bu uyarılma sonrası inkübasyon ardından yapılan hücre canlılık analizleri ile WI-38 hücre hattında toksik etki oluşturmayıp, HT-29 hücre hattında

ise artan güç yoğunluğuna bağlı olarak sırasıyla %89,75±7,9**, %73,95±2,19**, %72,91±1,15**, %72,76±1**, %71,19±0,57**, %70,07±1,69**, %69,7±2,06** hücre canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (*p<0.05, **p<0.001).

Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılık analizlerinde, literatürde ilk defa uygulanan (3-metoksifenil)metanol gruplarının süstitüe edildiği çinko ftalosiyanın türevi FD'nin sağlıklı WI-38 hücre hattında toksik etki oluşturmayıp, HT-29 hücre hattında ise ilgili güç yoğunluklarında hücre ölümü meydana getirmesi kullanılan FD'nin ideal bir ışığa duyarlı ajan olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile kolon kanserinin fotodinamik tedavisinde farklı kombinasyonlar, konsantrasyonlar, farklı ışık kaynakları ve dozları kullanılarak yeni bilimsel çalışmalara destek sağlanabilir. Bununla birlikte tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların daha sonra yapılacak *in vivo* çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Roy, P. S. & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441-442, doi. 10.4103/0019-509X.200658.
- [2] Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why Cancer and Inflammation? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3-4), 123-130.
- [3] Burt, R. W. (2000). Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 119(3), 837-853. doi. 10.1053/gast.2000.16508
- [4] Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., ... Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106-133, doi. 10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- [5] Patel, A. & Hande, V. (2022). Rising colorectal cancer in young adults: A warning for all! Let us adopt a healthy lifestyle and colorectal cancer screening. *Indian Journal of Cancer*, 59(3), 307-309, doi. 10.4103/ijc.ijc_948_22.
- [6] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281, doi. 10.3322/caac.20114.
- [7] Kübler, A. C. (2005). Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20(1), 37-45, doi. 10.1016/j.mla.2005.02.001.
- [8] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., ... Peng, Q. (1998). Photodynamic Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889-905, doi. 10.1093/jnci/90.12.889.
- [9] Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197, doi. 10.3390/ijms18010197.
- [10] Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, 13(9), 2025, doi. 10.3390/cancers13092025.
- [11] Kuipers E. J., Grady W. M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J. J., Boelens P. G., van de Velde C. J., Watanabe T. (2015). Colorectal cancer, *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15065, doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- [12] Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A. & Cagir, B. (2022). *Colon Cancer*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

- [13] Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2001). A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(10), 2992-3003, doi. 10.1016/S0002-9270(01)03239-7.
- [14] Url-1<www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>, erişim tarihi: 21.05.2023.
- [15] Pop, O. L., Vodnar, D. C., Diaconeasa, Z., Istrati, M., Bințișan, A., Bințișan, V. V., ... Gabbianelli, R. (2020). An Overview of Gut Microbiota and Colon Diseases with a Focus on Adenomatous Colon Polyps. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7359, doi. 10.3390/ijms21197359.
- [16] Cheng, H.-C., Chang, T.-K., Su, W.-C., Tsai, H.-L., & Wang, J.-Y. (2021). Narrative review of the influence of diabetes mellitus and hyperglycemia on colorectal cancer risk and oncological outcomes. *Translational Oncology*, 14(7), 101089, doi. 10.1016/j.tranon.2021.101089.
- [17] Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(4), 925-943, doi. 10.1016/s0889-8553(02)00057-2.
- [18] Özer, B. O. (2021). *Kolon Kanseri Tedavisi için Yeni Nanoterapötik Modalitelerin Geliştirilmesi* (Doktora Tezi), Trakya Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Trakya.
- [19] Karabulut, S., Karabulut, M., & Taştekin, D. (2021). Metastatik Kolon Kanseri Tedavisindeki Yenilikler. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 84(3), 425-9, doi. 10.26650/IUITFD.2020.0086.
- [20] Guidolin, K., Ding, L., Yan, H., Englesakis HBA, M., Chadi, S., Queresby, F., & Zheng, G. (2022). Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Research. *Surgical Innovation*, 29(6), 788-803, doi. 10.1177/15533506221083545.
- [21] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380-387. doi. 10.1038/nrc1071
- [22] Rai, P., Mallidi, S., Zheng, X., Rahmanzadeh, R., Mir, Y., Elrington, S., Khurshid, A. & Hasan, T. (2010). Development and Applications of Photo-triggered Theranostic Agents. *Advanced drug delivery reviews*, 62(11), 1094-1124, doi. 10.1016/j.addr.2010.09.002.
- [23] Nguyen, V-N., Yan, Y., Zhao, J., Yoon, J. (2021). Heavy-Atom-Free Photosensitizers: From Molecular Design to Applications in the Photodynamic Therapy of Cancer, *Accounts of Chemical Research*. 54(1), 207-220, doi. 10.1021/acs.accounts.0c00606.
- [24] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, *Clinical Endoscopy*, 46(1), 24-29. doi. 10.5946/ce.2013.46.1.24.
- [25] Gallardo-Villagrán, M., Leger, D. Y., Liagre, B., & Therrien, B. (2019). Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3339, doi. 10.3390/ijms20133339.
- [26] Song, C., Xu, W., Wu, H., Wang, X., Gong, Q., Liu, C., ... Zhou, L. (2020). Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human

- colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway, *Cell Death & Disease*, 11(10), 1-14, doi. 10.1038/s41419-020-03136-y.
- [27] Yu, Y., Wu, S., Zhang, L., Xu, S., Dai, C., Gan, S., ... Tang, B. Z. (2022). Cationization to boost both type I and type II ROS generation for photodynamic therapy, *Biomaterials*, 280, 121255, doi. 10.1016/j.biomaterials.2021.121255.
- [28] Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A. A. Jr., Werner, J. & Bazhin, A. V. (2018). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5119-5132, doi. 10.1002/jcp.26356.
- [29] Bozkulak, Ö. (2009). Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi, *Bilim ve Teknik Tübitak Yayınları*, 42(634), 62-65.
- [30] Sönmezoğlu, B. (2020). *ALA-5 Aracılı Fotodinamik Terapinin Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Lazer ve LED Işık Kaynaklı Sistemler Aracılığıyla İn Vitro Olarak İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- [31] Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *The Biochemical journal*, 473(4), 347-364, doi. 10.1042/BJ20150942.
- [32] Tettamanti, G., Casartelli, M. (2019). Cell death during complete metamorphosis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 374(1783), 20190065. doi. 10.1098/rstb.2019.0065.
- [33] Panzarini, E., Inguscio, V., & Dini, L. (2011). Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy, *International Journal of Photoenergy*, 2011, 713726, doi. 10.1155/2011/713726.
- [34] Mfouo-Tynga, I., & Abrahamse, H. (2015). Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10228-10241, doi. 10.3390/ijms160510228.
- [35] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, 3(2), 2516-2539, doi. 10.3390/cancers3022516.
- [36] Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Dergipark*, 20, 145-158, dergipark.org.tr/tr/download/article-file/25371.
- [37] Dang, J., He, H. Chen, D., Yin, L. (2017). Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). *Biomaterials Science*, 5(8), 1500-1511, doi. 10.1039/C7BM00392G.
- [38] Hwang, H. S., Shin, H., Han, J., & Na, K. (2018). Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48(2), 143-151, doi. 10.1007/s40005-017-0377-x.
- [39] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293, doi. 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- [40] Yaşa, G. (2012). *Fotodinamik Terapi Amaçlı Çözünür Yeni Ftalosiyanın Sentezi* (Yüksek Lisans Tezi), Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- [41] Göl, C. (2016). *Fotodinamik Terapi Amaçlı Direkt Konjuge Ftalosiyanın-Bodipy Fotosensitizerlerin Sentezi ve Özelliklerinin İncelenmesi* (Doktora Tezi), Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [42] Özten, Ö. (2021). *Hepatosellüler Karsinomda Fotodinamik Tedavinin Potansiyel Terapötik Etkisinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi), Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Sakarya.
- [43] Güzel, E. (2016). *Yeni asimetric ftalosiyanın/porfirazin hibrit kompleksleri* (Doktora Tezi), Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Sakarya.
- [44] Jiang, W., Liang, M., Lei, Q., Li, G., & Wu, S. (2023). The Current Status of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment, *Cancers*, 15(3), 585. doi. 10.3390/cancers15030585
- [45] Dabrowski, J. Pucelik, B. Regiel-Futyr, A. Brindell, M. Mazuryk, O. Kyzioł, A. Stochel, G. Macyk, W. Arnaut, L. (2016). Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews*, 325, 67–101. doi. 10.1016/j.ccr.2016.06.007.
- [46] Shramova, E. I., Kotlyar, A. B., Lebedenko, E. N., Deyev, S. M., & Proshkina, G. M. (2020). Near-Infrared Activated Cyanine Dyes As Agents for Photothermal Therapy and Diagnosis of Tumors. *Acta Naturae*, 12(3), 102-113. doi. 10.32607/actanaturae.11028
- [47] dos Santos AF, de Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat*, 5, 25, doi. 10.20517/2394-4722.2018.83.
- [48] Kou, J., Dou, D., & Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, 8(46), 81591-81603, doi. 10.18632/oncotarget.20189.
- [49] Berlanda, J., Kiesslich, T., Engelhardt, V., Krammer, B., & Plaetzer, K. (2010). Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(3), 173-180, doi. 10.1016/j.jphotobiol.2010.06.004.
- [50] Lo, P.-C., Rodríguez-Morgade, M., Pandey, R., Ng, D., Torres, T., & Dumoulin, F. (2020). The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Chemical Society Reviews*, 49, 1041-1056, doi. 10.1039/C9CS00129H.
- [51] Miller, J. D., Baron, E. D., Scull, H., Hsia, A., Berlin, J. C., McCormick, T., ... Oleinick, N. L. (2007). Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 290-299, doi. 10.1016/j.taap.2007.01.025.
- [52] Erşahin, F. (2017) *2,2'-Metilenbisfenoksi Köprülü Bazı Metalli ve Metalsiz Polimerik Ftalosiyanınların Sentezi Ve Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi* (Doktora Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

