



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**İNDOSİYANİN YEŞİLİ TABANLI FOTODİNAMİK TERAPİNİN
MIAPaCa-2 PANKREAS TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşenur KİRİŞ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Fırat KAÇAR**

Haziran, 2018

İSTANBUL

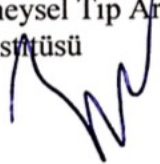
Bu çalışma,12.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafındanBiyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

,Biyomedikal Mühendisliği Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

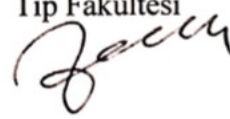
Tez Jürisi


Prof. Dr.Fırat KAÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr.Bedia ÇAKMAKOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma
Enstitüsü



Doç. Dr.Zühal GÜCİN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr.Osman Nuri UÇAN
Altınbaş Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi



Doç. Dr.Yaşar ÖZÇELEP
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi





20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 213E011 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Danışmanım Prof. Dr. Fırat KAÇAR'a çalışmaya katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşım ve ablam Tuğba AYDOĞAN ile Saadet AKBULUT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her zaman destekçimiz olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Haşim Özgür TABAKOĞLU'na, bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve gerçekleştirilmesindeki çok değerli katkılarından dolayı en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmasının gerçekleştirilmesi ve yürütülmesinde her zaman bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve laboratuvar imkânları ile destek olan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Elif Sinem İPLİK'e, bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zühal GÜCİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan biricik anneciğim ve babacığım Zeynep ve Mehmet KİRİŞ başta olmak üzere sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2018

Ayşenur KİRİŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. PANKREAS VE PANKREAS KANSERİ.....	3
2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	4
2.1.3. Pankreas Kanseri Tanı ve Evrelemesi.....	5
2.1.4. Pankreas Kanserinin Tedavisi.....	7
2.1.4.1. Cerrahi Yöntemler	8
2.1.4.2. Radyoterapi	9
2.1.4.3. Kemoterapi.....	9
2.1.4.4. Lokal Tedaviler.....	10
2.2. FOTODİNAMİK TERAPİ	10
2.2.1. Fotodinamik Terapinin Tanımı ve Fotodinamik Terapide Meydana Gelen Kimyasal Olaylar	11
2.2.2. Fotodinamik Terapide Fotoduyarlı Maddeler.....	13
2.2.2.1. İndosiyanın Yeşili.....	17
2.2.2.2. Fotoduyarlı Maddelerin Hücre İçi Birikimi.....	18
2.2.3. Işık Kaynakları ve Dalga Boyu.....	19
2.2.4. Singlet Oksijen.....	21
2.2.5. Fotodinamik Terapide Aksiyon Mekanizmaları	21
2.2.5.1. Doğrudan Hücre Ölümü	22
2.2.5.2. Vasküler Etki	27
2.2.5.3. İmmünolojik Etki.....	29

2.2.6. Klinikte Pankreas Kanseri Tedavisinde Fotodinamik Terapi.....	29
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. HÜCRE HATLARI VE KÜLTÜR KOŞULLARI.....	31
3.2. IŞIK KAYNAĞI.....	32
3.3. FOTODUYARLI MADDE.....	33
3.3.1. ICG'nin Optimal Konsantrasyonun Hesaplanması.....	33
3.4. FOTODİNAMİK TERAPİ UYGULAMA PROTOKÜLÜ.....	34
3.4.1. Optimizasyon Çalışması.....	34
3.4.2. Ana Çalışma.....	37
3.5. ANALİZ METOTLARI.....	38
3.5.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi.....	38
3.5.2. Kaspaz-3/BCA Protein Aktivitesi Ölçümü.....	39
3.5.3. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi.....	40
3.6. İSTATİKSEL ANALİZ.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ICG'NİN DOZ BAĞIMLI ETKİSİ.....	42
4.2. OPTİMİZASYON DENEY ÇALIŞMASININ SONUÇLARI VE ANALİZİ.....	44
4.2.1. MIA PaCa-2 Hücreleri Üzerindeki Optimizasyon Deney Çalışması Sonuçları.....	44
4.2.2. MRC-5 Hücreleri Üzerindeki Optimizasyon Deney Çalışması Sonuçları.....	49
4.3. ANA DENEY ÇALIŞMASININ SONUÇLARI VE ANALİZİ.....	55
4.3.1. MIA PaCa-2 Hücreleri Üzerindeki Ana Deney Çalışması Sonuçları.....	55
4.3.1.1. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Kaspaz-3/BCA Protein Analizi.....	55
4.3.1.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Annexin-V Analizi.....	55
4.3.1. MRC-5 Hücreleri Üzerindeki Ana Deney Çalışması Sonuçları.....	56
4.3.1.1. MRC-5 Hücrelerinin Kaspaz-3/BCA Analizi.....	56
4.3.1.2. MRC-5 Hücrelerinin Annexin-V Analizi.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Pankreasın anatomik yapısı.....	3
Şekil 2.2: FDT'nin 1900-1999 yılları arasındaki tarihçesi.....	11
Şekil 2.3: Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizması.....	12
Şekil 2.4: Fotodinamik terapide meydana gelen hücrel fotooksidasyon mekanizması	13
Şekil 2.5: İndosiyanın yeşilinin moleküler yapısı.....	17
Şekil 2.6: ICG'nin absorpsiyon ve floresans spektrumu.....	17
Şekil 2.7: Optik pencere ve ışığın doku içerisinde soğurulması.....	20
Şekil 2.8: Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizmaları.....	22
Şekil 3.1: 785 nm diyot lazerin görüntüsü.....	33
Şekil 3.2: Optimizasyon deneyi 96 kuyucuklu plaka dizaynı.....	34
Şekil 3.3: 24 kuyucuklu plaka ana deney dizaynı.....	38
Şekil 4.1: MIA PaCa-2 hücreleri üzerinde ICG konsantrasyonlarının hücre canlılık yüzdeleri.....	42
Şekil 4.2: MRC-5 hücreleri üzerinde ICG konsantrasyonlarının hücre canlılık yüzdeleri	43
Şekil 4.3: Uygulama 1'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	44
Şekil 4.4: Uygulama 2'ye ait yüzde canlılık sonuçları.....	45
Şekil 4.5: Uygulama 3'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	45
Şekil 4.6: Uygulama 4'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	46
Şekil 4.7: Uygulama 5'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	47
Şekil 4.8: Uygulama 6'ya ait yüzde canlılık sonuçları.....	47
Şekil 4.9: Uygulama 7'ye ait yüzde canlılık sonuçları.....	48
Şekil 4.10: Uygulama 8'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	49
Şekil 4.11: Uygulama 9'a ait yüzde canlılık sonuçları.....	50

Şekil 4.12: Uygulama 10'a ait yüzde canlılık sonuçları.....	50
Şekil 4.13: Uygulama 11'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	51
Şekil 4.14: Uygulama 12'ye ait yüzde canlılık sonuçları.....	52
Şekil 4.15: Uygulama 13'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	52
Şekil 4.16: Uygulama 14'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	53
Şekil 4.17: Uygulama 15'e ait yüzde canlılık sonuçları.....	54
Şekil 4.18: Uygulama 16'ya ait yüzde canlılık sonuçları.....	54
Şekil 4.19: Mia PaCa-2 hücrelerinin Kaspaz-3/BCA protein aktivitesinin analiz sonuçları	55
Şekil 4.20: MIA PaCa-2 hücrelerinin Annexin-V analizi sonuçları	56
Şekil 4.21: MRC-5 hücrelerinin Kaspaz-3/BCA protein aktivitesinin analiz sonuçları	57
Şekil 4.22: MRC-5 hücrelerinin Annexin-V analizi sonuçları.	58

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Pankreas kanserinin evrelemesi.....	6
Tablo 2.2: Pankreas kanserinin anatomik evrelemesi.....	7
Tablo 2.3: Onkolojik FDT’ de onaylı foto maddeler.....	15
Tablo 2.4: Doğrudan hücre ölüm şekillerinin ayırt edici karakteristik özellikleri.....	26
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücre tipleri.....	32
Tablo 3.2: MIA PaCa-2 hücre hattı optimizasyon deneyi uygulamaları.....	36
Tablo 3.3: MRC-5 hücre hattı optimizasyon deneyi uygulamaları.....	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
®	: Marka Tescil Sembolü
μ	: Mikro
°C	: Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABS	: Absorbans
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü 1
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin Trifosfat
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre Kare
CO₂	: Karbondioksit
CW	: Sürekli Mod
DMEM	: Dulbecco's Modifed Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EUS	: Endoskopik Ultrasonografi
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDM	: Fotoduyarlı Madde
FDT	: Fotodinamik Terapi
HpD	: Hematoporfirin Türevleri
g	: Gram
ICG	: İndosiyanın Yeşili
j	: Joule
LED	: Işık Yayan Diyot
mg	: Miligram

mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
m-THPC	: Meta-tetra Hidroksifenil Klorin
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Tamponlu Su
PI	: Proridyum İyodür
p-NA	: p-Nitroanilin
prm	: Dakikada Dönüş
RIP	: Rseptör Etkileşimli Proteinler
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
W	: Watt
WST-1	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)- 2H-tetrazolyum
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNDOSİYANİN YEŞİLİ TABANLI FOTODİNAMİK TERAPİNİN MIAPaCa-2 PANKREAS TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşenur KİRİŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Fırat KAÇAR

Fotodinamik terapi, moleküler oksijen varlığında toksik olmayan bir fotoduyarlı madde ve o maddenin absorbe ettiği dalga boyundaki bir ışık kaynağı ile uyarılmasıyla meydana fotokimyasal reaksiyonlara dayanan, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından klinik onaylı bir kanser tedavi metodudur. Fotokimyasal reaksiyonlar sonucu direk hücrel, vasküler ve/veya immünolojik bir cevap oluşturularak tümör yıkımı sağlanır.

Fotodinamik terapi düşük toksititede, tekrarlanabilir, düşük maliyetli ve fotoduyarlı maddelerin malign kanser hücrelerinde seçici olarak birikmeleri ile minimal çevre doku harabiyetine sebep olan bir tedavi yöntemidir.

Bu tez çalışmasında 785 nanometrede ışımaya yapan bir lazer ile indosiyanın yeşili molekülleri uyarılarak MIA PaCa-2 insan pankreatik kanser hücrelerinde fotodinamik terapinin hücrel sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Kontrol olarak MRC-5 normal akciğer hücre hattı kullanılmıştır. İndosiyanın yeşili molekülünün 6 farklı konsantrasyonda doz bağımlı sitotoksik etkisi WST-1 hücre proliferasyon testi ile analiz edilmiştir. Canlılık üzerine toksik etki göstermeyen 100 µg/mL ICG'nin 24 saat inkübasyonu ile uygulanacak lazerin enerji yoğunluğu ve fotodinamik terapi sonrası bekleme süreleri WST-1 testi ile analiz edilerek optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucu 100 j/cm² ışımaya miktarı ve tedavi sonrası bekleme süresi olarak 48 saat seçilmiştir. İndosiyanın yeşili tabanlı fotodinamik terapi uygulamalarının MIA

PaCa-2 ve kontrol hattında olan MRC-5 hücrelerinde neden olduğu ölüm tipi kaspaz-3/BCA protein aktivite analizi ve Annexin-V analizi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak, ICG-FDT'nin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pankreas tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücrelerde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir.

Haziran 2018, 101 sayfa.

Anahtar kelimeler: ICG, Fotodinamik Terapi, Pankreas Kanseri, MIAPaCa-2, apoptoz-
nekroz



SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF INDOCYANINE GREEN MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY EFFECTS ON MIAPaCa-2 PANCREATIC TUMOR CELLS

Ayşenur KİRİŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biomedical Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Fırat KAÇAR

Photodynamic therapy is a clinically approved method of solid cancer treatment by the US Food and Drug Administration, based on photochemical reactions by stimulation with a non-toxic photosensitive substance in the presence of molecular oxygen and with a wavelength-dependent light source. Photochemical reactions results in 3 way which are direct cellular, vascular and/or immunological responses leading to tumor destruction.

Photodynamic therapy is a treatment option that causes low toxicity, reproducible, low cost and as a result of selectivity accumulates in malignant cancer cells with minimal environmental tissue damage.

In this thesis study, the cellular cytotoxic and apoptotic effects of photodynamic therapy in MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells were investigated by stimulating the indocyanine green molecules with a laser source radiating at 785 nanometers. MRC-5 normal lung cell line was used as a control. Dose-dependent cytotoxic effect of indocyanine green molecule at 6 different concentrations were analyzed by WST-1 cell proliferation assay.

The applied laser energy intensity with a 24-hour incubation of 100 µg/mL ICG, which does not show any toxicity on viability, and the post-photodynamic therapy waiting times were optimized by analyzing with WST-1 test. The irradiation dose of 100 j/cm² and the waiting

time after treatment was 48 hours were chosen as a result of optimization study. Investigation of the indocyanine green-based photodynamic therapy applications effects in MIA PaCa-2 and the MRC-5 cells were performed by the assay type caspase-3/BCA protein activity assay and Annexin-V analysis.

As a conclusion, it has been shown that ICG based photodynamic therapy inhibits the proliferation of pancreatic tumor cells statistically and induces apoptosis in the cells.

June 2018, 101 pages.

Keywords: ICG, Photodynamic Therapy, Pancreatic Cancer, MIAPaCa-2, apoptosis-necrosis



1. GİRİŞ

2014 yılında Türkiye’de gerçekleşen 375 bin 291 ölümden %20,7’sinin kanserden olduğu tespit edilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2016). Pankreas kanseri, hastalık gelişene kadar görünmeyen ve semptomları arasında kilo kaybı, sırt içine yayılabilen karın rahatsızlıkları ve bazen diyabet gelişimi olan tehlikeli kanser türüdür. Genellikle safra kanalının yakınında gelişen tümörler sarılığa (ciltte ve gözlerde sararma) neden olarak erken tanıyı kolaylaştırır (Kinsella ve diğ., 2008). Pankreas kanserlerinin %94’ü pankreasın ekzokrin dokusunda gerçekleşir (Eeson ve diğ., 2012). Endokrin tümörler yaklaşık %6’lık bir orana sahiptir ve tanısı kısmen kolaydır. Bütün pankreas kanseri türlerinde 5 yıllık göreceli sağkalım oranı %8’dir (He ve diğ., 2013; Turrini ve diğ., 2013).

Cerrahi işlemler, radyasyon tedavisi ve kemoterapi sağ kalım oranını uzatabilen ve/veya semptomları hafifletebilen tedavi yöntemleridir (Sant ve diğ., 2009; Gong ve diğ., 2011). Pankreas kanserinde hastaların %20’sinden daha azı cerrahi yöntemlerle müdahale edilebilir durumdayken, hastalık teşhis edilir (Cronin-Fenton ve diğ., 2011). Tümörlü dokunun cerrahi yöntemler ile kaldırılması ilk seçenek olmasına karşın tümör çapı, metastaz yapması, tümörün konumu gibi sebepler ile hastaların çoğunluğunda bu yöntem uygulanamamaktadır. Cerrahi müdahalelerde altın standart olarak lezyonun gözle görülen sınırından 3-5 cm daha fazlasının rezeksiyonudur. Fakat hastalığın tekrarını önlemek için yapılan bu rezeksiyon doku ve/veya organda işlev kaybına neden olabilmektedir. Cerrahi olarak müdahale edilebilen hastalarda, nüks oranını düşürmek için, ışın tedavisi, kemoterapi ve hedeflenmiş kemoterapi adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır (Von Hoff ve diğ., 2013; Conroy ve diğ., 2011).

Fakat her üç yöntemde de nüks oranı yüksektir. Bunun yanı sıra birçok yan etkiler görülmekte ve hastanın yaşam kalitesi düşmektedir. Radyoterapide görülen yaygın yan etkiler; çevre dokuda ve organda sağlıklı doku ve organ harabiyeti, ciltte değişiklikler (kızarıklık, deride incelme), mide bulantısı, kusma, diyare, yorgunluk, kilo kaybı ve kemoterapide görülen yan etkilerin kötüleşmesidir. Hastalığın cerrahi müdahale boyutlarına indirgenmesi veya tekrar etmesini önlemek amacıyla uygulanan radyoterapide radyasyon tolerans dozu nedeniyle tedavinin tekrarlanması mümkün olmamaktadır (Kuroda ve diğ., 2013).

Kemoterapi tedavisi alan hastalarda ise yorgunluk, saç kaybı, iştah kaybı, ağız yaraları, mide bulantısı, kusma gibi yan etkilerin yanı sıra kanama veya morarma, düşük kan sayımı ve enfeksiyon gibi ciddi yan etkiler de görülmektedir. Kemoterapi genellikle radyoterapi ile birlikte uygulansa da pankreas kanserinde başarı oranı yüksek bir tedavi değildir (Von Hoff ve diğ., 2013). Kemoterapi ajanlarına karşı hastaların tümör hücrelerinde direnç gelişmekte ve tedavinin başarı oranı düşmektedir (von Wichert ve diğ., 2008).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında pankreas kanserinin tedavisinde geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı görülmektedir. Cerrahi müdahaleye uygun olmayan hastalarda tümörün tedavi edilebilir boyutlara indirgenmesi ve/veya nüksün engellenmesi için, düşük morbiditeye sahip tümör dokularında lokal olarak tahribata yol açabilen minimal girişimsel bir tedavi yönteminin araştırılması gerekmektedir. Fotodinamik terapi (FDT) bölgesel solid tümörlerin tedavisinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onaylı bir tedavi yöntemidir.

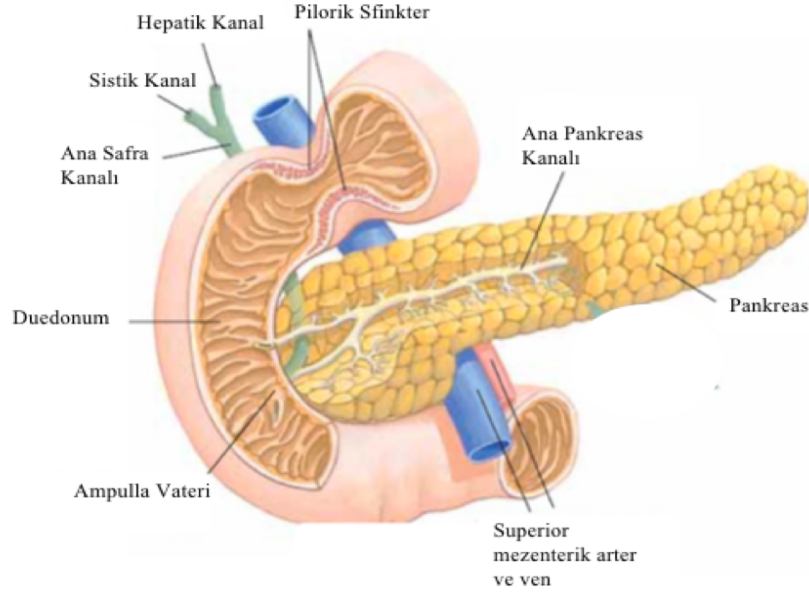
Fotodinamik terapi, seçici olarak fotoduyarlı maddenin yüklenmesinin ardından tümör dokunun ışık ile uyarılması esasına dayanır. Uyarılan dokuda, oksijen varlığında, lezyon apoptoza, nekroza ya da otofajiye sürüklenir. FDT'nin biyolojik etkisi fotokimyasal olup, termal değildir. Bu durum bağ doku hasarını minimize ederek sağlıklı çevre doku ve organları korumaktadır. Fotodinamik terapide derin doku tümörlerinin tedavisi için kullanılacak farklı fotoduyarlı maddeler geliştirilmektedir. İndosiyanin yeşili, dokunun derinine nüfuz edebilen 780-810 nm dalga boyları arasında absorpsiyon yapabilmektedir.

Tez çalışmasının konusu, indosiyanin yeşili (ICG) molekülünün 785 nm bir lazer kaynağı kullanılarak, MIA PaCa-2 pankreas kanser hücre hattı ve kontrol grubu olarak MRC-5 normal akciğer fibroblastik hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulanmasıdır. Tez çalışmasında, ICG tabanlı FDT'nin fototoksik, antiapoptotik etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı, ileride yapılacak araştırmalar ve tümör tedavisi için kliniklerde ICG tabanlı FDT uygulamalarının geliştirilmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PANKREAS VE PANKREAS KANSERİ

Pankreas, karın boşluğunun derin kısmında, midenin arkasında ve omurganın önünde yer alan sindirim sisteminin önemli bir organdır. Yetişkinlerde 14-20 cm uzunlukta ve 75-100 g ağırlıkta mide, duodenum ve kolon ile ön yüzü kapatılmış konumdadır (Campbell ve Verbeke, 2013). Pankreasın anatomik yapısı baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Pankreasın anatomik yapısı (Bardeesy ve DePinho, 2002).

Pankreas salgıları, ekzokrin ve endokrin olmak üzere iki çeşittir. Ekzokrin salgıların üretildiği hücreler asinar ve duktal hücrelerdir ve tüm pankreasın %85'ini oluşturmaktadır. Endokrin salgılar ise dış dokuya gömülü olarak Langerhans adacıkları şeklinde konumlanmıştır. Adacık dokuları pankreasın %2'sini oluşturur. Pankreasın geri kalan kısmı ise ekstraselüler matriks ve damarlardan oluşur. Adacık dokusu 4 farklı hücre çeşidinden oluşur. Bunlar; alfa hücreleri (%15), beta hücreleri (%70), delta hücreleri (%10), pankreatik polipeptit (%5) hücrelerdir. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri somatostatin ve pankreatik polipeptit hücreleri ise pankreatik polipeptit salgılamaktadır. Langerhans adacıklarında üretilen diğer

hormonlar ise; VIP, serotonin, pankreastatin, CGRP, nöropeptit Y, gastrin-bağımlı peptittir (Slack, 1995; Bardeesy ve DePinho, 2002).

2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyoloji

Pankreas kanseri, görülme sıklığı son yıllarda artmış ve batıda gastrointestinal kanser türleri arasında ikinci sıraya çıkmış olan, ölüm oranı çok yüksek bir hastalıktır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre kötü huylu tümör nedeniyle gerçekleşen ölümlerin toplam sayısı 2014 yılında 76 bin 475 olurken, 2015 yılında 76 bin 969 olarak tespit edilmiştir. 2014 yılında bu ölümlerin %5,7'si, 2015 yılında ise %5,9'u pankreasın kötü huylu tümöründen kaynaklanmıştır (Tüik, 2015).

Pankreas kanserinin dünyadaki seyrine bakıldığında 2013 yılında kansere bağlı ölümlerde yedinci sıradaki ölüm nedeni pankreas kanseridir. Pankreas kanserinin bütün türlerinde 5 yıllık sağ kalım oranı %8'dir. Pankreas kanseri tipik görülme yaşı 70-80 yaş aralığında olmakla beraber 50-60 yaş aralığında da görülme sıklığı artmıştır (Siegel ve diğ., 2013).

2.1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin etyolojisi demografik faktörler, hasta ile ilgili faktörler, çevre ile ilgili faktörler ve diyet olarak dört farklı başlıkta toplanmaktadır. Demografik faktörler incelendiğinde 60 yaş ve üzeri kişilerde, erkeklerde ve zencilerde pankreas kanserine yakalanma oranının daha yüksek olarak görülmektedir (Zavoral ve diğ., 2011; Muniraj ve diğ., 2013).

Pankreatit, pernisiyöz anemi, diyabet, endokrin ve oto immün hastalıkları, mide rezeksiyonu geçmişi olan hastalarda ve kalıtsal olarak yatkınlığı olan kişilerde pankreas kanserine yakalanma oranı daha yüksek görülmektedir (Yadav ve Lowenfels, 2013).

Sigara ve alkol kullanımının kesin olarak pankreas kanserine yakalanma oranını arttırdığı gözlenmiştir. Pankreas kanseri hastalarının %25'inde sigara kullanımı ana neden olarak ve aktif sigara kullanımının ise yaklaşık olarak 2,2 kat olarak hastalığa yakalanma riskini arttırdığını gösterilmiştir. Alkol kullanımının günde 30 g ve yüksek oranda olmasının pankreas riskini %22 oranında arttırdığı gösterilmiştir (Maisonneuve ve Lowenfels, 2010).

Kişilerin mesleklerinde betanaftilamin, benzidin, petrol ürünleri, DDT, pestisit, ağır metaller, aliminyum, kömür ve havagazına maruz kalmalarının pankreas kanserine yakalanma oranını arttırdığı gözlenmiştir (Muniraj ve diğ., 2013).

Kişilerin beslenmelerinde yüksek yağ, yüksek karbonhidrat, yüksek kolesterol, yüksek doymuş yağ asidi, tuzlu ve tütsülü et tüketimleri de pankreas kanseri riskini attırmaktadır (Zavoral ve diğ., 2011; Wörmann ve Algül, 2013).

2.1.3. Pankreas Kanseri Tanı ve Evrelemesi

Pankreas kanseri erken evrelerde tanısı zor bir hastalıktır. Pankreasın yerleştiği konum pankreasa ait hastalıkların karından hissedilmesini, görüntülenmesini ve teşhisini zorlaştırmaktadır. Pankreas kanserinin klinik bulgularında safra yolu tıkanıklığı ve sarılık, kilo kaybı, şiddetli epigastrik ve bele vuran ağrılar, iştahsızlık yaygın gözlenmektedir. Kaşıntı, koyu renkli idrar, açık renk gaita, kusma kısmen daha düşük oranlarda görülen bulgulardır. Sarılık ve safra yolu tıkanıklıkları en sık ve en erken ortaya çıkan belirtilerdir. Bu belirtiler gözlerde ve deride sararma olarak ortaya çıkmaktadır. Pankreas tümörünün safra yolunu tıkaması sonucu karaciğer salgısı olan bilirubininin duodenuma geçmesinin engellenmesi sarılığın nedenidir. Şiddetli epigastrik ve bel ağrılarının nedeni olur.

Pankreas kanserlerinin %90'ı duktal epitel hücreli karsinomdur. Pankreas başı karsinomlar, gövde ve kuyruk kısımlarında meydana gelen kanserlere oranla daha fazla görülmektedirler. Klinikte, pankreas tanısı konulduğunda tümörün %10'u pankreasta, %90'ı ise lokal yayılmış (metastaz) tümör şeklindedir (Karoumpalis ve Christodoulou, 2016; DiMaio, 2015). Pankreas endokrin tümörler, tüm tümörlerin %6'sını kapsamaktadır (Yonezawa ve diğ., 2008).

Pankreas kanserinin tanısında kan testleri ve tümör belirteçleri ile görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Kan testlerinde karaciğer ile ilgili enzimlerin serum düzeyleri, K vitamininin eksiklik ve emilim bozukluğu ile ilgili değerler tümörün tanısında kullanılır fakat bütün verilerin normal değerlerinde olduğu durumlarda da pankreas kanseri görülebilmektedir. Görüntüleme yöntemleri öncelikli olarak tercih edilen tanı metodudur. Transabdominal ultrasonografi doğruluk oranı %50-70 oranında olan bir yöntemdir ve 3 cm ile daha küçük boyutlu tümörler için hassas değildir (Muniraj ve diğ., 2013; Tummala ve diğ., 2011). Bilgisayarlı tomografi ve çoklu detektörlü bilgisayarlı tomografi opere edilebilir tümörlerin tanısında %90 oranına kadar etkili olan bir yöntemdir. Manyetik rezonans görüntüleme görüntü

çözünürlüğü en yüksek, küçük tümörlerin tanısında etkili olabilen bir yöntemdir. Pankreas kanserinin tanısında ve kanserin evrelemede endoskopik ultrasonografi (EUS) kullanılan en başarılı yöntem olarak kabul edilmektedir. 5 mm ve daha küçük boyutlardaki tümör kitlelerin teşhisini sağlamaktadır (DiMaio, 2015; Legmann ve diğ., 1998; Yasuda ve diğ., 1993).

Pankreas kanserinin evrelemede Amerikan Birleşik Kanser Komitesi'nce tümör boyutu, damar genetiği ve durumu, lenf nodu metastazı, metastazın varlığının yakınlık veya uzaklığının değerlendirilmesiyle TMN (T: Tümör, N: Nod, M: Metastaz) sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (Tablo 2.2) (Li ve diğ., 2018).

Tablo 2.1: Pankreas kanserinin evrelemesi.

Primer Tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör pankreasla sınırlı ≤ 2 cm
T2	Tümör pankreasla sınırlı > 2 cm
T3	Tümör, çölyak eksenine veya superior mezenterik arteri sarmadan pankreasın dışına uzanmış
T4	Tümör, çölyak eksenine ve superior mezenterik arteri sarmış (primer tümör cerrahi olarak uzaklaştırılmaz)
Bölgesel Lenf Nodları (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı
Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak Metastaz var

Tablo 2.2: Pankreas kanserinin anatomik evrelemesi.

Anatomik Evre	Prognostik Gruplar
Evre0	Tis, N0, M0
Evre1A	T1, N0, M0
Evre2B	T2, N0, M0
Evre2A	T3, N0, M0
Evre2B	T1, T2 ya da T3; N1; M0
Evre3	T4; NX N0 ya da N1; M0
Evre4	T1, T2, T3 ya da T4; NX, N0 ya da N1; M1

2.1.4. Pankreas Kanserinin Tedavisi

Pankreas kanseri ölümcül bir hastalıktır. Hastalığın ilk teşhis anında hastaların %20'sinden azı küratif tedavi olan cerrahiye uygundur. En etkili tedavi stratejisi olarak cerrahi ve sonrasında uygulanan adjuvant terapiler görülmektedir. Pankreas kanserinin tedavisinde etkili bir erken teşhis belirtecinin olmaması hastaların küratif tedavilerden faydalanma oranını düşürmektedir. Pankreas kanserinde kemoterapi ve kemoterapi-radyoterapi kombine uygulamalarının son yıllardaki başarı oranındaki iyileşmelere rağmen, 5 yıllık sağkalım oranı %8'i aşmamaktadır (Ryan ve diğ., 2014; Cid-Arregui ve Juarez, 2015; Paulson ve diğ., 2013; Siegel ve diğ., 2016).

Pankreas kanserinin tedavisinde uygulanan yöntemler ise şöyledir;

- ✓ Cerrahi yaklaşım,
- ✓ Ablasyon yöntemleri,
- ✓ Radyoterapi,
- ✓ Kemoterapi,
- ✓ Ağrı palyasyonu'dur (American Cancer Society, 2018).

Pankreatik tümörlerin tedavisinde uygulanan protokole tümörün cerrahi rezektabilitesine, hastalığın evresine göre karar verilir. Rezektabilite kriterlerine göre tedavi üçe ayrılır. Bu

kriterlere göre tümörler rezektable, borderline rezektable ve unrezektable (lokal ileri)'dir. (Varghese ve diğ., 2016).

Rezektable tümörlerde, tümörün uzak metastaz yapmış olmaması, arteryal yapılarda tümör olmaması, venöz yapılarda tümör olmaması ya da duvar yapısını bozmayacak ölçüde temasın olması gerekmektedir (Du ve diğ., 2015). Cerrahi yöntemler uygulanır. Kanserin tekrar etmesinin önlenmesi için ajduvant tedavi olarak kemoterapi ya da radyoterapi-kemoterapi uygulanır (Flandin ve diğ., 2004).

Borderline tümörlerde, tümörün uzak metastazın olmaması ama tümörün inferior vena kavaya temasının olması, süperior mezenterik vene temasının olması gerekmektedir (Kircher, et al., 2011). Preoperatif neoadjuvant terapi olarak kemoterapi veya kemoterapi-radyoterapi uygulanır (Sperti, et al., 2003). Tedavi sonrası tümör rezekte edilebilecek boyutlarda ise cerrahi yapılır. Sonrasında hastaya adjuvant terapi uygulanır (Yokoyama, et al., 2012).

Unrezektable tümörlerde uzak metastazının olması gerekmektedir. Kemoterapi ve kemoterapi-radyoterapi uygulanır. Kemoterapi, hastalığın progresyonuna göre ikinci olarak tekrar uygulanabilir. İleri aşamalarda ise palyatif tedavi uygulanır (Tempero ve diğ., 2017) (Andriulli ve diğ., 2012)

2.1.4.1. Cerrahi Yöntemler

Pankreas kanserinin tedavisinde en etkin, en sık ve küratif olarak uygulanan tek yöntem cerrahidir. Bununla beraber, pankreasın anatomik konumu itibariyle hastalığın teşhisinin zorluğu nedeniyle hastaların büyük çoğunluğu rezekte edilemez evrededir (Sohal ve diğ., 2017). Cerrahi rezeksiyonda ana amaç tümörün bütünüyle uzaklaştırılması ve kalıntı kalmamasıdır (Shaib ve diğ., 2016; Yang ve O'Reilly, 2015).

Whipple prosedürü (pankreatikoduodenektomi) en sık uygulanan yöntemdir. Bu prosedürde pankreasın tümörlü kısmı, mide, duodenum, safra kesesi ile safra kanalının bir kısmının rezeksiyonu yapılır (Tempero ve diğ., 2014; Schwarz ve Katz, 2015).

Pilor koruyucu Whipple prosedürünün, Whipple prosedüründen farklı mide duvarının (pilor) rezeksiyonun yapılmamasıdır. Daha kolay bir yöntem olup, operasyon sonrası iyileşmesi daha kolay olan ve ülser riskini azaltan bir yöntemdir. Dezavataji ise hastaların operasyon sonrasında mide boşaltılmasında uzun süren güçlüklerdir (Perek, 2002; Wayne ve diğ., 2001).

Genişletilmiş Whipple prosedüründe bölgesel lenf metastazlarının olması nedeniyle, Whipple prosedürüne ek olarak bir kısım çevresel dokuların ve pankreasın baş ve gövdesinin rezeksiyonu yapılır (Gülen ve diğ., 2005)

Distal pankreatektomi prosedürü pankreasın kuyruk bölgesindeki tümörlerde uygulanır (Wolff, 2012).

Total pankreatektomi ise, rezeksiyon sonrasında tümörün cerrahi sınırdaki olduğu durumlarda uygulanan cerrahi yaklaşımdır (Pisters ve diğ., 2005). Standart Whipple uygulaması sonrasında mortaliteyi arttırmak amacıyla total pankreatektomi önerilen bir prosedürdür (Gülen ve diğ., 2005).

Cerrahi sonrası hastalarda nüks olup olmadığının araştırılması için biyopsi yapılır ve nüks mevcutsa kemoterapi veya kemoterapi-radyoterapi uygulanır (Kim ve diğ., 2011).

2.1.4.2. Radyoterapi

Pankreas kanseri tedavisinde kullanılan ışın tedavisi, yüksek enerjili X-ray ışınlarıyla tümörlü olarak işaretlenen bölgelerin hedeflenerek öldürülmesi temeline dayanır. Pankreasın ekzokrin dokularında gelişen tümörlerin radyoterapiye cevap verebildikleri fakat endokrin dokularda gelişen tümörlerin cevap vermedikleri bilinmektedir. Radyoterapi klinikte cerrahi öncesi (neoadjuvan) ve cerrahi sonrası (adjuvan) uygulanmakta olup, genellikle kemoterapi ile birlikte uygulanan bir tedavidir. Lokal ileri inoperable hastalarda tümörü cerrahiye uygun boyutlara ve duruma getirilmesi için radyoterapi ile kemoterapinin birlikte kullanılabilir (Mornex ve diğ., 2005; Mornex ve diğ., 2000).

2.1.4.3. Kemoterapi

Pankreas kanserinin sistemik tedavisinde kullanılan kemoterapi, antikanser ilaçlarının intravenöz ya da oral yolla hastaya verilmesiyle hastalığın farklı evrelerinde uygulanabilen bir tedavi yöntemidir. Cerrahi işlem sonrasında kanserin nüks riskini azaltmak için adjuvant tedavi olarak uygulanabilmektedir (Claude ve Mornex, 2003). Lokal ileri inoperable hastalarda ve metastatik kanserlerde de uygulanmaktadır. Klinikte en sık kullanılan kemoterapik ajanlar gemsitabin, 5-fluorourasil, irinotekan, oksaliptin, paklitaksel, sisplatin'dir (Squadroni ve Fazio, 2010; Hammel ve diğ., 2015).

2.1.4.4. Lokal Tedaviler

Pankreas kanserinin tedavisinde uygulanan lokal tedaviler; ablasyon yöntemleri ve embolizasyon yöntemleridir (Pollom ve diğ., 2015).

Ablasyon yöntemleri olarak uygulanan radyofrekans ablasyonu, radyo dalgalarının ince problemlerle tümöre iletilmesi işlemi kapsar. Mikrodalga termoterapi de ise mikrodalgalar kullanılarak tümörün ablasyonu sağlanır. Krioablasyonda ise prob kullanılarak dokuya ileten soğuk gazların tümör hücrelerini dondurarak yok etmesi hedeflenir.

Embolizasyon yöntemlerinde ise hedef tümör hücrelerine kan akışının durdurulması ile hücre ölümünün sağlanmasıdır.

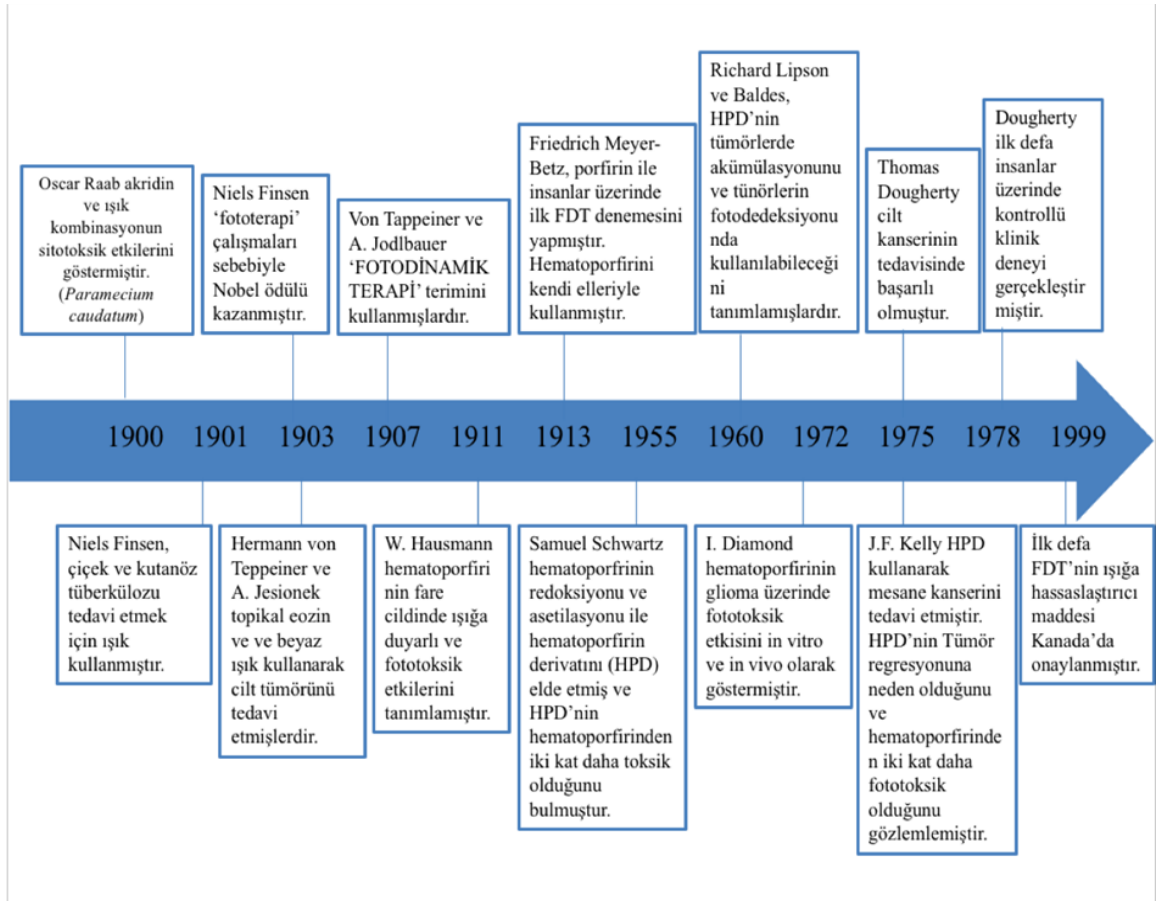
2.2. FOTODİNAMİK TERAPİ

Işık, Antik Mısır, Hindistan ve Çin’de sedef hastalığı, vitiligo ve cilt kanseri gibi çeşitli deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmış olup, bin yıldan daha uzun bir süreden bu yana insanların sağlıklarına geri kavuşmaları için kullandıkları bir tedavi aracıdır (Ackroyd ve diğ., 2001; Daniell ve Hill, 1991). Güneş ışığı 18. ve 19. yüzyıllarda Fransa’da tüberküloz, raşitizm, romatizma, felç, ödem ve kas zayıflığı gibi çeşitli durumların tedavisinde kullanılmıştır (Cauvin, 1815).

Fotodinamik terapi Danimarkalı fizikçi Dr. Niels Finsen tarafından 19. yüzyılın sonlarına doğru geliştirilmiştir. Dr. Finsen kırmızı ışık kullanarak çiçek hastalığının tedavisinde kullanılmış ve püstüllerin iltihaplanmasını önlemeyi başarmıştır. Sonrasında kutanöz tüberküloz tedavisinde ultraviyole ışığı kullanmıştır ve sonucunda karbon ark fototerapiyi geliştirmiştir. Çalışmaları sonucu 1903’te Nobel Ödülü almıştır (Dougherty ve diğ., 1998).

Fotodinamik terapinin klinik uygulamalarının temelleri 20. yüzyılın başlarında Oscar Raab tarafından atılmıştır. Oscar Raab, akrinin kimyasalının belirli dalga boylarında ışığa maruz kalmasının paramesyum için öldürücü olabildiğini keşfetmiştir. Hermann von Tappeiner ve A. Jensioneck eozin kimyasalının cilt kanserinin tedavisinde kullanılabileceğini keşfetmişlerdir (Kufe ve diğ., 2003; Kessel, 2004). Fotodinamik terapide en fazla kullanılan kimyasallardan olan porfrin Friedrich Meyer-Betz tarafından 1913 yılının başlarında kullanılmıştır (Dolmans ve diğ., 2003; Kufe ve diğ., 2003; Kessel, 2004). Richard Lipson ve Baldes, Dr. Samuel

Schwartz tarafından hazırlanan haematoporfirinin derivatının (HpD) tümör dokuda akümüle olabildiğini ve bunun tümör dokunun fotodedeksiyonu için kullanılabileceğini keşfetmişlerdir (Lipson ve diğ., 1964; Lipson ve diğ., 1967; Gray ve diğ., 1967). HpD ise klinik ve laboratuvar araştırmaları sonucu Dougherty tarafından 1980 yılında keşfedilmiştir (Şekil 2.2) (Dougherty ve diğ., 1998). 1987 yılında ise ilk defa fotodinamik tedavide kullanılan fotoduyarlı madde olarak Photofrin® (Porfimer Sodyum) FDA tarafından onaylanmıştır. Günümüzde ise FDA tarafından onaylanmış farklı kanser türlerinde ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli fotoduyarlı madde bulunmaktadır.

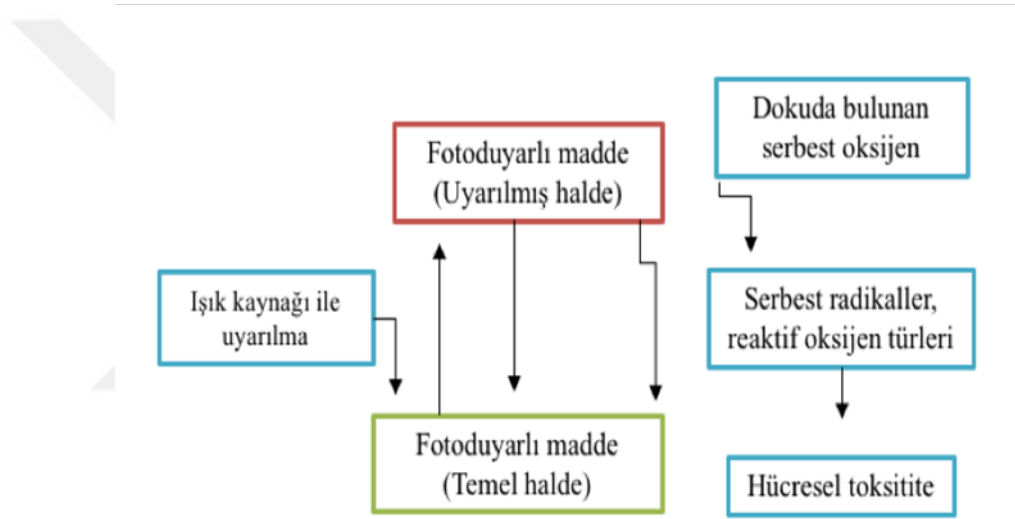


Şekil 2.2: FDT'nin 1900-1999 yılları arasındaki tarihçesi (Dolmans ve diğ., 2003).

2.2.1. Fotodinamik Terapinin Tanımı ve Fotodinamik Terapide Meydana Gelen Kimyasal Olaylar

Fotodinamik terapi, fotoduyarlı bir madde ile ışık arasındaki oksijen-bağımlı reaksiyonlara dayanan ve hedeflenen dokunun yıkımının sağlanmasını temel alan bir tedavi metodudur (Dolmans ve diğ., 2003; Brown ve diğ., 2004). Fotodinamik tedavi üç ana bileşenden oluşur. Bunlar; fotoduyarlı madde, ışık kaynağı ve oksijendir. Kanser fotodinamik terapi ile tedavisi

fotoduyarlı maddenin sistemik olarak yüklenmesini ve tümör dokuda birikimini takiben hedeflenen dokunun uygun bir dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile uyarılmasıyla başlar (Allison ve diğ., 2004; Shirasu ve diğ., 2013; Kessel, 2004; Dougherty ve diğ., 1998; Prasad, 2003; Huang, 2005; Scherer ve diğ., 2017). Fotoduyarlı madde uygun ışık kaynağı ile uyarıldığında transfer ettiği enerjiyi, moleküler oksijene aktararak yüksek derece reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşmasına neden olur (Patrice, 2003; Juarranz ve diğ., 2008; Brancalion ve Moseley, 2002; Moan ve Juzenas, 2008). Reaktif oksijen türleri proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi biyolojik hedeflerin oksidasyonuna neden olarak, bu hedefleri apoptoz, nekroz veya otofajiye sürükler (Şekil 2.3) (Zuluaga ve Lange, 2018; Robertson ve diğ., 2009; Chen ve diğ., 2006).

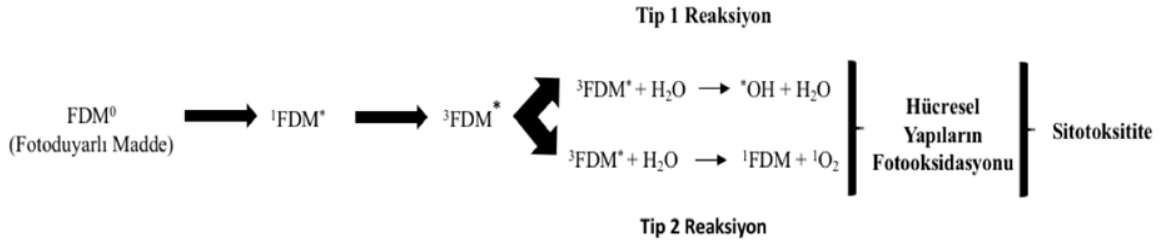


Şekil 2.3: Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizması.