- [53] Yurt, F. Ince, M. Colak, S. G. Ocakoglu, K. Er, O. Soylu, H. M. ... Kurt, C. C. (2017). Investigation of in vitro PDT activities of zinc phthalocyanine immobilised TiO₂ nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 524(1), 467-474, doi. /10.1016/j.ijpharm.2017.03.050.
- [54] Jia, X., & Jia, L. (2012). Nanoparticles Improve Biological Functions of Phthalocyanine Photosensitizers Used for Photodynamic Therapy. *Current Drug Metabolism*, 13(8), 1119-1122, doi.10.2174/138920012802850074.
- [55] Makhseed, S., Machacek, M., Alfadly, W., Tuhl, A., Vinodh, M., Simunek, T., ... Zimcik, P. (2013). Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical Communications*, 49(95), 11149-11151, doi. 10.1039/C3CC44609C.
- [56] Güzel, E., Atsay, A., Nalbantoglu, S., Şaki, N., Dogan, A. L., Gül, A., & Koçak, M. B. (2013). Synthesis, characterization and photodynamic activity of a new amphiphilic zinc phthalocyanine. *Dyes and Pigments*, 97(1), 238-243, doi. 10.1016/j.dyepig.2012.12.027.
- [57] Jiang, Z., Shao, J., Yang, T., Wang, J., Jia, L. (2014). Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. (2014). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 98-104. doi. 10.1016/j.jpba.2013.05.014.
- [58] Akkoç, B., Samsunlu, T., Işık, Ş., Özçeşmeci, M., Atmaca, G. Y., Erdoğan, A., ... Hamuryudan, E. (2022). Pegylated metal-free and zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical properties and in vitro photodynamic activities against head, neck and colon cancer cell lines. *Dalton Transactions*, 51(26), 10136-10147, doi. 10.1039/D2DT00704E.
- [59] Whitacre, M.C. , Feyes, K.D., Satoh, T., Grossmann, J., ; Mulvihill, W. J., Muhtar, H., Oleinick. L. N.(2000). Photodynamic Therapy with the Phthalocyanine Photosensitizer Pc 4 of SW480 Human Colon Cancer Xenografts in Athymic Mice1. *Clin Cancer Res*, 6 (5), 2021–2027.
- [60] Lara, P., Huis in 't Veld, R. V., Jorquera-Cordero, C., Chan, A. B., Ossendorp, F., & Cruz, L. J. (2021). Zinc-Phthalocyanine-Loaded Extracellular Vesicles Increase Efficacy and Selectivity of Photodynamic Therapy in Co-Culture and Preclinical Models of Colon Cancer. *Pharmaceutics*, 13(10), 1547. doi. 10.3390/pharmaceutics13101547.
- [61] Yalçın, İ. (2017). Periferisinde İzopropil Grupları Taşıyan Yeni Ftalosiyeninlerin Sentezi, Karakterizasyonu, Fotofiziksel ve Fotokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [62] Cui, L.-Y., Yang, J., Fu, Q., Zhao, B.-Z., Tian, L., & Yu, H.-L. (2007). Synthesis, crystal structure and characterization of a new zinc phthalocyanine complex. *Journal of Molecular Structure*, 827(1), 149-154. doi. 10.1016/j.molstruc.2006.05.030.
- [63] Ogbodu, R. O., Nitzsche, B., Ma, A., Atilla, D., Gürek, A. G., & Höpfner, M. (2020). Photodynamic therapy of hepatocellular carcinoma using tetra-triethyleneoxysulfonyl zinc phthalocyanine as photosensitizer. *Journal of*

Photochemistry and Photobiology B: Biology, 208, 111915. doi. 10.1016/j.jphotobiol.2020.111915.