Fotodinamik terapinin etkililiğindeki en önemli etmenler; (1) seçilen fotoduyarlı madde ve o maddeye bağlı olarak kullanılan ışık kaynağı (2) fotoduyarlı maddenin konsantrasyonu (3) ışık kaynağının gücü, uygulama süresi ve birim alana uygulanan enerji miktarı (4) ortamdaki moleküler oksijenin konsantrasyonudur.

Fotodinamik terapide fotooksidasyon mekanizması, ışık ile fotoduyarlı maddenin (FDM) aktive olarak temel enerji seviyesinden (FDM), birinci enerji (uyarılmış singlet) seviyesine ($^1\text{FDM}^*$) gelmesiyle başlar. Fotoduyarlı madde sistemler arası geçiş yaparak üçlü enerji (triplet) seviyesine ($^3\text{FDM}^*$) geçer. Uyarılmış triplet haldeki fotoduyarlı madde, enerjisini bir substrat molekülüne transfer edip yeniden temel haline dönebilir ve yeni bir foton absorblamak için

hazır hale gelir. Fotoduyarlı madde bu durumun sonunda bir substrat ile reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturduğunda bu reaksiyon, Tip 1 reaksiyon olarak adlandırılır. Tip 1 reaksiyon sonucu reaktif serbest radikaller, peroksit ve süperoksit gibi serbest radikaller oluşur. Fotoduyarlı maddenin üçlü enerji seviyesine ulaştıktan sonra temel hale dönmek için enerjisini moleküler oksijene transfer ederek oldukça reaktif olan singlet oksijen (1O_2) meydana getirdiğinde bu reaksiyon, Tip 2 reaksiyon olarak adlandırılır (Şekil 2.4) (Chiu ve diğ., 2003; Agostinis ve diğ., 2011). Fotodinamik terapi için genellikle kabul edilen ana reaksiyon Tip 2 reaksiyon ile hücre tahribatının gerçekleşmesidir (Bacellar ve diğ., 2015; Broekgaarden ve diğ., 2015). Potansiyel tip 3 reaksiyon olarak adlandırılan ve henüz tam olarak tanımlanmamış reaksiyon türünün ise doğrudan aktifleştirilmiş fotoduyarlı maddenin, doğrudan hedefi imha ettiği öngörülmektedir. Potansiyel tip 3 reaksiyonun oksijenden bağımsız olarak, doğrudan substratı hedefleyebileceğinden bahsedilmektedir (Allison ve Sibata, 2010).



Şekil 2.4: Fotodinamik terapide meydana gelen hücresel fotooksidasyon mekanizması.

2.2.2. Fotodinamik Terapide Fotoduyarlı Maddeler

Fotodinamik terapide fotoduyarlı maddelerin fiziko-kimyasal özellikleri tedaviyi etkileyen en önemli faktörlerdendir. İdeal bir fotoduyarlı maddenin taşınması gereken başlıca özellikler şunlardır:

- ✓ Spesifik olarak hedeflenen kanserli hücrelerde ve neoplastik hücrelerde akümüle olabilmelidir.
- ✓ Hücre membranına daha hızlı penetre olmak için hidrofobik olmalıdır. Fakat, hastaya intravenöz olarak zerk ediliyorsa kana karışıp dağılabilmesi için kısmen hidrofilik olmalıdır. Fotoduyarlı maddenin vücut içerisinde biyolojik dağılıma uğramadan güvenli seyahati için hidrofilik; hedeflenen lokasyona uygun bir şekilde bağlanması için

hidrofobik olması gerekmektedir. Bu iki ihtiyaca cevap verebilmek için hidrofobik bir fotoduyarlı maddeye eklenecek polar moleküller (amino asitler, şekerler, nükleotitler) ile amfililik bir fotoduyarlı elde edilebilir.

- ✓ Karanlıkta toksik etki göstermemelidir.
- ✓ Biyolojik dokularda yüksek oranda soğrulabilen terapötik bölgeye ait olan dalga boyundaki ışık kaynaklarını absorbe edebilmelidir. 900 nm'den uzun dalga boyunu absorbe eden fotoduyarlı maddelerin kullanıldığı FDT uygulamalarında ROS oluşumunun yeterli olmamaktadır.
- ✓ Uyarılma reaksiyonu sonunda çok miktarda singlet oksijen (1O_2) üretebilmelidir.
- ✓ Vücuttan hızlı temizlenmelidir. Sistemik toksitesisi düşük olmalıdır. Gün ışığına duyarlılığı düşük olmalıdır.
- ✓ Ticarileşmiş ve onaylanmış fotoduyarlı maddelerin üretimi tekrarlanabilir ve standartlaşmış olmalıdır. Fotoduyarlı maddenin nakliyatı kolay olmalı ve bu konuda eğitilmiş personel ya da laboratuvar gereğine ihtiyaç duyulmamalıdır (Dolmans ve diğ., 2003; Henderson ve Dougherty, 1992; Tang ve diğ., 2007; Bacellar ve diğ., 2015; Allison ve Sibata, 2010).

Klinik olarak başarılı fotoduyarlı maddelerin oluşturacakları fotodinamik reaksiyonun tip 2 reaksiyon olması beklenmektedir (Dougherty ve., 1998). Meydana gelecek fotodinamik reaksiyon fotoduyarlı maddenin lokalize olduğu bölgeye bağlıdır (Moser, 1998). Fotoduyarlı maddeler genellikle hücrede ya da hücre içi zarlarda akümüle olur. Reaksiyon sonucu oluşan reaktif türler başlangıçta, hedef dokuyu besleyen damarlara ya da hücrelere zarar vermektedir (Konan ve diğ., 2002). Normal doku hasarı olmaksızın, tümör dokunun FDT ile yok edilmesinde bir diğer önemli etken de doz ölçümüdür. Uygulanabilir ve ticari olarak temin edilebilen bir dozimetri henüz geliştirilememiştir. Bu durum FDT'nin deneysel ve klinik başarısını olumsuz yönde etkileyen bir parametre olarak kabul edilmektedir (Wilson ve Patterson, 2008; Allison ve diğ., 2004). Klinik olarak onaylı fotoduyarlı maddeler Tablo 2.3'de verilmiştir (Anans ve diğ., 2012; Dougherty, 2002).

Fotoduyarlı maddeler jenerasyonlarına, kimyasal saflık, hedef doku ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar. Birinci nesil fotoduyarlı maddeler, porfirin temelli olup hematoporfirin ve onun türevleri hematoporfirin türevleri olarak isimlendirilmişlerdir. İkinci nesil fotoduyarlı maddeler, birinci nesil fotoduyarlı maddelerin eksiklerini gidermek amacıyla geliştirilmişlerdir.

İkinci nesil olarak adlandırılan fotoduyarlı maddeler farklı yapılara sahip genişletilmiş porfirinler, klorofil türevleri ve boyalardır. Boya tabanlı fotoduyarlı maddeler klinikte onaylı olarak kullanılan boyalardır. Üçüncü nesil fotoduyarlı maddeler, birinci ve ikinci neslin nanopartiküller veya çeşitli biyolojik maddelerle (antikorlar, amino asitler gibi) konjuge edilmesiyle geliştirilmişlerdir. İkinci ve üçüncü nesil fotoduyarlı maddelerin birçoğu klinik olarak onaylı ya da ticari değildirler. Bu nedenle klinik başarıları tam olarak öngörülemezdir (Juzeniene ve diğ., 2007; Wilson ve Patterson, 2008).

Fotoduyarlı maddelerin kimyasal saflıklarına göre yapılan sınıflandırma içerdikleri komponentlerin saflıklarına göre olur (Dougherty ve diğ., 1992). Fotoduyarlı maddeler biriktikleri dokulara göre de sınıflandırılırlar. Vasküler dokuda birikmeleri hedeflenen, hücre membranlarında birikmeleri hedeflenen, hücre içinde birikmeleri hedeflenen fotoduyarlı maddeler mevcuttur. Porfirinin vasküler dokuda akümüle olmakta, hematorporfirin türevlerinin hücre membranında akümüle olmakta, ftalosiyeninler mitokondride akümüle olmakta, benzoporfrin türevleri golgi aparatında akümüle olmaktadır (Scourides ve diğ., 1987; Berg ve Moan, 1997).

Tablo 2.3: Onkolojik FDT' de onaylı foto maddeler.

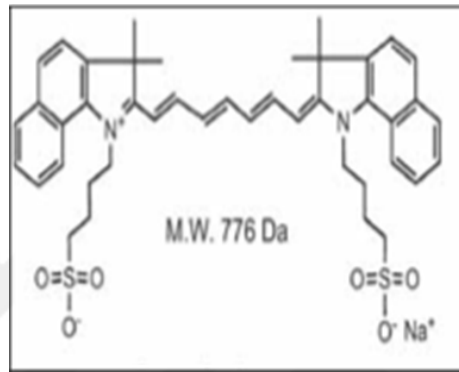
Fotoduyarlı Madde (Kimyasal İsimlendirme ve Marka)	Uyarıldıkları Dalga Boyu (nm)	Onaylı Uygulamalar (Onaylı Ülkeler)
Porfimer Sodyum (Porfirin)	630	Bazal hücreli deri kanseri (AB); Mesane kanseri (Kanada); Skuamöz hücreli karsinoma in situ (AB); Servikal kanser (Japonya); Özafagus kanseri ve displazisi (Kanada-AB- ABD- Japonya); Gastrit kanser (Japonya)
5-Aminolevulinik asit -ALA (Levulan)	635	Aktinik keratoz (Kanada-ABD)

Tablo 2.3 (devam): Onkolojik FDT' de onaylı fotoduyarlı maddeler.

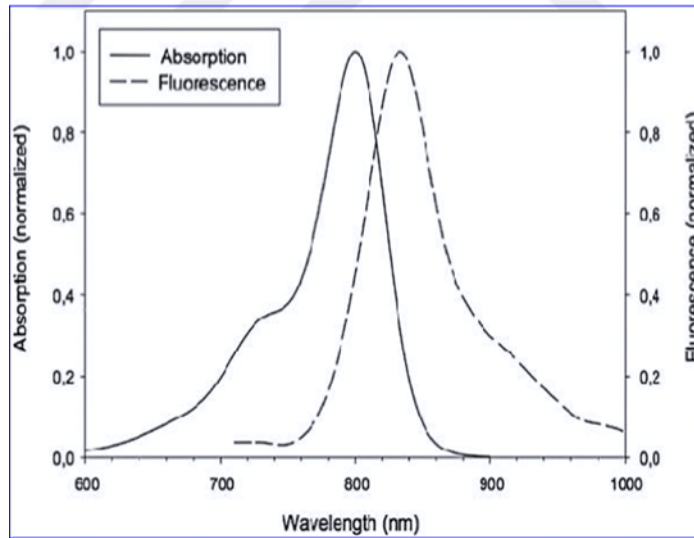
Metil ester 5-ALA (Metvix, Metvixia)	635	Aktinik keratoz (Kanada-ABD)
Meta-tetrahydroxyphenylchlorin (m-THPC) (Foscan)	652	Baş-boyun kanserleri (AB)
Taporfin sodium (Talaporfin), mono-(L)- aspartylchlorin-e6 (MACE, NPe6, LS11) (Laserphyrin)	664	Akciğer kanseri (Japonya)
Meta-tetrahydroxyphenylchlorin (m-THPC) (Foscan)	652	Baş-boyun kanserleri (AB)
Taporfin sodium (Talaporfin), mono-(L)- aspartylchlorin-e6 (MACE, NPe6, LS11) (Laserphyrin)	664	Akciğer kanseri (Japonya)
Chlorin e6 + polyvinylpyrrolidone (Fotolon)	660	Deri, vulva, serviks ve oral kanser (Rusya)
Chlorin e6+ chlorin p6 (Fotoditazin)	660	Deri kanseri (Rusya, Güney Kore)
Aluminum sulphonated phthalocyanines (Photosense)	675	Deri, vulva, oral, özefagus, mide kanserleri ile meme metazastları (Rusya)

2.2.2.1. İndosiyenin Yeşili

İndosiyenin yeşili, yakın kızıl ötesi spektrumda (700-830 nm) güçlü soğurma kapasitesine sahip fotoduyarlı bir maddedir (Nahimisa, 1982). ICG, (4,5-Benzoindotricarbocyanine) (C₄₃H₄₇N₂NaO₆S₂) negatif yüklü polimetin boyadır (Şekil 2.5). ICG suda çözünebilir, aniyoniktir ve düşük toksiteye sahiptir (Szeimies ve diğ., 1997; Fox ve Wood, 1960). ICG'nin absorpsiyon ve floresans spektrumunu Şekil 2.6'da verilmiştir (Abels ve diğ., 200) (Spektrum Pulsion medikal sistemlerden alınmıştır).



Şekil 2.5: İndosiyenin yeşilinin moleküler yapısı.



Şekil 2.6: ICG'nin absorpsiyon ve floresans spektrumu.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1956 yılında teşhis için onaylanmıştır (Baumler ve diğ., 1999; Fox ve diğ., 1956). Klinikte oftalmolojide, karaciğer fonksiyon testlerinde, kalp debisi ölçümü ve kan hacmini gözlemek için kullanılmaktadır (Giraudeau ve diğ., 2014). ICG'nin nekrotik hedeflerde seçici olarak bağlandığı belirlenmiştir ve ICG tabanlı FDT'nin

pankreas, akciğer, cilt, kolon ve meme kanserinin tedavisinde etkisi araştırılmaktadır (Baumler ve diğ., 1999; Tseng ve diğ., 2003; Crescanzi ve diğ., 2004; Brown ve diğ., 2004).

2.2.2.2. Fotoduyarlı Maddelerin Hücre İçi Birikimi

Fotoduyarlı maddelerin tümör hücrelerinde birikimi, normal hücreler ve tümörlü hücreler arasındaki fizyolojik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu fizyolojik farklılıklar; 1) Tümör dokularında, normal dokulara oranla interstitial hacim daha fazladır; 2) Tümör dokularında, normal dokulardan daha yüksek oranda makrofaj bulunmaktadır ve bu durum hidrofobik fotoduyarlı maddelerin bu lokasyonda akümüle olmasını kolaylaştırmaktadır; 3) Tümör dokularında, normal dokulardan daha fazla damarlanma olmaktadır ve mikrodamarlar arasında çatlaklar bulunabilmektedir; 4) Tümör dokuların lenfatik drenajı düşüktür; 5) Tümör dokuların hücre dışı pH'sı, normal dokulardan düşüktür ve düşük pH fotoduyarlı maddelerin hücre içine alınmasını kolaylaştırmaktadır; 6) Tümör dokuların kollojen doku içerikleri normal dokulardan daha fazladır, bilhassa porfrin ve porfirin türevli fotoduyarlı maddelerin kollojene bağlandıkları için tümör hücreleri tarafından akümüle edilmektedirler; 7) Tümör hücreleri, normal hücrelerden daha fazla oranda lipoprotein reseptörüne sahiptirler (Johnson ve Walker, 1999; Moor ve diğ., 2003).

Klinik kullanımı onaylı olan birinci nesil fotoduyarlı maddelerin farklı lipofilik karakterdeki farklı porfirin bileşenleri barındırması hücre içerisinde farklı kısımlarda birikmelerine sebep olmaktadır. İkinci nesil fotoduyarlı maddelerin kimyasal olarak daha saf olmaları, hücre içerisinde biriktikleri organellerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Fotoduyarlı maddelerin hidrofilik özelliklerine ve yığılma kapasitelerine bağlı olarak, tümörlü hücrelerin mitokondri, lizozom, plazma membranı ve endoplazmik retikulum gibi organellerinde birikmesi beklenmektedir.

Hidrofobik fotoduyarlı maddeler intravenöz olarak dolaşıma girdiklerinde lipoproteinlerle güçlü bağ yapabilme kapasiteleriyle tümörlü dokularda yoğun oranda birikebilmektedirler.

Lipofilik fotoduyarlı maddeler, düşük yoğunluklu yağ membran reseptörlerine sahip olan neoplastik hücrelerde birikmeye eğilimlidirler. Hücre plazması, endoplazmik retikulum, mitokondri, çekirdek ve lizozomun lipofilik olmaları, lipofilik fotoduyarlı maddelerin hücrelerin bu lokasyonlarında birikmesine neden olmaktadır.

Hidrofobik fotoduyarlı maddeler doğrudan bir etki ile tümörlü hücrelerin harabiyetine neden olmaktadır (Moor ve diğ., 2003).

Tümörlü hücrelerinde oksijen miktarının düşük olması ve glikolitik aktivitenin yüksek olması pH'nın düşük olmasına neden olur. Düşük pH, fotoduyarlı maddelerin hücre içine girişini kolaylaştırmaktadırlar.

Hidrofilik fotoduyarlı maddeler ise intravenöz olarak dolaşıma girdiklerinde serum protein tarafından (albümin vs.) taşınmaktadır. Hücre sitoplazmasına geçişleri nispeten daha zor olduğundan tümör dokuda interstitial boşlukta ve vasküler stromada lokalize olurlar. Hidrofilik fotoduyarlı maddeler bu nedenle tümörü vasküler hasar ile oksijen ve/veya besin maddelerinin iletimini engelleyerek dolaylı olarak yok etmektedirler (Moor ve diğ., 2003; Luksiene, 2003).

2.2.3. Işık Kaynakları ve Dalga Boyu

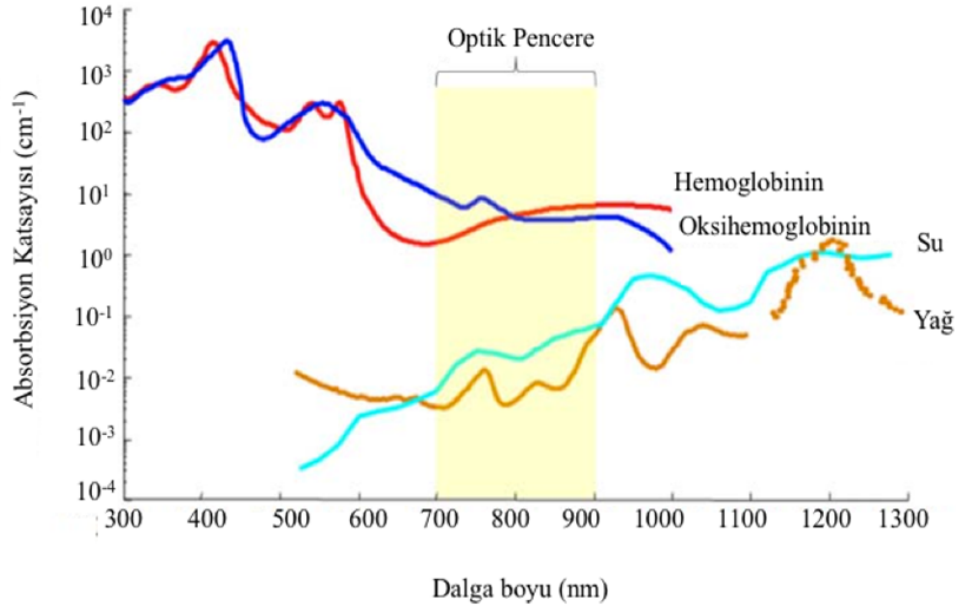
Fotodinamik terapi uygulamalarının üç komponentinden biri de ışıktır. Işığın doku içindeki dağılımı FDT'nin başarısı için hayati önem taşır. Işık, dokuya girdiğinde dağılabilir, absorbe edilebilir ya da saçılabilir. Meydana gelecek işlem doku tipine ve ışığın dalga boyuna bağlıdır. FDT' de kullanılacak ışığın seçimi, ışığın boyutsal ve temporal dağılımının ölçülmesini ve hedef dokunun yapısını, absorpsiyon ve saçılma özelliklerini içerir.

Biyolojik dokular homojen değildirler ve turbid ortam olarak isimlendirilirler. Turbid dokuda absorpsiyon endojen doku (hemoglobin, miyogloblin, sitokromlar gibi) kaynaklıdır. Işığın doku içerisinde kromoforlar, hemoglobin, melanin, amino asitler, su ve lipitlerce absorbe edilmesi sonucu nüfuz edeceği derinlik azalır. Farklı kromoforlar farklı dalga boylarındaki ışığı absorbe etmektedir (Şekil 2.7).

Biyolojik dokularda optik pencere, yaklaşık olarak 650 nm ile 1300 nm dalga boyları arasındaki, ışığın dokuya en fazla nüfuz edebildiği spektruma denilmektedir. Optik pencereden daha kısa dalga boylarında ışığı kromoforlar absorbe etmekte, daha uzun dalga boylarında ışığı su absorbe etmektedir (Ravanat ve Cadet, 1995).

FDT uygulamalarında ortalama penetrasyon derinliği 650 nm'de 1-3 mm iken, 700-850 nm arasında 3-7 mm kadardır (Svaasand, 1984; Wilson ve diğ., 1985). Bu nedenle görünür ve yakın kızılötesi spektrumda absorpsiyon yapan fotoduyarlı maddeler fotodinamik terapide tercih edilmektedir. Naftalosiyanın 766 nm dalga boyunda, bakteriyoklorin 780 nm dalga boyunda,

ICG 700-830 nm dalga boylarında ışığı absorbe eden fotoduyarlı maddelerdir (Firey ve Rodgers, 1987; Spikes, 1990).



Şekil 2.7: Optik pencere ve ışığın doku içerisinde soğurulması.

Fotodinamik terapide kullanılan başlıca ışık kaynakları; lazerler, ışık yayan diyotlar (LED), akkor lambalar ve ksenon lambalardır. Lazerlerin en büyük avantajı, monokromatik olmalarıdır. Bu sayede fotoduyarlı maddelerde yüksek seviyede fotoaktivasyon sağlanabilmektedirler. LED'ler ise özellikle dermatolojik FDT uygulamalarında tercih edilen, düşük maliyetli, lazerle oranla küçük boyutlu ve geniş ısıtma alanı oluşturabilen ışık kaynaklarıdır (Erkiert-Polguj ve diğ., 2016; Cantisani ve diğ., 2015).

FDT uygulamalarında kullanılacak ışık kaynağı; kullanılacak fotoduyarlı maddenin absorpsiyon yaptığı dalga boyuna; hedeflenen dokuya, boyutuna ve lokasyonuna; ışık kaynağının bakımının kolaylığı, maliyetine göre seçilir. Aynı ışık kaynağı fakat farklı ısıtma parametreleri ve protokolü olan FDT uygulamalarında farklı sonuçlar elde edilir. Birim zamanda birim alana etki eden foton miktarı arttığında bu durum dokudaki oksijen miktarının hızla düşmesine neden olarak FDT'nin etkisini kısıtlayabilmektedir (Henderson ve diğ., 2006; Guo ve diğ., 2015). Kullanacak ışık parametreleri konakçı anti-tümör reaksiyonunu etkileyebilmektedir (Sharikova ve diğ., 2013; Mordon ve diğ., 2015). Bu nedenle kullanılacak ışık kaynağı ile uygulanacak parametreler ve uygulama protokolü de önem taşımaktadır.

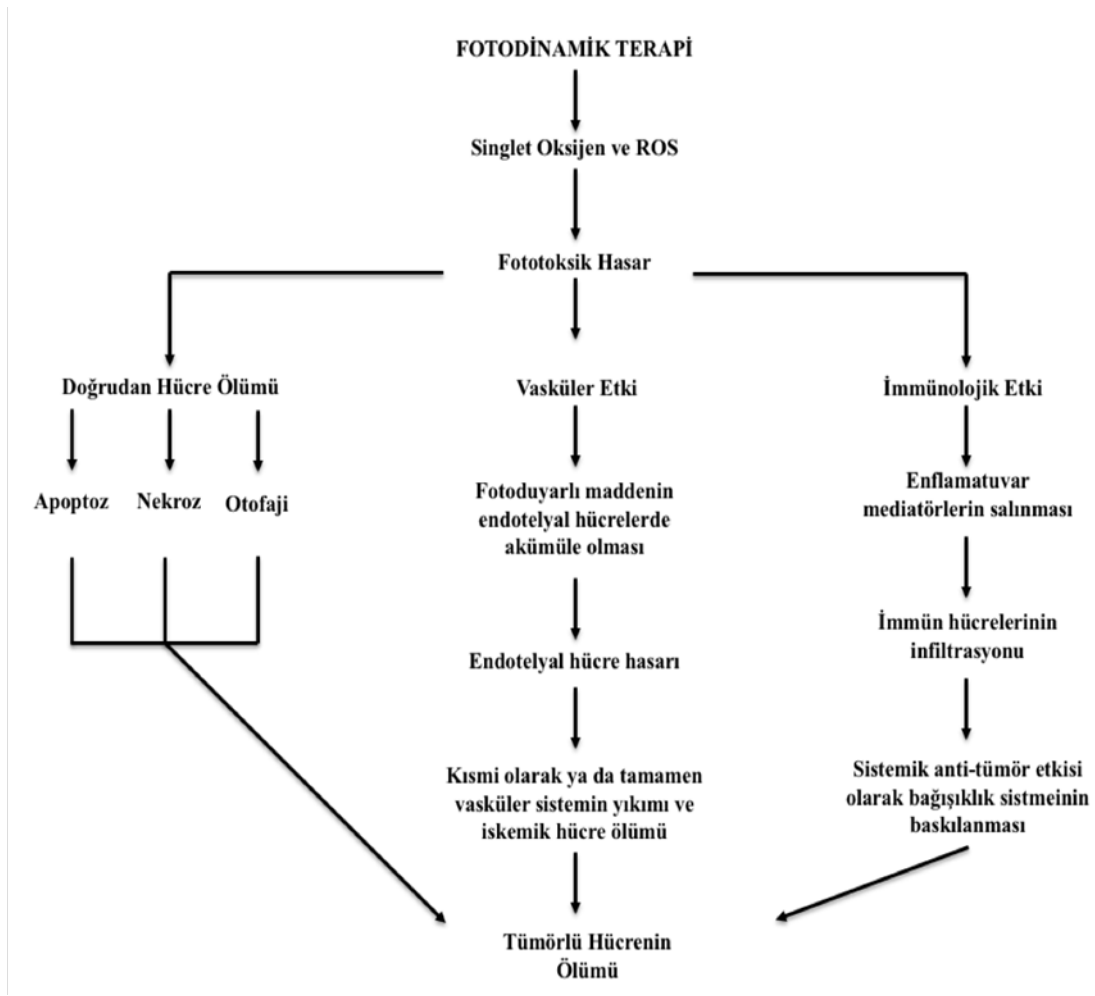
2.2.4. Singlet Oksijen

Fotodinamik terapi etkisi oksijenle doğrudan bağlantılıdır. Solid tümörlerde hipoksik bölgelerin varlığı, tedavinin önündeki en büyük engeldir (Vaupel ve diğ., 2001; Fuchs ve Thiele, 1998). Tümör vaskülarizasyonun zarar görmüş olması hipoksinin nedenlerindedir (Casas ve diğ., 2011). Hipoksinin diğer nedenleri arasında radyoterapi ve bazı kemoterapi ilaçlarının etkisi de sayılmaktadır (Fingar ve diğ., 1992). Singlet oksijenin oluşumu için doku oksijenasyonu büyük önem taşımaktadır (Lee See ve diğ., 1984; Al-Waili ve diğ., 2005).

Lokasyon olarak daha yüzeysel yer alan tümörlerde hipoksi daha az görülürken, derin tümörlerde hipoksi daha yaygın bir durumdur. Derin tümörlerde fotoduyarlı maddeler ışık ile uyarıldığında ortamdaki oksijenin dokudaki difüzyondan daha hızlı tükenmesi hipoksiye neden olmaktadır (Henderson ve., 2006). Fotodinamik terapinin başarılı olması için fotoduyarlı madde seçimi ve ışık seçimi kadar ortamdaki oksijenin varlığı da önemlidir (Chen ve diğ., 2002).

2.2.5. Fotodinamik Terapide Aksiyon Mekanizmaları

Fotodinamik terapinin tümör doku üzerinde çeşitli antitümör mekanizmaları ile etkili olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Henderson ve Dougherty, 1992; Dougherty ve diğ., 1998; Morgan ve Oseroff, 2001; Schmidt-Erfurth ve Hasan, 2000; Moor, 2000; Kessel ve Reiners, 2007). Bu mekanizmalar hücreSEL, vasküler ve immünolojik etki mekanizmaları olarak üçe ayrılır. Birinci mekanizmada fotoduyarlı maddenin tümör hücreleri içerisinde lokalize olması ve aktivasyonu ile doğrudan hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. İkinci mekanizmada tümör doku vaskülatürü hasara uğratarak, oksijen ve temel besin maddelerinin tedarik edilmesi engellenir ve vasküler etki ile hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. Üçüncü mekanizmada immün sistem uyarılarak, enflamatuvar ve immün cevap oluşturularak hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. Fotodinamik terapi uygulamalarında üç ana aksiyon mekanizması birlikte veya ayrı ayrı etkili olabilmektedir. Bu mekanizmalar Şekil 2.8'de açıklanmıştır.



Şekil 2.8: Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizmaları.

2.2.5.1. Doğrudan Hücre Ölümü

Doğrudan hücre ölüm mekanizması, hücrelerin hayati fonksiyonlarını yerine getiremediği zamanlarda homeostaziyi korumak için meydana getirdikleri sürecin sonucudur (Ebgelberg-Kulka ve diğ., 2006). Hücre ölümünün gerçekleşmesiyle hasarlı, zarar görmüş hücreler uzaklaştırılarak organizmanın korunması sağlanmaktadır (Schultz ve Harrington, 2003; Yuan ve Kroemer, 2010).

Fotodinamik terapi uygulaması sonrası meydana gelecek hücresel tepkinin çeşidi birçok faktöre bağlıdır. Meydana gelecek tepkiyi belirleyen en önemli faktör fotoduyarlı maddenin hücre içerisinde akümüle olduğu lokalizasyondur (Henderson ve Dougherty, 1992; Kessel ve Reiners, 2007). Biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olarak fotoduyarlı maddeler genellikle mitokondri, plazma membranı, lizozom, golgi aparatı, endoplazmik retikulum gibi hücre içi

organellerde lokalize olurlar (Juarranz ve diğ., 2008). Hücre iskeleti ve hücreyi bir arada tutan diğer bileşenler de fotoduyarlı maddelerin hedefleri olarak tanımlanmıştır.

Fotodinamik reaksiyon farklı komponentleri etkilese de hücrede meydana gelebilecek üç ana ölüm mekanizması vardır (Castano ve diğ., 2004). Doğrudan hücre ölüm mekanizmaları apoptoz, nekroz ve otofajidir (Foote, 1991). Hücrelerin ölüm mekanizmaları, morfoloji, enzimatik aktivite, fonksiyonel ve immünolojik cevaplara bağlı olarak programlı ya da programsız olarak belirlenir (Kroemer ve diğ., 2009; Oliveira ve diğ., 2011).

Apoptoz, hücrenin kontrollü ölüm mekanizmasıdır (Oleinick ve diğ., 2002). Fotodinamik aksiyon sonrasında, çoğunlukla mitokondride ve endoplazmik retikulumda lokalize olan fotoduyarlı maddeler hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Apoptozisi etkileyen hücre içi faktörler; sitokoninler, hücre içi kalsiyum oranındaki yükselme, tümör nekroz faktörü, tümör baskılıyıcı p53 geninin aktive olması, sitotoksik antikanser ilaçlarıdır (Kroemer ve diğ., 2009; Yuan ve Kroemer, 2010).

Apoptoz sürecini başlatan 3 faktör bilinmektedir. Bunlar; DNA hasarına karşı genlerin cevabı olarak, hücre membranında bulunan hücre ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla ve hücreye proteolitik enzim girişiyle apoptosizin başlatılmasıdır (Kroemer ve diğ., 2009; Erental ve diğ., 2012).

Fotodinamik terapi uygulamalarında fotoduyarlı maddelerin nükleusta lokalize oldukları tespit edilmediğinden direk olarak DNA hasarına yol açmadığı, bu nedenle mutajenik bir etki oluşturmadığı bilinmektedir. Bcl-2 gen ailesinin proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü-1), apoptozis sürecinde etkili ve karakteristik morfolojik değişimlere neden olan üç ana etmendir (Kang ve diğ., 2011).

Apoptoz sonucu görülen karakteristik morfolojik değişimler, mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesidir (Mfouo-Tynga ve Abrahamse, 2015).

Bcl-2/Bax gen ailesine ait proteinler apoptozun regülasyonunda önemli rol oynarlar. Apoptotik sinyalin alınması ile Bax proteinleri (proapoptotik proteinler), mitokondri membranının iyon permeabilitesini azaltır ve bu nedenle membran içindeki sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörler sitoplazmaya geçerler. Apoptoz indükleyici faktörler nükleusta meydana gelecek

apoptotik reaksiyonu başlatırlar. Sitokrom c, sitoplazma içerisinde bulunan Apaf-1 proteinine bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder. Bu kompleks apoptozom olarak adlandırılır. Aktive olan prokaspaz-9, aktif kaspaz-9'a dönüşür ve efektör kaspazlardan olan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, deoksiribonükleaz enzimlerinin serbestliğini sağlar ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptozun morfolojik belirtilerini ortaya çıkartarak hücrenin planlı ölümünü sağlar (Mroz ve diğ., 2011; Nikolettou ve diğ., 2013).

Endoplazmik retikulumda biriken fotoduyarlı maddelerin membran permeabilitesini değiştirmesiyle kalsiyum iyonlarının endoplazmik retikulumdan mitokondriye transfer olması da hücreyi apoptoza sürükleyen nedenler arasındadır. Kalsiyum iyonlarının yoğunluğu mitokondrial membranda morfolojik değişime neden olmaktadır ve bu durum hücreyi apoptoza sürükler (Giorgi ve diğ., 2015; Giorgi ve diğ., 2015; Ouyang ve diğ., 2012; Lamkanfi ve diğ., 2007).

Nekroz; rastgele meydana gelen ve gen bazında kontrol edilemeyen düzensiz hücre ölüm sürecidir. Programlı hücre ölümüne neden olan sinyal yollarının olmaması ve enflamatuvar bir yanıt oluşturulmasıyla karakterize edilen bir ölüm şeklidir (Kroemer ve diğ., 2009). Nekroz sırasında hücrede mitokondriyal ROS üretimi yoğunlaşır, apoptotik olmayan proteazlar aktive olur, ATP üretim seviyesi düşer ve kalsiyum kanalları açılır. Nekrotik hücre ölümüne neden olan en önemli faktör hipoksidir. Ağır metaller, enfeksiyon, toksik maddeler veya tramva gibi dış uyarılara karşı da nekroz gelişebilmektedir. Ökaryotik hücrelerde kaspaz aktivitesinin meydana gelmediği durumlarda, sinyal iletimi ve katabolik aktiviteler toll benzeri reseptör aracılığı ile nekroz mekanizmasını düzenler.

Yedi tip nekroz vardır ve her birinde birbirini takip eden aşamalar aynıdır. Bunlar; plasma membranın geçirgenliğinin bozulması, endoplazmik retikulum boyunca kalsiyum iyonlarının hareketi, organel ve plazma membranının şişmesi, kalsiyuma bağlı kalpin aktivasyonu, lizozomal parçalanma, hücresel yapısının degradesyonu ve enflamasyon ve/veya iltihaplanmanın meydana gelmesidir (Lemasters, 2005; Cho ve diğ., 2011).

Nekrotik hücre ölüm aşamalarının ilk basamağı, dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılara bağlı olarak hücrenin iyon dengesinin bozulmasıdır. Nekrozun başlangıcının kontrolü, reseptör etkileşimli proteinlerin (RIP1 ve RIP3) aktivitesi tarafından olur. RIP1 ve RIP3 serin-treonin yapılı bir kinazlardır. Kaspazlardan etkili olmadığı nekrozda hücre ölüm reseptörü

olarak sinyalleme işleminde görev almaktadırlar. RIP1 ve RIP3 mitokondri aktivasyonunu sağlar ve nekrozu indükler. Nekrotik uyarıcılar kalpain aktivasyonuna, neden olmaktadır. Kalpain kalsiyum ile aktive olan bir kaspaz proteazdır ve lizozom enzimlerinin salınımına katkıda bulunur. Bcl-2 ailesinden proteinler, mitokondrinin iç ve dış zarındaki porları aktive etmektedir. Mitokondriyal porlar, ROS ve kalsiyum iyonunun fazla üretilmesi halinde açılan kanallardır. Bcl-2 ailesinden Nix proteini endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınmasına neden olur ve salınan mitokondri matriksine geçerek porların açılmasına neden olur. RIP proteinlerini de aşırı ROS üretimine neden olduğu için mitokondriyal porlar açık kalır. Mitokondri de bu durumda oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretemeyecek duruma gelir ve hücre içi ATP eksikliği başlar. Ayrıca, DNA tamirini gerçekleştiren enzimler de NAD (Nikotinamid adenin dinükleotit) molekülünün parçalayarak ATP eksikliğine yol açar. Hücre içi ATP eksikliği, iyon pompasının yetersiz kalmasına neden olur. Bu durum hücre içine sıvı alınımları artırır. Organeller şişer, plazma membranının bütünlüğü bozulur ve osmotik basıncın bozulmasından dolayı hücre patlar. Hücre içeriğinin, hücreler arası boşluğa salınması enflamasyon ve/veya iltihaplanmaya neden olur. Hücreler arası boşlukta meydana gelen yangı nedeniyle makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya geçerek, o lokasyonu fagosite eder (Christofferson ve diğ., 2012; Galluzi ve diğ., 2012; Ke ve diğ., 2016; Wood ve diğ., 1997; Baines, 2010).

Nekroz ile hücre ölümü, plazma membranında biriken fotoduyarlı maddelerde sık görülmektedir. Lipozomal aliminyum klorofitalosiyininin in vitro ve in vivo olarak fotodinamik etkinliği Ehrlich tümörlerinde araştırılmıştır ve bu fotoduyarlı maddenin %90 oranında nekroz ve kısmi olarak da vasküler etki ile tümörü yok ettiği kaydedilmiştir (Mroz ve diğ., 2011; Conrad ve diğ., 2016; Longo ve diğ., 2009).

Otofaji; bir vakuol içine alınan hücre içi makro moleküllerin lizozomal olarak parçalanmasıdır. Otofaji, anabolik ve katabolik hücre içi fonksiyonların dengelenmesini sağlayan ve hasarlı hücre içi yapıların geri dönüşümünü sağlayan bir hücre ölüm şeklidir. Sitoplazmanın bir kısmı ya da ilgili organeller endoplazmik retikulumun ekstrasellüler membranı ile sarılır. Primer lizozomlar, bu yapıyla birleşerek sekonder lizozomu (= otofajik vakuol=otozom=otofagozom) oluşturur.

Otozomlar çift membranlı yapılardır. Otozom hidrolitik enzimlerle parçalanarak, nükleusta yoğunlaşmaya neden olur. Otofajik hücre ölümünde apoptotik hücre ölümünden farklı olarak,

karakteristik nükleus yoğunlaşması çok daha uzun sürede gerçekleşir. Fakat DNA kırıkları ve apoptotik cisimcikler gözlenmez (Tsujimoto ve Shimizu, 2005; Jain ve diğ., 2013; Michaud ve diğ., 2011; Di ve diğ., 2013; Xie ve Klionsky, 2007; Nikolettou ve diğ., 2013; Lemasters, 2005; Yu ve diğ., 2006; Mizushima ve Klionsky, 2007; Gozuacik ve Kimchi, 2007).

Otofaji, hücre koruyucu bir mekanizmadır ve fotodinamik aksiyon olarak gelişen hücre ölüm mekanizmalarındandır. Apoptotik ölüm mekanizması bozulduğunda, hücrenin otofajiye yönlendiği gözlenmiştir. Bu durum FDT uygulamalarında fotoduyarlı maddenin dozuna ve uygulanan ışık yoğunluğuna bağlı olarak gelişmektedir.

Otofaji, düşük doz FDT uygulamalarında koruyucu bir mekanizma olarak işlev görürken, yüksek doz uygulamalarda hücreyi ölüme sürükler. Fotoduyarlı maddenin mitokondriyal ve/veya endoplasmik retikulum biriktiği durumlarda otofajik hücre ölümü gerçekleşebilmektedir (Xue ve diğ., 2010; Garg ve diğ., 2015; Separovic ve diğ., 2011).

Genel olarak, FDT uygulamalarında hücre ölümüne gelecek cevabın belirlenmesi karmaşık süreçtir. Fakat genel olarak apoptoz, nekroz ve otofaji yolları gerçekleşmektedir. Apoptoz, nekroz ve otofajinin morfolojik özellikleri, düzenleyici faktörleri, yol açan nedenler, biyokimyasal ve diğer özellikleri Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4: Doğrudan hücre ölüm şekillerinin ayırt edici karakteristik özellikleri.

Karakteristik Özellikleri	Hücre Ölüm Mekanizmaları		
	Apoptoz	Nekroz	Otofaji
Morfolojik Özellikleri	Hücrel membran sağlamdır, Hücre küçülür, Blebler oluşur, Kromatin yoğunlaşması meydana gelir, Nükleer parçalanma olur, Organeller sağlamdır, Erken evrede fosfatidilserin translokasyonu gözlenir, Apoptotik cisimler.	Hücre membranı bütünlüğünü kaybeder, Hücre şişer, Organeller şişer ve parçalanır, Büyük vakuoller oluşur, Organeller parçalanır, Hücre lizisi gerçekleşir, DNA merdiveni oluşmaz, Fosfatidil serin translokasyonu yoktur.	Hücre boyutunun küçülür, Çift membranlı veziküller oluşur, Organellerde bozunum gerçekleşir.

Tablo 2.4 (devam): Doğrudan hücre ölüm şekillerinin ayırt edici karakteristik mekanizmaları.

Düzenleyiciler	Ölüm Reseptörleri, Bcl-2 ailesi, Beklin 1, Kaspazlar, Apoptozu inhibe edici proteinler, Adaptör proteinler, Kinazlar, Fosfotazlar, Kalsiyum iyonları, Kalpainler, BCNII.	Kalsiyum iyonları, İyon kanalları, Metabolik hatalar, Poli(ADP-riboz) (PARB), Kalsiyum iyonlarını düzenleyici proteinler, RIP kinaz, Ölüm Reseptörleri, Keremitler.	Memelilerde rapamisin inhibe edici (mTOR), Fosfoinositid-3 kinaz (PI3 kinaz), Otofaji bağlantılı gen ailesi (ATG ailesi), UPR stres sensörleri, Beklin1, Kinaz, Bcl-2 ailesi, IP3 Reseptörü.
Yol Açan Nedenler	ROS ve DNA hasarı, Ölüm reseptör ligantları, Hücre yaşlanması, Büyüme faktörü eksikliği, Organellerde meydana gelen stresler, Anti-Kanser ilaçları, Endoplasmik retikulumdan kalsiyum salınımı.	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Şiddetli oksidatif stres, Kalsiyum iyonlarının yoğunluğu, Toksik maddeler, Ağır metaller.	Protein agregasyonu, Endoplasmik retikulum stresi, Gelişimsel program, Hipoksi, İskemi, Hasarlı organeller, Proteaz Bozukluğu, Besin yokluğu.
Biyokimyasal ve Diğer Özellikler	Programlıdır, ATP gereklidir. Fizyolojik hücre ölümüdür. DNA kırıkları jel elektroforezde merdiven şeklini alır. Enflamasyon görülmez. Hücreler tek tek ya da bir kısmı bir arada ölür. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler.	ATP gerekmez, İyon dengesi bozular. Patolojik hücre ölümü gerçekleşir. DNA rastgele parçalanır. Enflamasyon görülür. Hücreler gruplar halinde ölür.	Hayatta kalabilir. Fizyolojik hücre ölümü gerçekleşir.

2.2.5.2. Vasküler Etki

Yeni kan damarlarının oluşumu ve gelişimi olarak isimlendirilen anjiyogenez, kanser hücrelerine oksijen ve besin kaynağı sağlayarak hücrelerin proliferasyonu ve metastatik durumlarında anahtar bir rol oynamaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve

Weinberg, 2011). Kan damarlarının yeterli gelişim göstermediği tümörlerde oksijen yoğunluğunun düşük olduğu nekrotik bölgelerin varlığı, tümör vaskülatürünün önemini göstermektedir. Tümörlerin mevcut vaskülatürüne hasar veren ve anjiyogenezi inhibe eden anti-anjiyogenik teröpatikler, tümör proliferasyonunu durdurmaya yönelik ve klinik olarak onaylı kanser tedavi yöntemidir (Al-Husein ve diğ., 2012). Seçici olarak vasküler hasar oluşturulması ve anti-anjiyogenik etkinin meydana gelmesi fotodinamik tedavi uygulamalarının etkinliğini arttırmaktadır. Örneğin, hematoporfirin türevi (HPD), tümörlerin vasküler yapısında hasara yol açarak kan akışında problemler meydana getirerek terapötik etki oluşturmaktadır (Star ve diğ., 1986). FDT uygulamalarında fotoduyarlı madde uygulaması ile ışık aktivasyonu arasındaki sürenin kısa olmasının hedef vasküler sistemde hasar oluşmasına etki ettiği kaydedilmiştir. Fotoduyarlı madde olarak Verteporfin kullanılarak sıçan kondrosarkomlarına FDT uygulamalarının yapıldığı bir çalışmada, ilaç-ışık uygulamaları arasındaki süre kısaltıldığında vasküler hasarın arttığı kaydedilmiştir (Fingar ve diğ., 1999).

Vasküler etki gösteren fotoduyarlı maddeler ile gerçekleştirilen FDT uygulamalarında endotelial ve subendotelial hücreler hasar görmektedir. Endotelial hücreler yuvarlaklaşır ve hücreler arasındaki bağlantıları genişler (Ben-Hur ve diğ., 1998). Bu durum endotelial hücrelerin altındaki dokunun açığa çıkmasına neden olur. Hasar gören endotelial hücreler Von Willebrand faktörü gibi pıhtılaşma faktörlerinin, trombositlerin aktive edilmesine neden olur. Aktive olan trombositler subendotelial dokuya geçerler ve trombosit agregasyonuna, trombüs oluşumuna ve damar tıkanmasına neden olurlar. Aktif trombositler ayrıca, FDT sonrası vazokonstrüksiyona neden olarak kan akışını daha da azaltmaktadır (Foster ve diğ., 1991). Böylece, fotodinamik terapi uygulama esnasında ve uygulama sonrasında hedef dokuda damar daralması, damar geçirgenliği ve lökosit adezyonu gibi tahribatlar meydana gelmektedir. Tedavinin ardından damarlardan makromolekül ve sıvı sızıntıları olmakta ve hedef bölgede doku ödemi görülmektedir (Nelson ve diğ., 1987; Fingar ve diğ., 1997). Bu durum tümör dokuya kan akışını yavaşlatarak bölgesel hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksi ve besin maddelerinin yoksunluğu, tümör hücrelerinin yıkımını tetiklemektedir. Vasküler etki, fotodinamik terapinin anti-tümör etkisinin en önemli bileşenlerindedir (Chen ve diğ., 2005; Kurohane ve diğ., 2001; Krzykawska-Serda ve diğ., 2014).