- [64] Moini, J., Ahangari, R., Miller, C., & Samsam, M. (2020). Obesity and cancer. *Global Health Complications of Obesity*, 109-145, Elsevier, doi. 10.1016/B978-0-12-819751-6.00006-2.
- [65] Benson, A. B., Arnoletti, J. P., Bekaii-Saab, T., Chan, E., Chen, Y.-J., Choti, M. A., ... Willett, C. (2011). Colon Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(11), 1238-1290, doi. 10.6004/jnccn.2011.0104.
- [66] Czito, B. G., Hsu, D., Palta, M., & Willett, C. G. (2016). Colon Cancer. L. L. Gunderson & J. E. Tepper (Ed.), *Clinical Radiation Oncology*, 977-991., Philadelphia: Elsevier, doi. 10.1016/B978-0-323-24098-7.00050-2.
- [67] Berlau, J., Gleib, M., & Pool-Zobel, B. L. (2004). Colon cancer risk factors from nutrition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 737-74, doi. 10.1007/s00216-003-2284-4.
- [68] Yuhara, H., Steinmaus, C., Cohen, S. E., Corley, D. A., Tei, Y., & Buffler, P. A. (2011). Is Diabetes Mellitus an Independent Risk Factor for Colon Cancer and Rectal Cancer?, *The American journal of gastroenterology*, 106(11), 1911-1922, doi. 10.1038/ajg.2011.301.
- [69] Slattery, M. L., & Kerber, R. A. (1994). Family History of Cancer and Colon Cancer Risk: The Utah Population Database. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86(21), 1618-1626, doi. 10.1093/jnci/86.21.1618.
- [70] Mishra, J., Drummond, J., Quazi, S. H., Karanki, S. S., Shaw, J. J., Chen, B., & Kumar, N. (2013). Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), 232-250, doi. 10.1016/j.critrevonc.2012.09.014.
- [71] Matsuda, T., Yamashita, K., Hasegawa, H., Oshikiri, T., Hosono, M., Higashino, N., ... Kakeji, Y. (2018). Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2(2), 129-136, <https://doi.org/10.1002/ags3.12061>.
- [72] Aldahhan, R., Almohazey, D., & Khan, F. A. (2022). Emerging trends in the application of gold nanoformulations in colon cancer diagnosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 1056-1065, doi. 10.1016/j.semcancer.2021.11.008.
- [73] Simelane, N. W. N., Ann Kruger, C., & Abrahamse, H. (2020). Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of colorectal cancer in vitro and in vivo. *RSC Advances*, 10(68), 41560-41576, doi. 10.1039/D0RA08617G.
- [74] Kawczyk-Krupka, A., Bugaj, A. M., Latos, W., Zaremba, K., Wawrzyniec, K., Kucharzewski, M., & Sieroń, A. (2016). Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment—The state of the art in preclinical research. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13, 158-174. doi. 10.1016/j.pdpdt.2015.07.175
- [75] Oniszczuk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczuk, T., & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and

clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 912-929, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>.

- [76] Yanovsky, R. L., Bartenstein, D. W., Rogers, G. S., Isakoff, S. J., & Chen, S. T. (2019). Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 35(5), 295-303. <https://doi.org/10.1111/phpp.12489>.
- [77] Chen, D., Song, M., Huang, J., Chen, N., Xue, J., Huang, M. (2020). Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment, *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 13, 3, <https://www.worldscientific.com/doi/full/10.1142/S1793545820300098>.
- [78] Zamani, A. R. N., Mashayekhi, M. R., Jadid, M. F. S., Faridvand, Y., Tajalli, H., Rahbarghazi, R. (2018). Photo-modulation of zinc phthalocyanine-treated breast cancer cell line ZR-75-1 inhibited the normal tumor activity in vitro. *Lasers in Medical Science*, 33, 1969-1978).
- [79] Zeinali, S., Tuncel, A., Yüzer, A., Yurt, F. (2021). Imaging and detection of cell apoptosis by In vitro photodynamic therapy applications of zinc (II) phthalocyanine on human melanoma cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 36, 102518. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102518
- [80] Velazquez, F.N., Miretti, M., Baumgartner, M.T. et al. Effectiveness of ZnPc and of an amine derivative to inactivate Glioblastoma cells by Photodynamic Therapy: an in vitro comparative study. *Scientific Reports*, 9, 3010, doi. 10.1038/s41598-019-39390-0.
- [81] Gholizadeh, M., Doustvandi, M. A., Mohammadnejad, F., Shadbad, M. A., Tajalli, H., Brunetti, O., ... Baradaran, B. (2021). Photodynamic Therapy with Zinc Phthalocyanine Inhibits the Stemness and Development of Colorectal Cancer: Time to Overcome the Challenging Barriers? *Molecules*, 26(22), 6877, doi. 10.3390/molecules26226877.