2.2.5.3. İmmünolojik Etki

İmmünolojik etki, fotodinamik terapinin indüklediği üçüncü tümör yıkım mekanizmasıdır ve enflamatik bir yanıtın oluşturulmasına dayanır (Castano ve diğ., 2006). Enflamasyon sürecinin temel özelliği, tedavi edilen bölgede enflamatuvar faktörlerin salınmasıdır (Korbelik ve diğ., 2005). Fotodinamik terapiden kaynaklanan oksidatif stres, ısı şok proteinlerinin transkripsiyon faktörlerinin salınmasına ve enflamatuvar sitokinlerinin salınmasını düzenlemektedir (Gollnick ve diğ., 2003). Proteinlerin salınması ve hasarla ilişkili moleküler yapıların (DAMP) salınması enflamatuvar yanıtın oluşmasına katkıda bulunur (Garg ve diğ., 2010; Matroule ve diğ., 2006).

Yapılan çalışmalar, FDT uygulamalarından sonra ısı şok proteinlerinin ekspresyonuna ve salınımına neden olduğunu göstermektedir (Reginato ve diğ., 2014; de Vree ve diğ., 1996). Isı şok proteinleri, tümör antijenlerine bağlanarak Toll benzeri reseptörleriyle etkileşime girer (Vabulas ve diğ., 2002; Beg, 2002; Korbelik ve Sun, 2006). Bu etkileşimler enflamatuvar ve immün cevap genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Isı şok proteinlerinin ve hasarla ilişkili moleküler yapıların kaynağı FDT'nin hücrel etkisine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedirler (Cecic ve Korbelik, 2002; Gollnick ve diğ., 2002). Sonuç olarak, FDT ile indüklenen tümör dokuda enflamatik bir cevap meydana gelmektedir (Garg ve diğ., 2010; Krosi ve diğ., 1995; Canti ve diğ., 1994; Zhang ve diğ., 2009).

2.2.6. Klinikte Pankreas Kanseri Tedavisinde Fotodinamik Terapi

Pankreas kanseri, sıklıkla geç evrelerde teşhis edilen, tedavisi zor bir hastalıktır. Genetik ve hücrel seviyede tümör heterojenitesi nedeniyle pankreas kanserleri çoğunlukla kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gösterirler (Bramhall ve diğ., 1995). Pankreatik tümör hücrelerinde, sıklıkla mutasyona uğramış onkogenler bulunur. Bunun yanı sıra, onkogenleri tedaviye dirençli hale getirdikleri düşünülen kök hücre benzeri hücre grupları mevcuttur. Pankreas kanserinin biyolojinin daha iyi anlaşılmasıyla tedavisinde ilerleme kaydedilmesi beklenmektedir fakat günümüzde pankreas kanseri ölümcül bir hastalıktır (Falasca ve diğ., 2016).

Pankreas kanserinin geç tanısına bağlı olarak hastaların %5 ile %3'den azı küratif tedavi olan cerrahiye uygun olmaktadır (Von Hoff ve diğ., 2013). Kemoterapi, opere edilemeyen hastalar için bir seçenek olmasına karşın, sağ kalıma anlamlı olarak çok düşük bir katkı yapabilmektedir. Fotodinamik terapi, aksiyon modelleri ile direnç mekanizmalarına karşı üstün gelerek pankreas kanserinin tedavisinde etkili olabilecek bir yöntemdir.

Fotodinamik terapi klinikte ilk olarak lokal ileri pankreas kanserlerinde, fotoduyarlı madde olarak mTHPC kullanılarak 2002 yılında denenmiştir (Bown ve diğ., 2002). Bu çalışmada FDT, düşük morbidite ve mortalitede olan bütün hastalarda tümör nekrozlarına neden olmuştur. Faz I klinik çalışmalarda, FDT'nin cerrahiye müdahaleye aday olmayan lokalize pankreas kanseri hastalarda uygulanması önerilmiştir. Faz I ve II doz artırma çalışmalarının sonuçlarına göre, Verteporfin® bazlı FDT'nin düşük morbiditede tümör redüksiyonunu güvenli bir şekilde sağladığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma halen devam etmektedir (EudraCT ID: 2006-004097-28) (Huggett ve diğ., 2014).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE HATLARI VE KÜLTÜR KOŞULLARI

Çalışmada kullanılan MIA PaCa-2 pankreas epitelyal kanser hücre hattı (Tablo 3.1) ve MRC-5 normal akciğer fibroblastik hücre hattı (Tablo 3.1) Amerikan Tür Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınmıştır. MIA PaCa-2 kanser hücreleri %10 fetal sığır serum (FCS), 100 units/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ihtiva eden NaHCO₃ solüsyonu, 2 µM L-glutamin ile desteklenen Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) besiyerinde, %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de çoğaltılmıştır. MRC-5 normal fibroblastik hücreler, %10 FCS, 100 units/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ihtiva eden NaHCO₃ solüsyonu, 2 µM L-glutamin ile desteklenen Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM (DMEM) (DMEM; Gibco BRL-Invitrogen, Hollanda) besiyerinde, %5 CO₂'li inkübatörde (Universal 320 R; Hettich, Almanya) 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücreleri dondurularak -80°C'ye kaldırılmıştır. Bu işlem için öncelikle, yapışık durumdaki hücrelere 1-2 ml %0,05 Tripsin/EDTA (Gibco BRL-Invitrogen, Hollanda) uygulanmıştır ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 1-2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından flasklara taze hücre besiyeri eklenmiş ve hücreler falcon tüplere alınmıştır. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1-2 ml Dimetilsülfoksit (DMSO) ve besiyeri ihtiva eden dondurma solüsyonu eklenmiştir. Hücreler kriyotüplere alınmış ve -20°C'de donmalarının ardından, -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

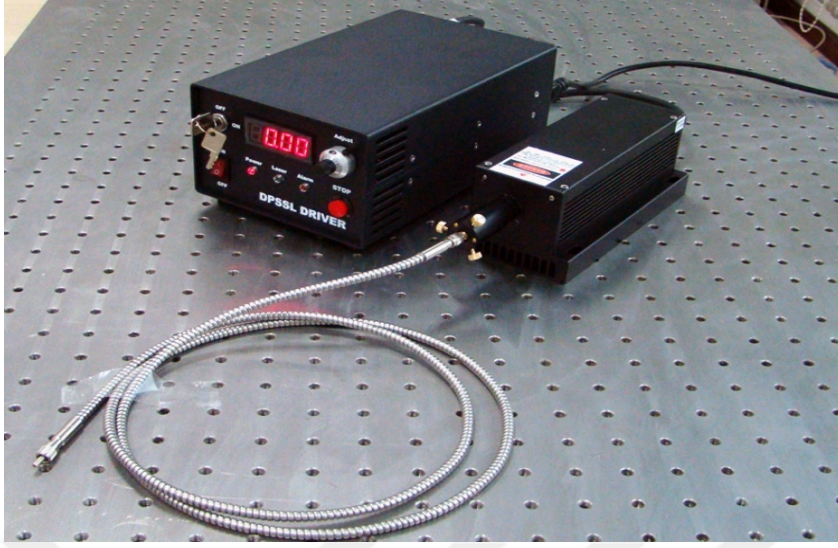
Dondurulmuş hücrelerin içinde buldukları kriyotüpler 37°C'deki su banyosunda eritilmiştir. Çözünen hücreler, 10 ml taze besiyeri içeren falcon tüplerine aktarılmış ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra üzerlerindeki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre pelleti, taze besiyeri ile çözdürülmüş ve flasklara alınmıştır. 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiş ve MIA PaCa-2 hücrelerinin ve MRC-5 hücrelerinin besi ortamları 2 gün ara ile yenilenmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılmış ve 96'lık hücre plakalarına (10.000 hücre/kuyu) ekilip 24 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücre tipleri.

Hücre	MIA PaCa-2	MRC-5
ATCC Kodu	RL-1420™	CeL-171™
Organizma	<i>Homo sapiens</i> , İnsan	Homo sapiens, İnsan
Doku	Pankreas	Akciğer
Hücre Tipi	Epitelyal Hücre	Fibroblast
Hastalık	Karsinoma	Normal
Morfoloji	Yüzen yuvarlak bağlı epitelyal hücreler	Fibroblast
Cinsiyet	Erkek	Erkek
Yaş	65	14 haftalık gestasyon
Büyüme Özelliği	Aderent	Aderent

3.2. IŞIK KAYNAĞI

Çalışmada 785 nm diyot lazer (MDL-III, CNI Laser, Çin) kullanılmıştır. Çıkış gücü 1W olan lazer sürekli moddur (CW). Kullanılan SMA (Step-Index Multimode) optik fiberin kalınlığı 400 µm'dır. Lazerin çıkış gücü her deney öncesi ve sonrası optik güç ölçer ile kontrol edilmiştir (Newport CA, ABD). Işınlama esnasında ilgili kuyucuk dışında kalan kuyucuklar siyah folyo ile kapatılmıştır. Lazer probu plakaların üstüne en yakın olacak şekilde konumlandırılmıştır.



Şekil 3.1: 785 nm diyot lazerin görüntüsü.

3.3. FOTODUYARLI MADDE

Çalışmada kullanılan fotoduyarlı madde indosiyenin yeşili (ICG) (Pulsion Medical Systems AG, Münih, Almanya)'dir. Çözücü madde olarak PBS (Phosphate-Buffered Serum, Biochrom, Almanya) kullanılmıştır. ICG'nin maksimum absorpsiyon ve floresans ışınım yaptığı aralık olan yakın kızılötesi spektrumun özellikle 780-810 nanometreleri arasındadır. Bu nedenle, ICG'nin ışıktan zarar görmesini (photobleaching) engellenmek için deneylerin ICG uygulaması yapılan her aşamasında işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. ICG'nin Optimal Konsantrasyonunun Hesaplanması

Çalışmada ICG'nin optimal konsantrasyonunun hesaplanması için 6 farklı ICG konsantrasyonu, 24 saat akümüle edilerek denenmiştir. 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 1×10^4 hücre ekilerek MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hatları ekilmiştir. Hücreler standart büyütme koşullarında yetiştirilmiştir. Hücre ekiminden sonra kontrol grubuna ICG içermeyen besiyeri, diğer kuyuklarda sırasıyla 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ ICG ile 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kuyucuklardan besiyeri aspire edilmiştir ve taze besiyeri ile WST-1 karışımından 10 μM /kuyucuk verilmiştir ve 4 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda 440 nm absorpsiyon değeri altındaki ölçüm değerleri, 630 nm referans dalga boyunda ELISA ile saptanmıştır. ICG maddesinin uygulanacak konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak seçilmiştir.

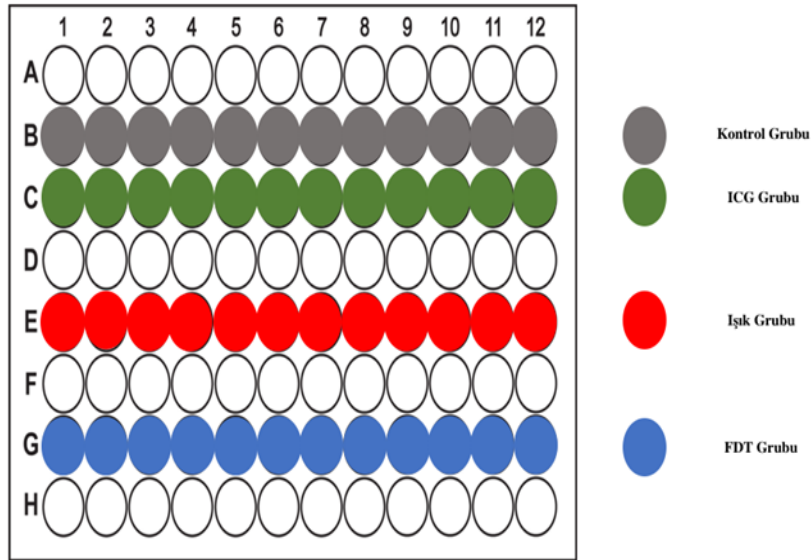
3.4. FOTODİNAMİK TERAPİ UYGULAMA PROTOKÜLÜ

FDT uygulamaları optimizasyon deneyleri ve ana deney olmak üzere 2 aşama olarak oluşturulmuştur.

3.4.1. Optimizasyon Çalışması

Optimizasyon deneyinde ışınlanma miktarı ile tedavi sonrası bekleme süresi araştırılmıştır ve sonuçlar 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) sitotoksitite deneyi ile belirlenmiştir. Her aşamada deneyler, MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatları için 3 paralelli ve kendi içerisinde 8 tekrarlı olarak yapılmıştır. Her uygulama için deneyler 4 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir.

1. Kontrol Grubu: Yalnızca hücre, ICG ve lazer uygulanmamıştır.
2. ICG Grubu: Hücelere yalnızca ICG uygulanmış, lazer uygulanmamıştır.
3. Işık Grubu: Hücelere yalnızca lazer uygulanmış, ICG uygulanmamıştır.
4. FDT Grubu: Hücelere ICG ve lazer uygulanmıştır.



Şekil 3.2: Optimizasyon deneyi 96 kuyucuklu plaka dizaynı.

Grupların 96 kuyucuklu plaka üzerindeki yerleşimi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

100 µg/mL ICG'nin hücreler ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası, 1. ve 2. enerji yoğunluğundaki lazer uygulamaları yapılmıştır. 1. ışınlanma miktarı (radiant exposure) olarak 100 j/cm² ve 2. ışınlanma miktarı 200 j/cm²'dir. Tedavi sonunda bekleme süresi olarak 0, 24, 48 ve 72 saat denenmiş ve daha sonra WST-1 canlılık testi ile uygulanarak sonuçlar analiz edilmiştir.

Optimizasyon çalışması 12 farklı uygulama üzerinden tasarlanmıştır. Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de uygulamalar ve numaralandırılmaları verilmiştir.

1. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 2. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 3. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 4. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır.

5. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 6. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 7. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 8. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır.

Tablo 3.2: MIA PaCa-2 hücre hattı optimizasyon deneyi uygulamaları.

Tedavi Sonrası Bekleme Süresi (Saat)	Işınlanma Miktarı	
	100 j/cm ²	200 j/cm ²
0	Uygulama 1	Uygulama 5
24	Uygulama 2	Uygulama 6
48	Uygulama 3	Uygulama 7
72	Uygulama 4	Uygulama 8

9. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 10. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 11. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 12. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır.

13. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 14. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 15. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır. 16. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır.

Tablo 3.3: MRC-5 hücre hattı optimizasyon deneyi uygulamaları.

Tedavi Sonrası Bekleme Süresi (Saat)	Işınlanma Miktarı	
	100 j/cm ²	200 j/cm ²
0	Uygulama 9	Uygulama 13
24	Uygulama 10	Uygulama 14
48	Uygulama 11	Uygulama 15
72	Uygulama 12	Uygulama 16

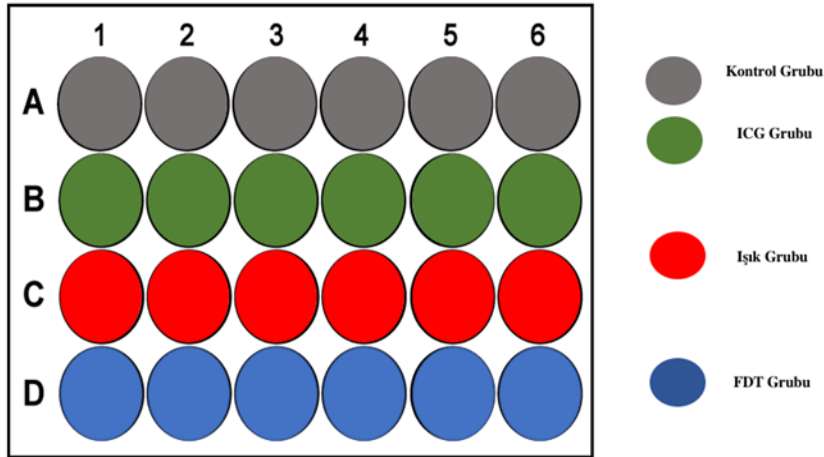
Deney sonunda yapılan WST-1 canlılık testine göre uygulanacak ışınlanma miktarı 100 j/cm², deney sonrası bekleme süresi 48 saat olarak belirlenmiştir.

3.4.2. Ana Çalışma

Ana çalışmada, optimizasyonu yapılan ICG konsantrasyonu, ışınlanma miktarı ve tedavi sonrası bekleme süresi ile FDT uygulamaları yapılarak hücre ölüm şekillerini araştırılmıştır. Deneyler, MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatları için, 4 ayrı grup oluşturularak yapılmıştır. Her deney 3 paralelli ve kendi içerisinde 8 tekrarlı olarak yapılmıştır.

1. Kontrol Grubu: Yalnızca hücre, ICG ve lazer uygulanmamıştır.
2. ICG Grubu: Hücrelere yalnızca ICG uygulanmış, lazer uygulanmamıştır.
3. Işık Grubu: Hücrelere yalnızca lazer uygulanmış, ICG uygulanmamıştır.
4. FDT Grubu: Hücrelere ICG ve lazer uygulanmıştır.

Grupların 24 kuyucuklu plaka üzerindeki dizaynı Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: 24 kuyucuklu plaka ana deney dizaynı.

Ana deneylerde kullanılan ICG konsantrasyonu 100 µg/mL ve inkübasyon süresi 24 saattir. Lazerin ışınlama miktarı ise 100 j/cm²'dir. Analizler, deney uygulamalarından 48 saat sonra gerçekleştirilmiştir.

Tedavi sonrası hücrelerde tetiklenen doz ve zaman bağımlı apoptozun, kaspaz-3 ve BCA protein aktivitesi Kaspaz-3/BCA kolorimetrik kiti ile yapılmıştır.

Tedavi sonrası hücrelerde tetiklenen doz ve zaman bağımlı apoptozun ve nekrozun kantitatif tayini amacıyla Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi yapılmıştır.

3.5. ANALİZ METOTLARI

3.5.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi

Canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini spektrofotometrik olarak ölçen WST-1 hücre proliferasyon testi (Roche, 11644807001, Almanya) kullanılmıştır. Çalışma prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enziminin test solüsyonunda bulunan tetrazolyum tuzu ile parçalanarak formazan kristalleri üretilmesi sonucu görülen renk değişiminin ELISA ile ya da spektrofotometrik (420-480 nm) olarak ölçülmesine dayanır. Metabolik olarak aktif olan hücre sayının artışı, WST-1 solüsyonunun eklenmesinin ardından oluşacak formazan kristallerinin miktarını artırır. Hücrelerdeki formazan seviyelerinin saptanması ile, hücre sayısı nicel olarak elde edilir.

MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatları üzerinde yapılan optimizasyon deneylerinde, belirlenen gruplara uygulamalar yapılmıştır. Tedavi sonrası bekleme süresi olarak 0, 24, 48, 72 saat sonra, sırasıyla her bir süreye ait plakaya WST-1 testi uygulanmıştır. Ana deney gruplarında ise belirlenen tedavi sonrası bekleme süresi 48 saatin sonunda WST-1 uygulaması yapılmıştır. Uygulama sırasında 96'lık plakalara, her bir kuyuya 10 µg/kuyucuk WST-1 çözeltisi eklenerek 37°C' de, %5 CO₂' li etüvde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plakalar, 440 nm absorban değeri altındaki ölçüm değerleri, 630 nm referans dalga boyunda ELISA (Thermo Spectrum) ile saptanmıştır. Plakalardaki kontrol grupları, kontrol kuyular olarak kabul edilmiştir. Kontrol kuyuları absorban ölçümleri %100 canlılık olarak kabul edilmiştir ve diğer grupların absorban değerleri buna bağlı elde edilmiştir. Asıl absorban değeri, o gruba ait kuyucukların bütün absorban değerlerinin ortalamasını ile kör absorban değer ortalamasının farkı olarak hesaplanmıştır. Tüm gruplar için asıl absorban değerlerinin ortalamaları alınarak da ortalama absorban değeri bulunmuştur. Ortalama absorban değeri belirlenen gruplar 100 ile çarpılıp, kontrol grubunun ortalama absorban değerine bölünerek kontrol grubuna kıyasla canlılık oranları hesaplanmıştır. Yüzde Canlılık = $[\text{Örnek ABS (Absorbans) ortalama} \times 100] / \text{Kontrol ABS ortalama}$ formülü kullanılmıştır.

3.5.2. Kaspaz-3/BCA Protein Aktivitesi Ölçümü

Ana deney gruplarında uygulamaları takiben hücrelerde tetiklenen apoptozun kaspaz aktivitesini Kaspaz-3 kolorimetrik kiti (BioVision Research Products, Kaliforniya, ABD) ile BCA toplam protein analizi de BCA protein değerlendirme kiti (BioVision Research Products, Kaliforniya, ABD) ile tayin edilmiştir. Apoptoz mekanizmasında rol oynayan ölüm reseptörleri, adaptör proteinleri aktive ederler. Adaptör proteinler ise aldıkları sinyal sonucu kaspazlara bağlanarak onları aktive ederler ve apoptozom oluşumu sağlar. Kaspaz-3, apoptozu yürüten kaspazlar arasında yer alır. Kaspaz aktivitesi, DNAaz aracılığı ile DNA yıkımına neden olur.

Kaspaz-3 kolorimetrik testi, işaretli substrat olan DEVD-pNA'nın, kaspaz-3 aktivitesi sırasında parçalandıktan sonra kromofor p-nitroanilin (pNA)'i spektrofotometrik olarak tayin edilmesine dayanır.

24 kuyucuklu plakaların her kuyucuğunda 1×10^6 hücre yetiştirilmiştir. Sonrasında her bir kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı ependorflara aktarılmış ve 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletler 100 µl liziz çözeltisi ile homojenize edilmiştir ve 10 süresince buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10.000 rpm'de 1 dakika

süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant steril bir ependorfa aktarılarak, tekrar 100 µl liziz tamponu eklenmiştir. Protokolün uygulanışının ardından elde edilen protein örnekleri, her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara aktarılarak üzerlerine 50 µl 2X reaksiyon tamponu eklenmiştir. Kuyucuklara 5 µl Kaspaz-3 substratı eklenerek 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında değerler 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Spectrum) ile ölçülmüştür.

BCA protein analizi için, protokolün uygulanışının ardından, her kuyucuğa 25 µl örnek ve üzerlerine 200 µl BCA çalışma reaktanı 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Plakalar, 37°C'de 30 dakika süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda değerler 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Spectrum) ile ölçülmüştür.

Sonuçlar analiz edilirken Kaspaz-3 protein analizi sonuçları, BCA toplam protein analizi sonuçlarına bölünerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.5.3. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi

Ana deney gruplarında uygulamaları takiben hücrelerde tetiklenen apoptoz ve nekrozun kantitatif tayini Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz kiti (Merck Millipore, MCH100105, Almanya) ile analiz edilmiştir. Normal şartlarda, hücre zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serin fosfolipidi, apoptotik hücrelerde dış yüzeye transloke olmaktadır. Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin dış yüzeylerindeki fosfatidil serin fosfolipidine bağlanmaktadır. FITC, Annexin-V ile bağlanan apoptotik hücrelerde flüoresan (Eksitasyon = 488 nm dalga boyu, Emisyon = 535 nm dalga boyu) ışımaya neden olmaktadır. Nekrotik hücrelerde ise flüoresan bir boya olan propidyum iyodür (PI), zarar görmüş olan hücre zarından geçerek nükleik asitlere bağlanarak flüoresan (Eksitasyon = 488 nm dalga boyu, Emisyon = 562-588 nm dalga boyu) olarak görünür olmaktadır.

24 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğundaki hücrelerin besi ortamları alınarak soğuk fosfat tampon serum (PBS) ile yıkanmıştır ve 1X bağlayıcı tampon içerisinde 1x10⁶ hücre/ml süspanse edilmiştir. 5 ml kültür tüpüne 100 µl solüsyon eklenmiştir. 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI eklenmiştir. Hücreler vorteks edildikten sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Her tüpe 400 µl 1x bağlayıcı çözelti eklenmiştir ve 1 saat içerisinde ölçümleri yapılmıştır. Diyagrama yerleştirme, her bir hücrenin Annexin-V ve PI ışımaya

miktarına göre yapılmıştır. Annexin-V ve PI flüoresan emisyonlarının olmadığı hücreler canlı, Annexin-V ve PI flüoresan emisyonlarının alındığı hücreler geç apoptotik, yalnızca Annexin-V flüoresan emisyonunun alındığı hücreler apoptotik ve yalnızca PI flüoresan emisyonunun alındığı hücreler nekrotik olarak değerlendirilmiştir.

3.6. İSTATİKSEL ANALİZ

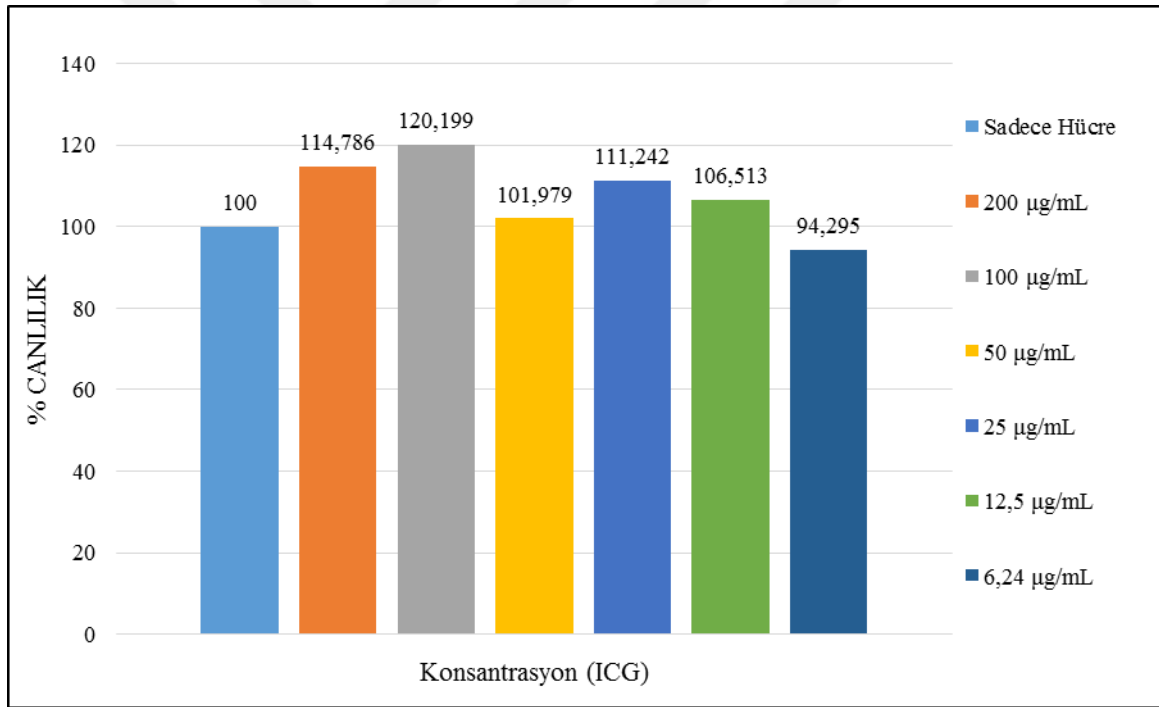
Bütün verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD) programı kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı istatistiksel farklılığın tespiti için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Anlamlılığa sebep olan grubun belirlenmesi için Dunn çoklu karşılaştırma testi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ICG'NİN DOZ BAĞIMLI ETKİSİ

ICG'nin 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL konsantrasyonlarının, 24 saatlik inkübasyonları sonunda, MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için WST-1 testi uygulamıştır (Şekil 4.1).

MIA PaCa-2 hücrelerinde 24 saatlik ICG uygulamasından sonra ICG konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı sonuçları 6,25 µg/mL'de %94,295, 12,5 µg/mL'de %106,51, 25 µg/mL'de %111,242, 50 µg/mL'de %101,98, 100 µg/mL'de %120, 200 µg/mL'de %114,79 olarak hesaplanmıştır (p<0.05).

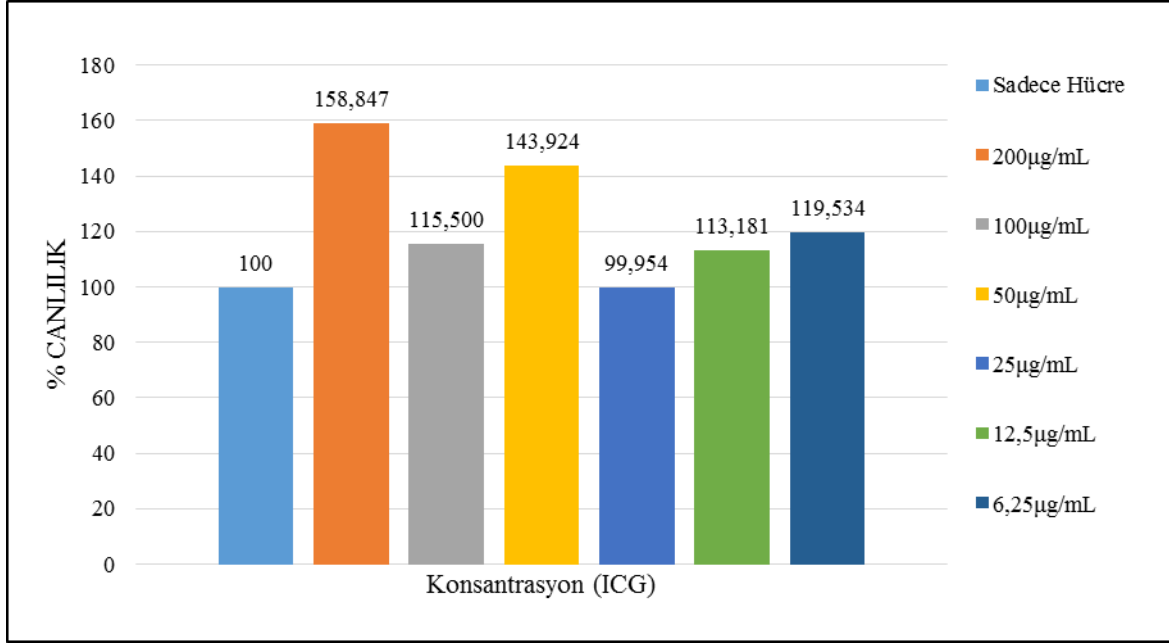


Şekil 4.1: MIA PaCa-2 hücreleri üzerinde ICG konsantrasyonlarının hücre canlılık yüzdeleri.

ICG'nin 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL konsantrasyonlarının, 24 saatlik inkübasyonları sonunda, MRC-5 hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için WST-1 testi uygulamıştır (Şekil 4.2).

MRC-5 hücrelerinde 24 saatlik ICG uygulamasından sonra ICG konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı sonuçları 6,25 µg/mL'de %119,534, 12,5 µg/mL'de %113,181, 25 µg/mL'de %99,954,

50 µg/mL'de %143,924, 100 µg/mL'de %115,500, 200 µg/mL'de %158,847 olarak hesaplanmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.2: MRC-5 hücreleri üzerinde ICG konsantrasyonlarının hücre canlılık yüzdeleri.

ICG'nin 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL konsantrasyonlarının, 24 saatlik inkübasyonları sonunda yapılan canlılık testinin Mia PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatlarına etkileri değerlendirilmiştir. Mia PaCa-2 hücre hattında uygulanan ICG konsantrasyonları arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.1). MRC-5 hücre hattında uygulanan farklı ICG konsantrasyonlarının arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.2). Fotodinamik terapi uygulamalarında kullanılan fotoduyarlı maddelerin, hücreler veya uygulanan canlılar üzerine toksik bir etki göstermemesi beklenir. İki hücre hattında da ICG'nin hücreler üzerine toksik bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu prensip baz alınarak yapılan hesaplamalar ve literatür verileri göz önünde bulundurularak ICG'nin uygulanacak konsantrasyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde toksik etki göstermeyen, canlılığı inhibe etmeyen ve literatüre uyumlu olan 100 µg/mL'dir.

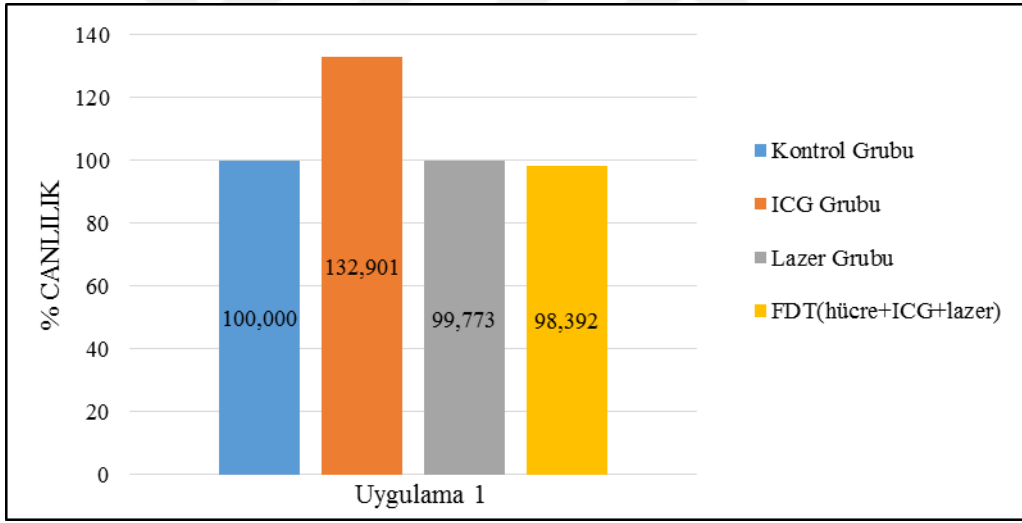
4.2. OPTİMİZASYON DENEY ÇALIŞMASININ SONUÇLARI VE ANALİZİ

4.2.1. MIA PaCa-2 Hücreleri Üzerindeki Optimizasyon Deney Çalışması Sonuçları

Optimizasyon deneyinde ışınlanma miktarı ile tedavi sonrası bekleme süresi WST-1 testi ile belirlenmiştir. ICG, 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat inkübasyon süresi ile uygulanarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

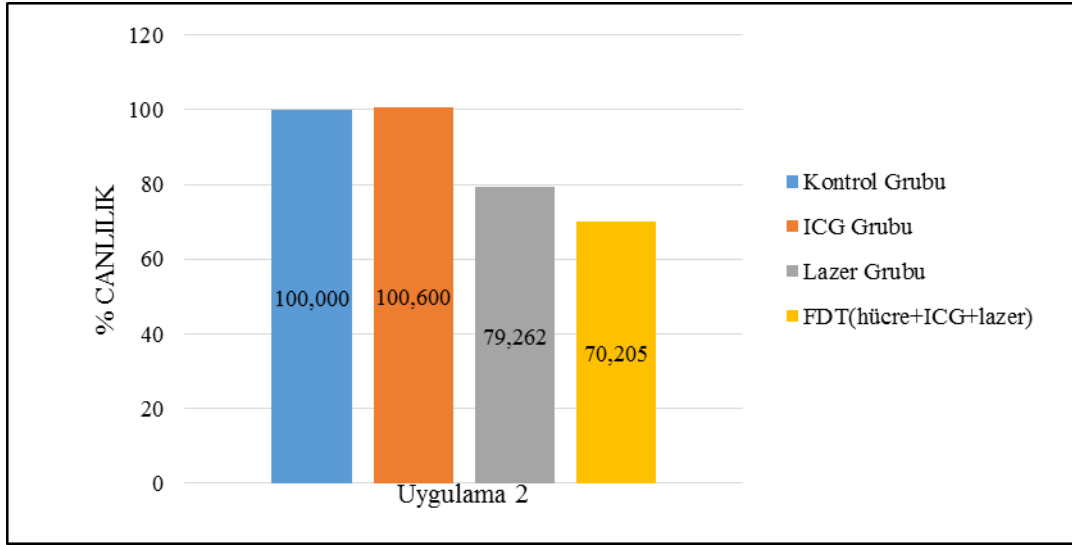
MIA PaCa-2 hücre hattında optimizasyon çalışması 8 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir.

1. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.3). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %132,901, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %99,773, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %98,392'dir.



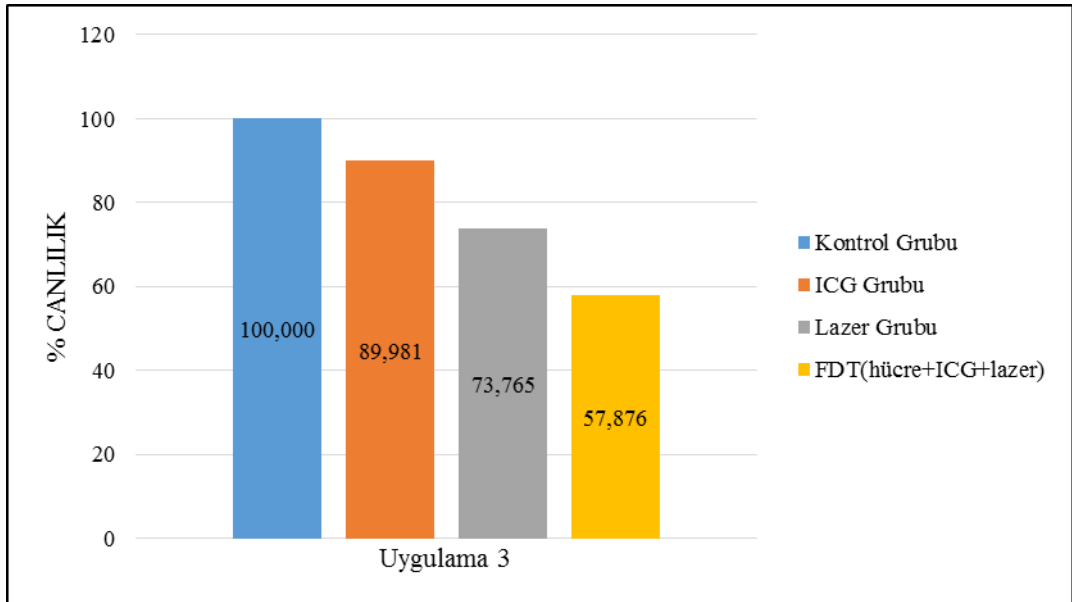
Şekil 4.3: Uygulama 1'e ait yüzde canlılık sonuçları.

2. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.4). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %100,600, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %79,262, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %70,205'dir.



Şekil 4.4: Uygulama 2'ye ait yüzde canlılık sonuçları.

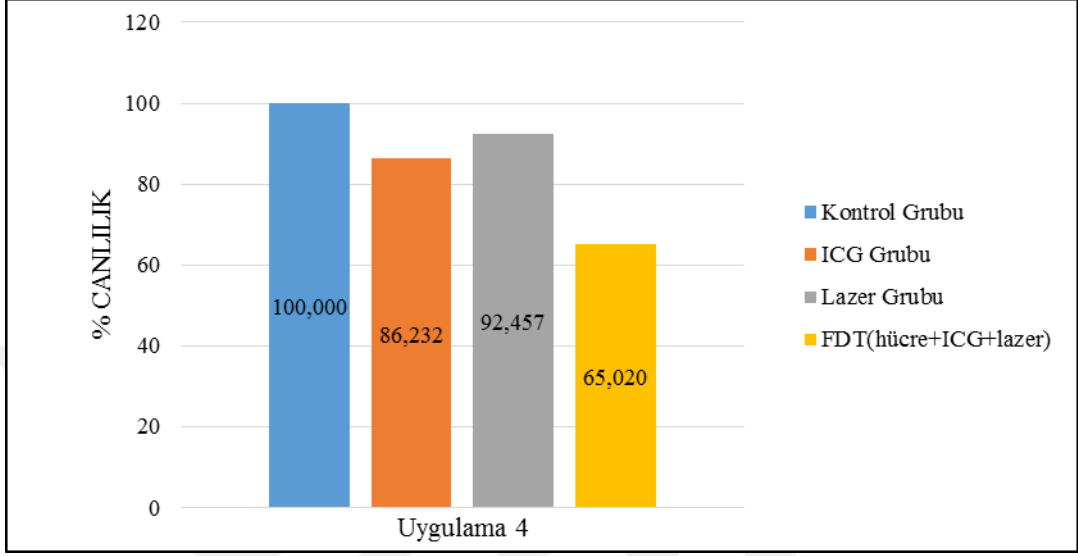
3. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.5). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %89,981, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %73,765, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %57,876'dır.



Şekil 4.5: Uygulama 3'e ait yüzde canlılık sonuçları.

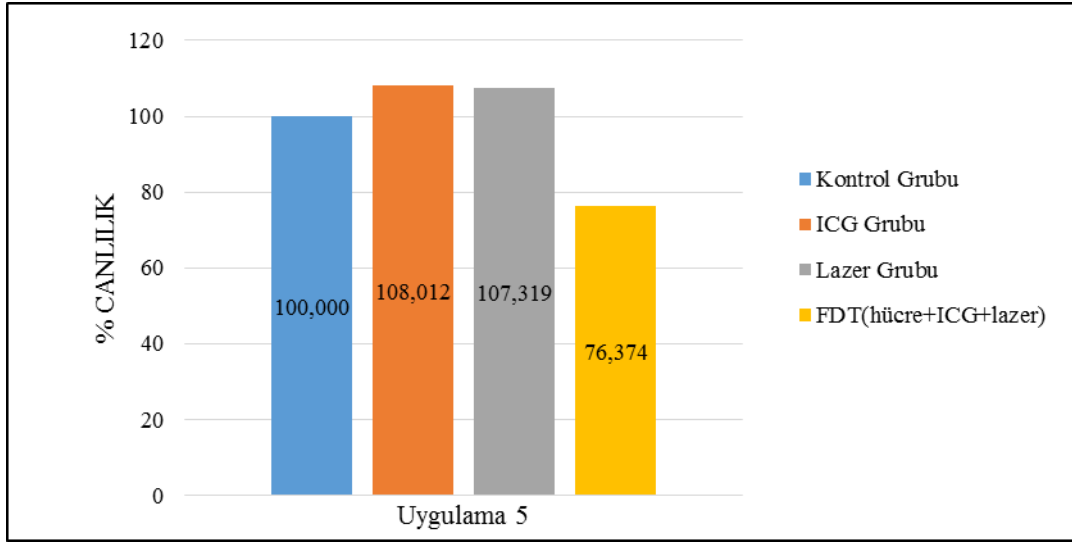
4. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72

saat sonra canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.6). Grublardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %86,232, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %92,457, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %65,020'dir.



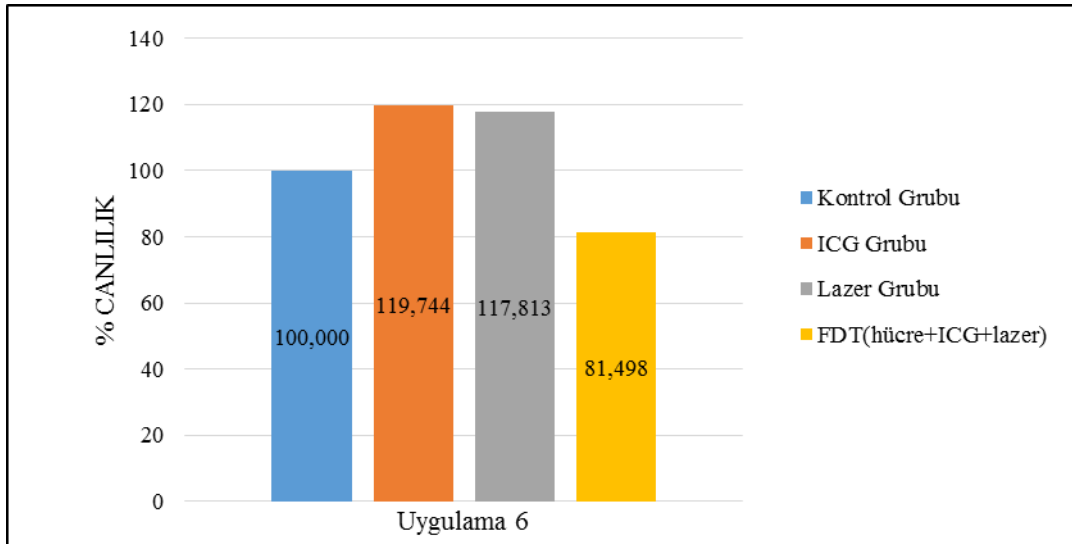
Şekil 4.6: Uygulama 4'e ait yüzde canlılık sonuçları.

5. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.7). Grublardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %108,012, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %107,319, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %76,374' dir.



Şekil 4.7: Uygulama 5'e ait yüzde canlılık sonuçları.

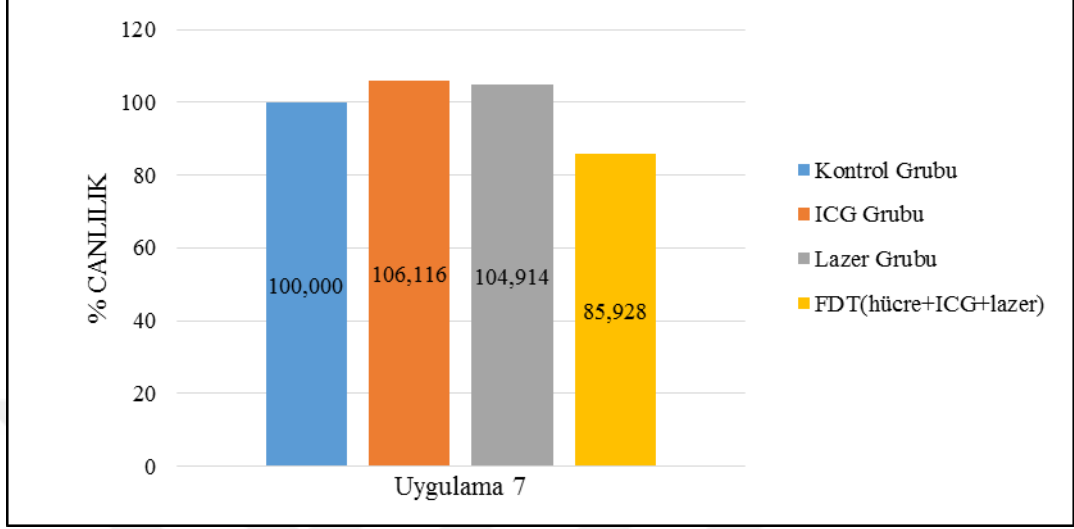
6. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (Şekil 4.8). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %119,744, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %117,813, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %81,498'dir.



Şekil 4.8: Uygulama 6'ya ait yüzde canlılık sonuçları.

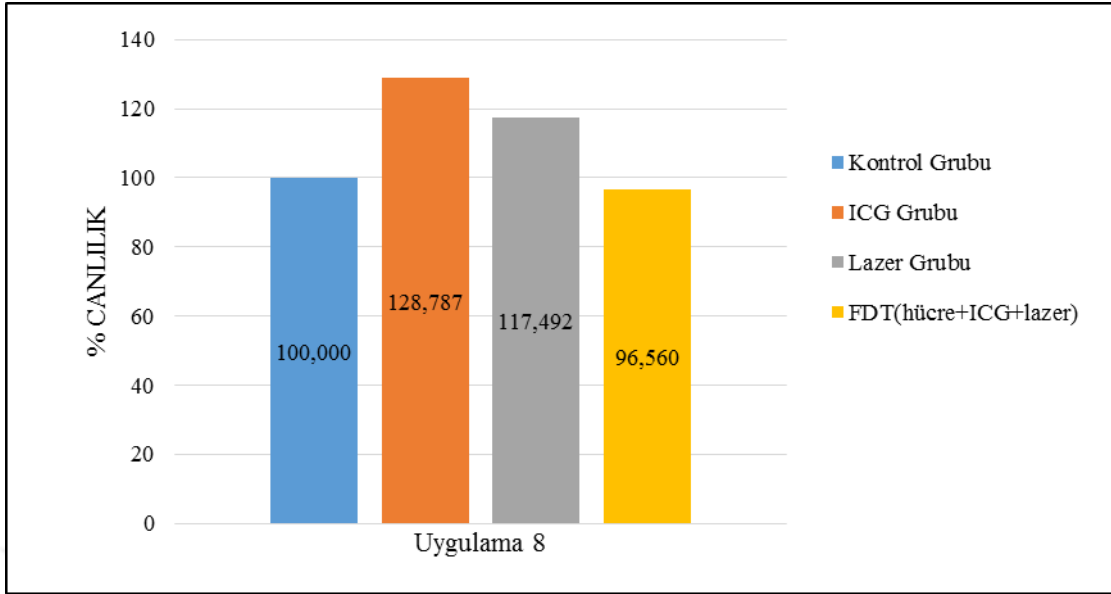
7. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (Şekil 4.9). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda

(sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %106,116, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %104,914, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %85,928'dir.



Şekil 4.9: Uygulama 7'ye ait yüzde canlılık sonuçları.

8. uygulamada, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (Şekil 4.10). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %128,787, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %117,492, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %96,560'dir.



Şekil 4.10: Uygulama 8'e ait yüzde canlılık sonuçları.

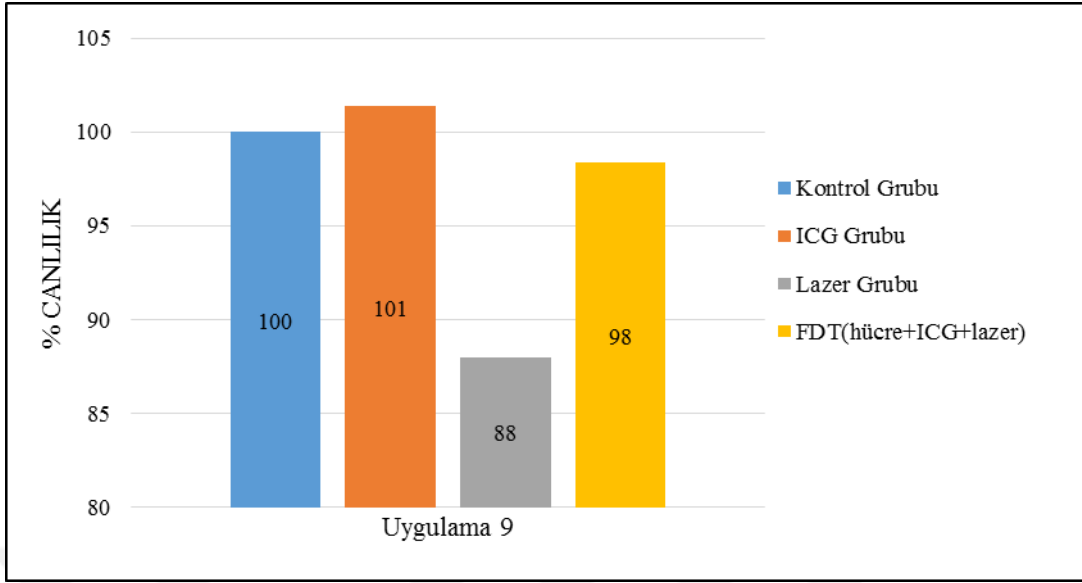
MIA PaCa-2 hücrelerine ait 8 uygulamanın sonuçları üzerinde yapılan çoklu değerlendirme testlerine göre bütün gruplar arasında en anlamlı fark uygulama 3' e ait FDT grubuna aittir. Bu uygulamanın sonuçları baz alınarak ana uygulamalarda kullanılacak parametre olarak 3. Uygulama grubuna ait parametreler seçilmiştir.

4.2.2. MRC-5 Hücreleri Üzerindeki Optimizasyon Deney Çalışması Sonuçları

Optimizasyon deneyinde ışınlanma miktarı ile tedavi sonrası bekleme süresi WST-1 testi ile belirlenmiştir. ICG, 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat inkübasyon süresi ile uygulanarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

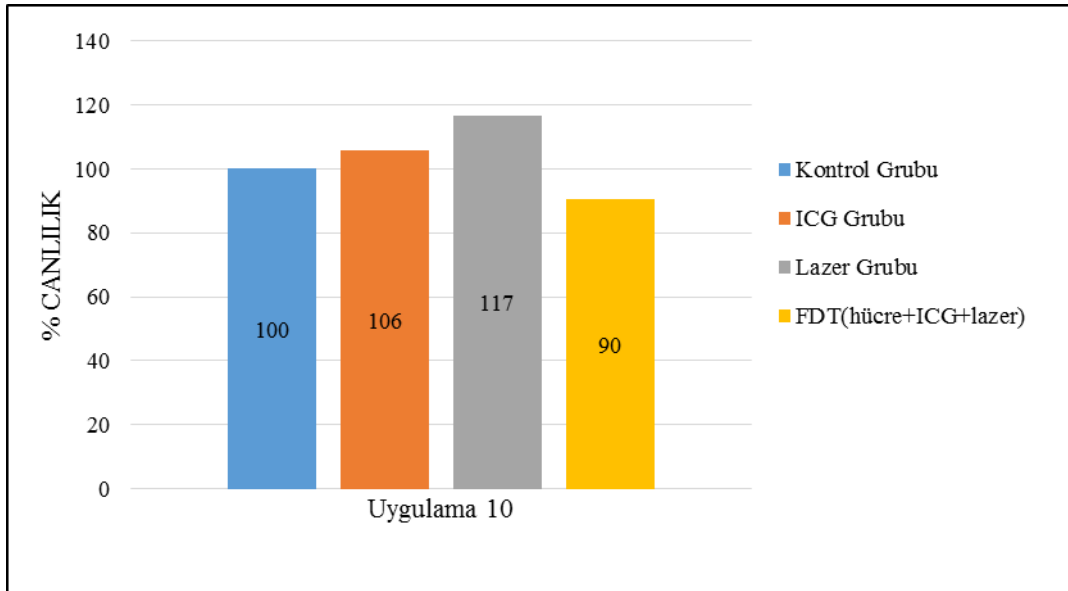
MRC-5 hücre hattında optimizasyon çalışması 8 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir.

9. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.11). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %101, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %88, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %98'dir.



Şekil 4.11: Uygulama 9'a ait yüzde canlılık sonuçları.

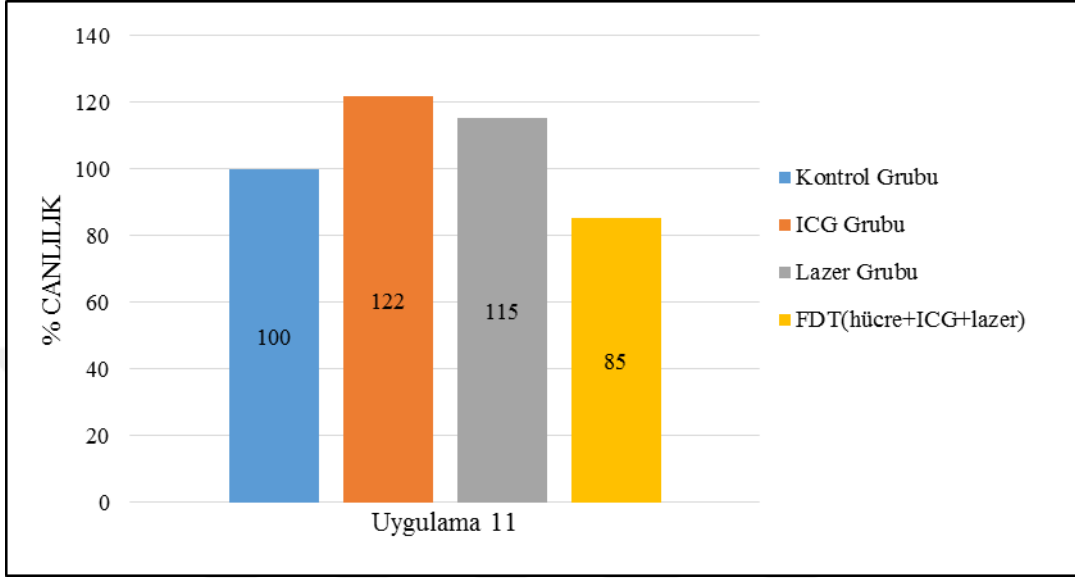
10. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.12). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %106, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %117, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %90'dir.



Şekil 4.12: Uygulama 10'a ait yüzde canlılık sonuçları.

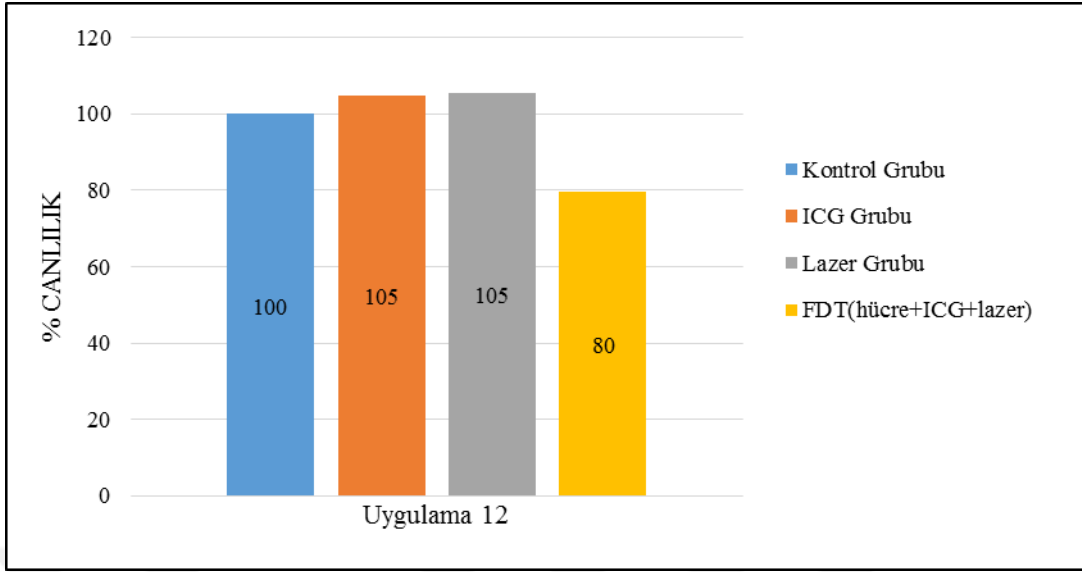
11. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra

canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.13). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %122, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %115, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %85' dir.



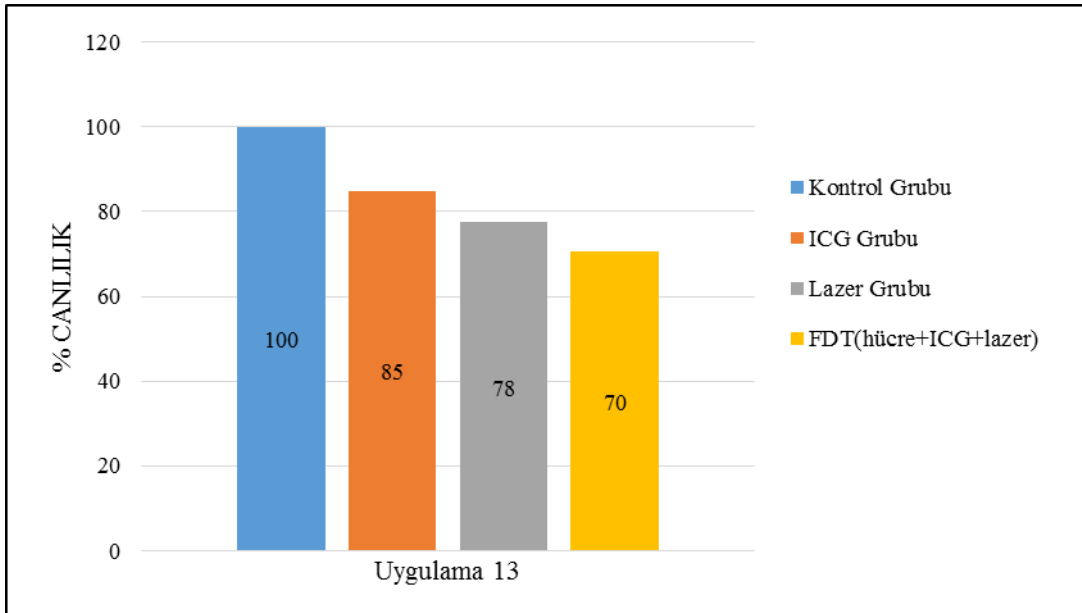
Şekil 4.13: Uygulama 11'e ait yüzde canlılık sonuçları.

12. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.14). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %105, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %105, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %80' dir.



Şekil 4.14: Uygulama 12'ye ait yüzde canlılık sonuçları.

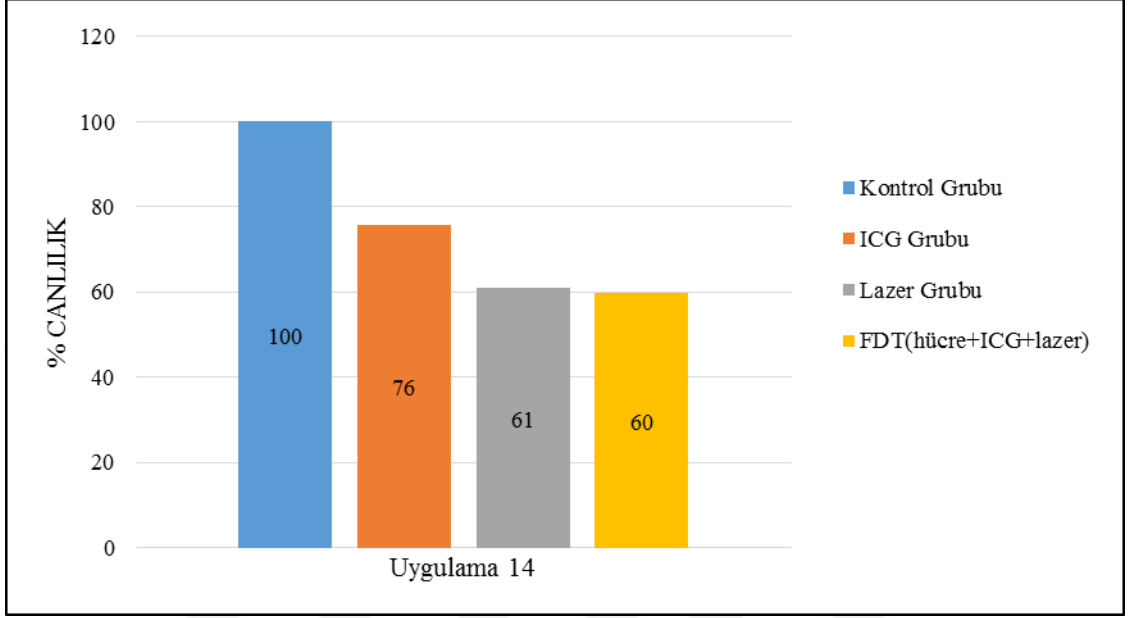
13. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.15). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %85, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %78, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %70'dir.



Şekil 4.15: Uygulama 13'e ait yüzde canlılık sonuçları.

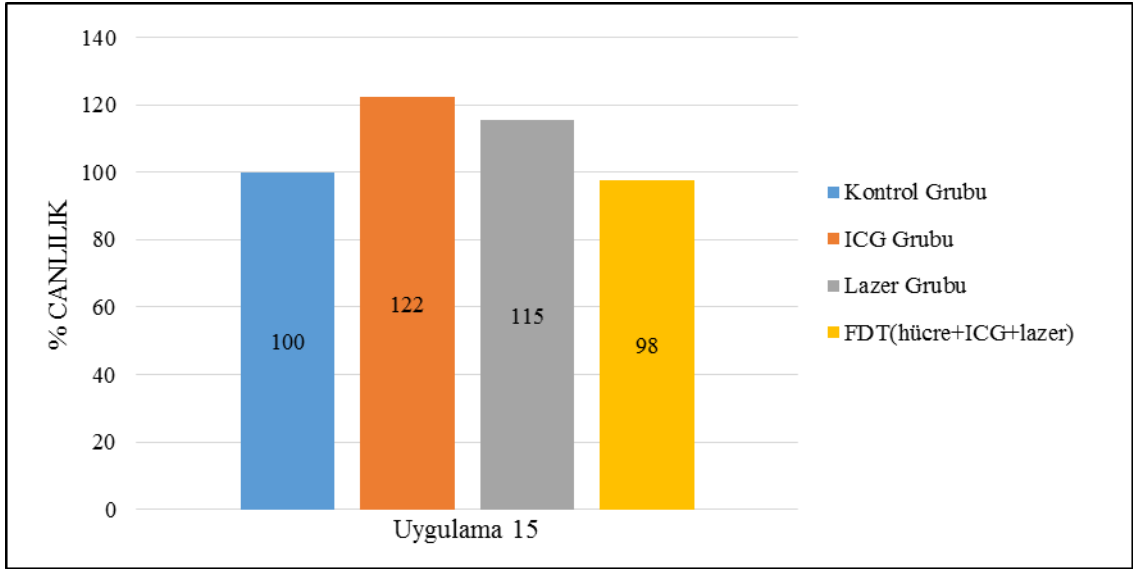
14. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra

canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.16). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %76, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %61, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %60'dir.



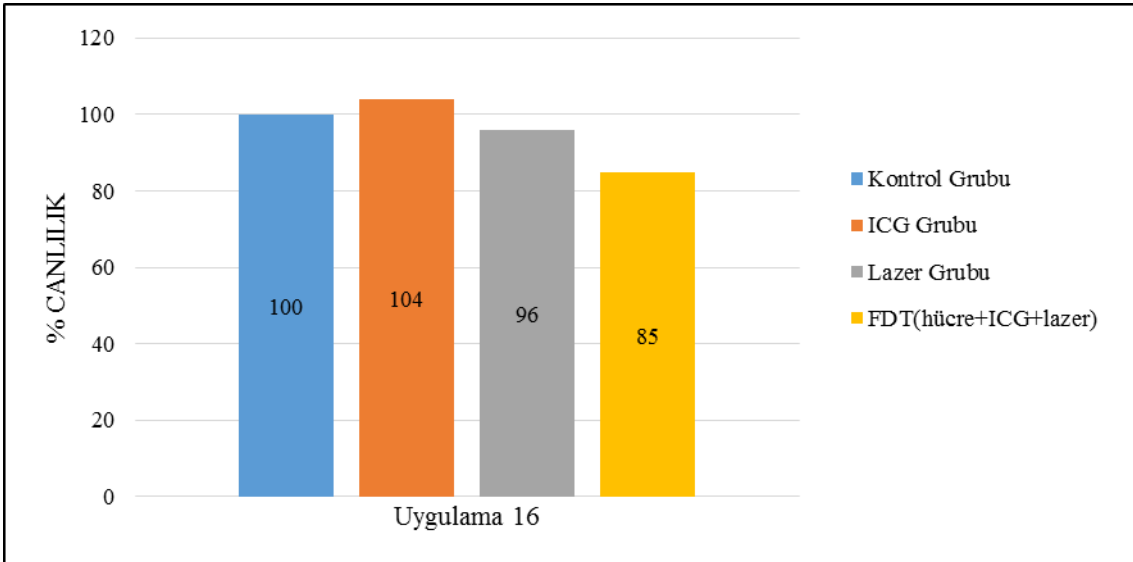
Şekil 4.16: Uygulama 14'e ait yüzde canlılık sonuçları.

15. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.17). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %122, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %115, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %98'dir.



Şekil 4.17: Uygulama 15'e ait yüzde canlılık sonuçları.

16. uygulamada, MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saatlik 100 µg/mL ICG inkübasyonu takiben ilgili gruplara 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (p<0,05) (Şekil 4.18). Gruplardaki canlılık sonuçları, kontrol grubunda (sadece hücre) %100, ICG grubunda (Hücre+ICG) %104, lazer grubunda (Hücre+Lazer) %96, FDT grubunda (Hücre+ICG+Lazer) %85'dir.



Şekil 4.18: Uygulama 16'ya ait yüzde canlılık sonuçları.

MRC-5 hücrelerine ait 8 uygulamanın sonuçları üzerinde yapılan çoklu değerlendirme testlerine göre bütün gruplar arasında en anlamlı fark uygulama 19'a ait FDT grubuna aittir. Normal hücre kontrol grubu olarak kullanılan MRC-5 hücre hattı üzerinde yapılan

uygulamalarda beklenen şekilde MIA PaCa-2 hücrelerinden daha yüksek oranda hücre ölümü görülmemiştir.

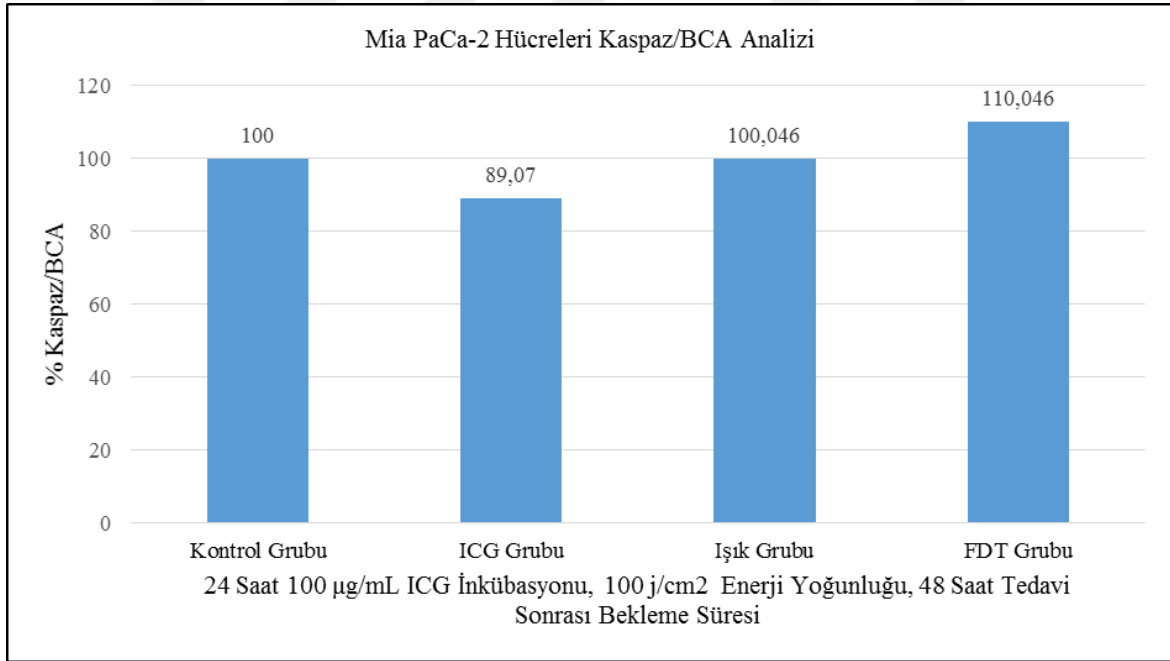
4.3. ANA DENEY ÇALIŞMASININ SONUÇLARI VE ANALİZİ

4.3.1. MIA PaCa-2 Hücreleri Üzerindeki Ana Deney Çalışması Sonuçları

4.3.1.1. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Kaspaz-3/BCA Protein Analizi

Ana deney uygulamasında ICG grubu ve FDT grubu ICG 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat akümülyasyon süresi beklenmiştir. Akümülyasyonu takiben, ışık ve FDT gruplarına 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. FDT uygulamasının ardından bütün gruplar 48 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizine göre, MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol grubunda kaspaz-3/BCA protein aktivitesi %100 kabul edilmiştir. ICG grubunda %89,07, ışık grubunda %100,046 ve FDT grubunda %110,046'dır.

FDT uygulamasının kaspaz-3/BCA protein aktivitesini anlamlı olarak %10,046 arttırdığı gözlenmiştir (p<0,05) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Mia PaCa-2 hücrelerinin Kaspaz-3/BCA protein aktivitesinin analiz sonuçları.

4.3.1.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Annexin-V Analizi

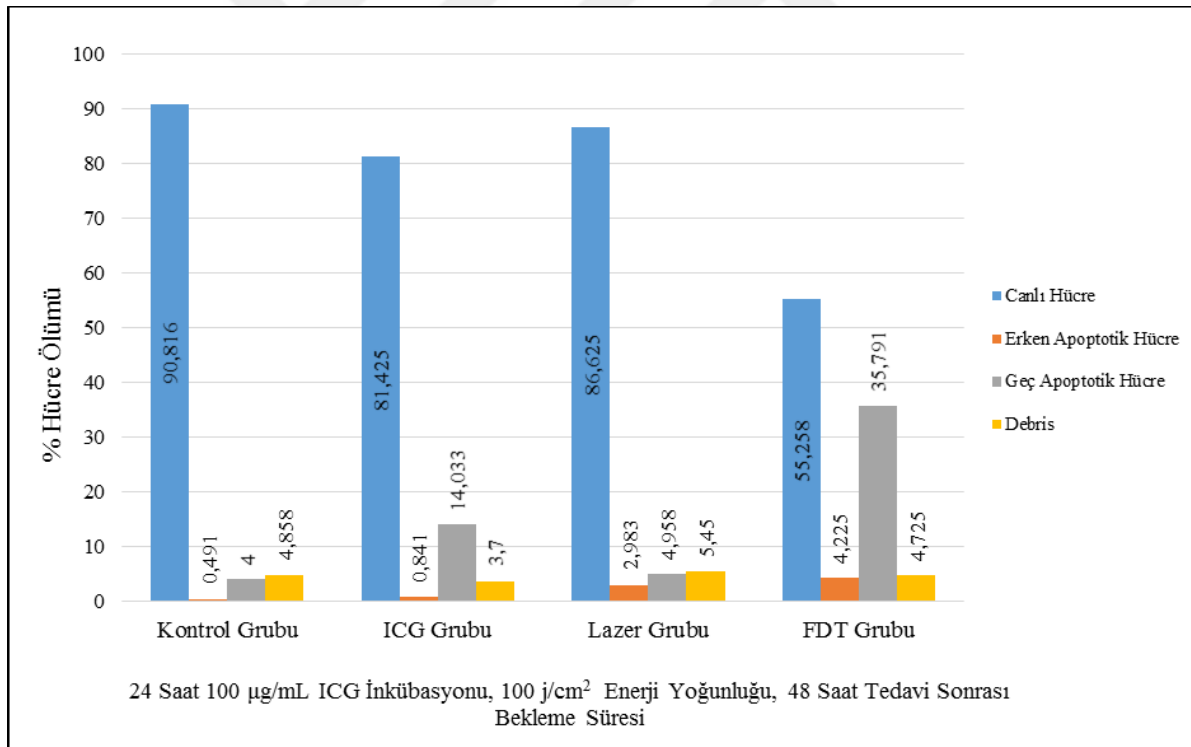
Ana deney uygulamasında ICG grubu ve FDT grubu ICG 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat akümülyasyon süresi beklenmiştir. Akümülyasyonu takiben, ışık ve FDT gruplarına 100 j/cm²

enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. FDT uygulamasının ardından bütün gruplar 48 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın akış sitometri yöntemi ile analiz edilen apoptotik hücre tayinine göre MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol grubunda hücrelerin %90,816'sı canlı, %0,441'i erken apoptotik, %4'ü geç apoptotik, %4,858'i debristir (p<0.05).

ICG grubunda hücrelerin %81,424'i canlı, %0,481'i erken apoptotik, %14,033'ü geç apoptotik, %3,7'si debristir (p<0.05).

Işık grubunda hücrelerin %86,625'i canlı, %2,983'ü erken apoptotik, %4,958'i geç apoptotik, %5,45'i debristir (p<0.05).

FDT grubunda hücrelerin %55,258'i canlı, %4,225'i erken apoptotik, %35,791'i geç apoptotik, %4,725'i hücrenel debristir (p<0.05). FDT grubunda apoptoz oranı %35,525 oranında arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: MIA PaCa-2 hücrelerinin Annexin-V analizi sonuçları.

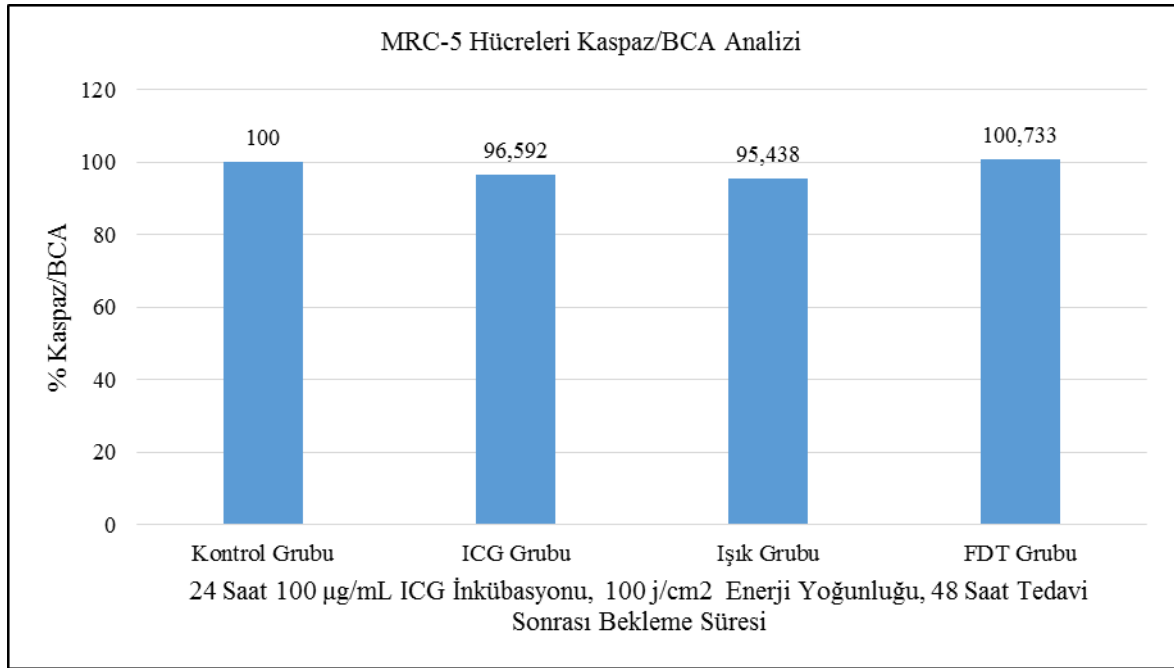
4.3.1. MRC-5 Hücreleri Üzerindeki Ana Deney Çalışması Sonuçları

4.3.1.1. MRC-5 Hücrelerinin Kaspaz-3/BCA Analizi

Ana deney uygulamasında ICG grubu ve FDT grubu ICG 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat akümülyasyon süresi beklenmiştir. Akümülyasyonu takiben, ışık ve FDT gruplarına 100 j/cm²

enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. FDT uygulamasının ardından bütün gruplar 48 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizine göre, MRC-5 hücrelerinde kontrol grubunda kaspaz-3/BCA protein aktivitesi %100 kabul edilmiştir. ICG grubunda %96,592, ışık grubunda %95,438 ve FDT grubunda %100,733'dür.

Normal kontrol hücre hattı olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattında anlamlı Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi tespit edilememiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: MRC-5 hücrelerinin Kaspaz-3/BCA protein aktivitesinin analiz sonuçları.

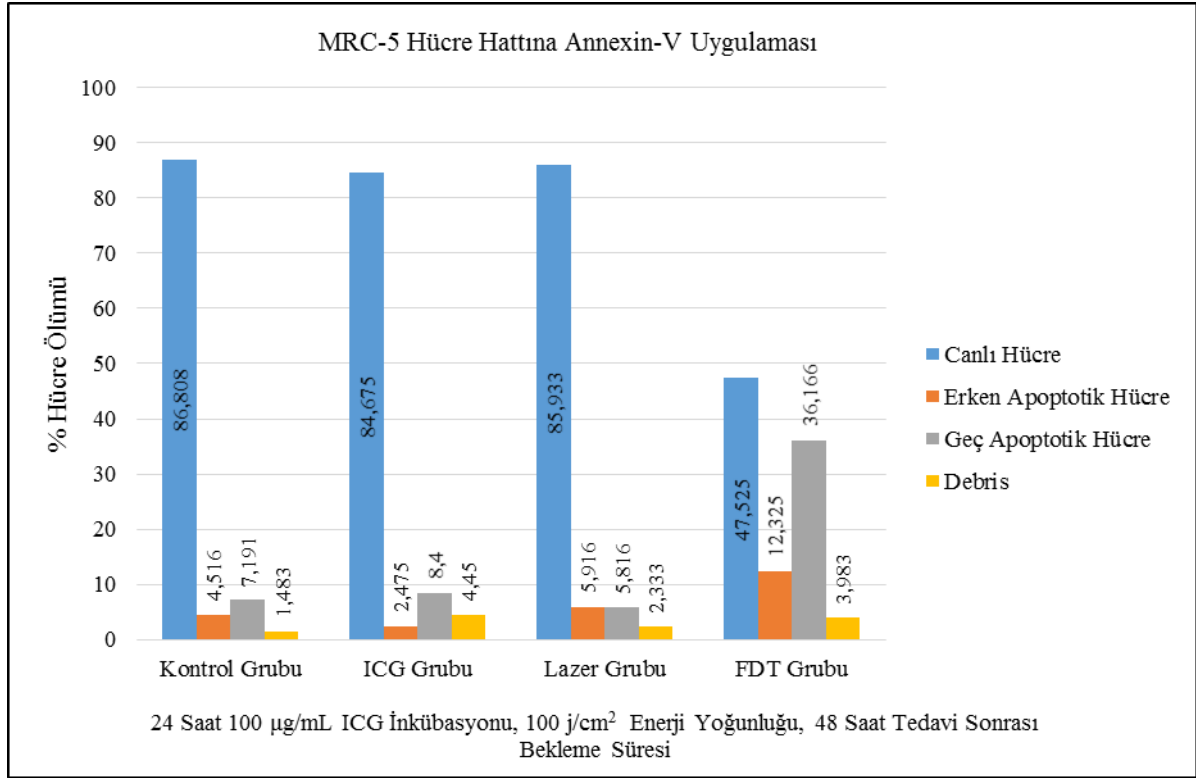
4.3.1.2. MRC-5 Hücrelerinin Annexin-V Analizi

Ana deney uygulamasında ICG grubu ve FDT grubu ICG 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat akümülyasyon süresi beklenmiştir. Akümülyasyonu takiben, ışık ve FDT gruplarına 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. FDT uygulamasının ardından bütün gruplar 48 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın akış sitometri yöntemi ile analiz edilen apoptotik hücre tayinine göre MRC-5 hücrelerinde kontrol grubunda hücrelerin %86,808'i canlı, %4,516'sı erken apoptotik, %7,191'i geç apoptotik, %1,483'ü hücresel debrisdır ($p<0.05$).

ICG grubunda hücrelerin %84,675'i canlı, %2,475'i erken apoptotik, %8,4'ü geç apoptotik, %4,45'i hücresel debrisdır ($p<0.05$).

Işık grubunda hücrelerin %85,933'ü canlı, %5,916'sı erken apoptotik, %5,816'sı geç apoptotik, %2,33'ü hücresel debristir ($p < 0.05$).

FDT grubunda hücrelerin %47,525'i canlı, %12,325'i erken apoptotik, %36,166'sı geç apoptotik, %3,983'ü hücresel debristir ($p < 0.05$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: MRC-5 hücrelerinin Annexin-V analizi sonuçları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fotodinamik terapi, ışığa duyarlılığı bir fotoduyarlı madde ile bu maddenin soğurduğu dalga boyunda bir ışık kaynağıyla uyarılarak ROS oluşturulması esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik terapi hücrel, vasküler ve/veya immünolojik olarak etki göstermektedir. Fotodinamik aksiyon ile meydana gelen singlet oksijen hücre içinde apoptoz, nekroz veya otofajiye neden olabilmektedir. Fotoduyarlı madde, fotoduyarlı maddenin konsantrasyonu ve akümüasyonu, kullanılan ışık kaynağı, uygulanan enerji ve uygulama süresi meydana gelecek aksiyon mekanizmasını etkileyen en önemli faktörlerdendir. FDT uygulamalarında etkili olan bir diğer önemli faktör hedef bölgedeki reaktif oksijenin konsantrasyonudur (Wilson ve Patterson, 2008; Bown ve Lovat, 2000; Hooper, 2000; Pass, 1993).

İndosiyanın yeşil, yakın kızılötesi spektrumunda yüksek soğurum kapasitesine sahip bir boyadır. ICG toksitesinin düşük olması, hızlıca vücuttan atılabilmesi ve turbid mediumda en yüksek oranda emilebilen dalga boylarında soğurum yapmasından dolayı diğer fotoduyarlı maddelere oranla daha avantajlıdır. ICG'nin biyolojik dokulardaki penetrasyon derinliği nispeten daha derin tümörlerin FDT ile tedavisinde daha etkili olmasını sağlayabilmektedir (Porcu ve diğ., 2006; Zhao ve diğ., 2014).

Tez çalışması kapsamında yapılan literatür araştırmasında MIA PaCa-2 pankreatik tümör hücreleri ile yapan in vitro FDT çalışmalarında FDT'nin farklı fotoduyarlı maddeler ile etkileri araştırılmıştır.

Liu ve arkadaşları (2000) MIA PaCa-2 ve PANC-1 hücre hatları ile in vitro ve vivo hiperin tabanlı FDT'nin etkisini araştırmışlardır. Sonuçları MTT hücre proliferasyon testi analiz etmişlerdir. İn vitro çalışmalarda FDT'nin istatistiksel olarak canlılığı %66,1 ($p>0,01$) oranında azalttığını bulmuşlardır.

Wang ve arkadaşları 2013 yılında fotofrin tabanlı FDT uygulamasının fotositotoksik etkisini MIA PaCa-2 hücre hattı da dahil olmak üzere 6 farklı insan pankreatik hücre hattında araştırmışlardır. Bütün hücre hatlarında fotofrin tabanlı FDT'nin hücrel canlılığı kuvvetli olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır. Çalışmada fotofrin tabanlı FDT'nin MIA PaCa-2, BxPc-3,

PANC-1 ve MPanc-96 hücre hatları üzerinde, HPAF-II ve PL-45 hücre hatlarına göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Sheng ve arkadaşları (2017), MIA PaCa-2 hücre hattında fotoduyarlı madde olarak polimer nanopartiküllerle kaplanmış CaO_2 ' i kullanarak FDT'nin etkisini in vivo olarak araştırmışlardır. Polimerle kaplanmış CaO_2 NP'ün ortamın oksijen seviyesini arttırarak ROS oluşumunu arttırdığı ve FDT'nin yüksek oranda tümör baskılayıcı etki gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Jalde ve arkadaşları (2018) kurkumin konjuge ettikleri klorin e6 tabanlı FDT'nin MIA PaCa-2, PANC-1 ve AsPC-1 pankreatik hücre hatlarında etkisini araştırmışlardır. Oluşturdukları fotoduyarlı madde ile hücre sel canlılığı yüksek oradan inhibe etmişler ve tedavinin antiapoptotik protein markerı olan BAX'ın regülasyonunu önlediğini, kaspaz aktivasyonuna neden olarak apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir.

Literatürde pankreas kanserleri üzerinde ICG tabanlı fotodinamik terapi araştırmalarının eksikliği tespit edilmiş ve çalışma planlanmıştır. Literatür çalışmasında Tseng ve arkadaşlarının 2003 yılında insan pankreas tümör hücreleri üzerinde ICG tabanlı FDT'nin etkilerini araştırdıkları tespit edilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar FDT uygulamalarının yalnızca hücre canlılığı üzerine etkisini araştırmışlardır. ICG tabanlı FDT'nin Pankreatik adenomkarsinom hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bu etkinin ICG veya kullandıkları yakın kızılötesi ışıktan kaynaklanmadığını, FDT'nin etkisinin fotoduyarlı madde konsantrasyonuna ve ışığa miktarına bağlı olarak değişim gösterdiğini kaydetmişlerdir.

2014 yılında Zhao ve arkadaşları insan pankreas adenokarsinom hücreleri üzerinde in vitro ve in vivo olarak lipit polimer nanopartikül ile kaplanmış ICG tabanlı FDT uygulaması yapmışlardır. Çalışma sonucunda, FDT'nin in vitro deneylerde fototermal etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Lipit polimer nanopartikül ile kaplanan ICG tabanlı FDT'nin tümör büyümesini baskıladığını kaydetmişlerdir.

ICG tabanlı FDT'nin etkisinin hücre canlılığı inhibisyon yöntemini belirlemek etmek amacıyla apoptoz ve nekroz tayini yapılan çalışma tespit edilememiştir.

Tez çalışması optimizasyon ve ana deneyler olmak üzere iki esas bölümden oluşmaktadır. Optimizasyon deneyleri ve ana deneylerin öncesinde ICG'nin MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücrelerinin canlılığı üzerine doz bağımlı etkisi araştırılmıştır. ICG'nin 6,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL olmak üzere 6 farklı konsantrasyonu belirlenmiştir. Akümülyasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiş ve ICG'nin canlılık üzerine doz bağımlı etkisi tespit edilmiştir. Bu çalışma ile FDT uygulamaları sonrasında tespit edilen hücresel proliferasyon inhibisyonuna tek başına neden olmaması için ICG'nin pankreas kanser hücrelerine üzerine toksik etki göstermeyen konsantrasyonu belirlenmiştir.

MIA PaCa-2 insan pankreas kanser hücrelerine uygulanan 6,5 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL ICG uygulamalarında canlılık sonuçları WST-1 testi ile analiz edilmiştir. 24 saat inkübasyon ile ICG hücrelerin canlılığı 6,5 µg/mL konsantrasyonda %94,295 olarak, 12,5 µg/mL konsantrasyonda %106,5 olarak, 25 µg/mL konsantrasyonda %111,242 olarak, 50 µg/mL konsantrasyonda %101,98 olarak, 100 µg/mL konsantrasyonda %120 olarak, 200 µg/mL konsantrasyonda %114,79 olarak belirlenmiştir.

Kontrol olarak MRC-5 normal insan akciğer hücrelerine uygulanan 6,5 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL ICG uygulamalarında canlılık sonuçları WST-1 testi ile analiz edilmiştir. 24 saat inkübasyon ile ICG hücrelerin canlılığı 6,5 µg/mL konsantrasyonda %119,534 olarak, 12,5 µg/mL konsantrasyonda %113,181 olarak, 25 µg/mL konsantrasyonda %99,954 olarak, 50 µg/mL konsantrasyonda %143,924 olarak, 100 µg/mL konsantrasyonda %115,500 olarak, 200 µg/mL konsantrasyonda %158, 847 olarak belirlenmiştir.

MIAPaCa-2 pankreas kanser hücrelerinde canlılık üzerine toksik etki göstermeyen ICG konsantrasyonu olarak 100 µg/mL tayin edilmiştir. Optimizasyon ve ana deneylerde 100 µg/mL konsantrasyonda ICG kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarında 100 µg/mL konsantrasyonda ICG, 24 saat akümülyasyon süresi ile hücrelere uygulanmıştır. FDT uygulamalarında hücrelere uygulanmak üzere 100 j/cm² ve 200 j/cm² olmak üzere 2 farklı parametre ışınlanma miktarı olarak çalışılmıştır. FDT sonrası bekleme süresi olarak 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat olarak 4 farklı zaman parametresi belirlenmiştir. Bu parametreler ile optimizasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Canlılık sonuçları WST-1 hücre proliferasyon testi ile analiz edilmiştir.

Optimizasyon deneyinde 3.4.1'de izah edildiği üzerine deneyler MIAPaCa-2 hücre hattında 8 farklı grup ve MRC-5 hücre hattında 8 farklı grup olarak 16 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir.

1 ila 8 arasındaki gruplar MIA PaCA-2 hücrelerine ait uygulamalardır. 1 ila 4 arasındaki gruplarda 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulaması yapılmıştır. 5 ila 8 arasındaki gruplara 200 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulaması yapılmıştır.

9 ila 16 arasındaki gruplar MRC-5 hücrelerine ait uygulamalardır. 9 ila 12 arasındaki gruplarda uygulamalar 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer yoğunluğu ile yapılmıştır. 13 ila 16 arasındaki gruplarda uygulamalar 200 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer yoğunluğu ile yapılmıştır.

1. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili kuyucuklarına ICG akümülyasyonunu takiben 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır ($p < 0,05$). Tedaviden hemen sonra yapılan canlılık analizinde FDT'nin canlılığı %98,392'ye indirdiği kaydedilmiştir. ICG ve lazer grubunun hücresel canlılığı ise %132,901 ve %99,773'dir. ICG ve lazerin hücrelere toksik bir etki göstermediği görülmektedir. FDT uygulamasının canlılığı %1,608 düşürmesinden enerji yoğunluğunun yeterli olmaması veya fotodinamik aksiyonun henüz gerçekleşmediği, tedavi sonrası bekleme süresi olarak 0 saatin yeterli olmadığı anlaşılmaktadır

2. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili kuyucuklarına ICG akümülyasyonunu takiben 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır ($p < 0,05$). FDT uygulamasının canlılığı %70,205'e indirdiği kaydedilmiştir. ICG ve lazer gruplarında canlılık %100,600 ve %79,262'dir. ICG'nin ve lazerin tek başına hücreler üzerinde toksik bir etki göstermediği anlaşılmaktadır. 24 saatlik tedavi sonrası bekleme süresinin fotodinamik aksiyonun gerçekleşmesinde, 0 saate oranla daha etkili olduğu kaydedilmiştir ($p < 0,05$). FDT'nin 100 j/cm^2 ışınlanma miktarı ve 24 saat tedavi sonrası bekleme süresi ile daha başarılı olduğu anlaşılmıştır.

3. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili kuyucuklarına ICG akümülyasyonunu takiben 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır ($p < 0,05$). FDT uygulamasını hücresel canlılığı %57,876'ye indirmiştir. ICG ve lazer gruplarında canlılık %89,981 ve %73,765'tir. ICG ve lazerin tek başına toksik etki göstermedikleri anlaşılmaktadır. FDT uygulamasının canlılığı %42,124 düşürmesi fotodinamik aksiyonun başarılı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Optimizasyon çalışmaları arasında etkili FDT uygulamasının 100 j/cm^2 ışınlanma miktarı ve 48 saat tedavi bekleme süresi ile yapılan çalışma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

4. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili kuyucuklarına ICG akümülyasyonunu takiben 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır (p<0,05). FDT uygulamasını hücreyel canlılığı %65,020'ye indirmiştir. ICG ve lazer gruplarında hücreyel canlılık %86,232 ve %92,457'dir. Hücreyel canlılık sonuçlarına göre, ICG ve lazer tek başına hücreler üzerine toksik etki göstermemişlerdir. FDT uygulaması hücreyel canlılığı %34,98 azalmıştır.

5. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarında 24 saatlik ICG akümülyasyonunu takiben 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 0 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır (p<0,05). FDT uygulamasını sonrası canlılık %76,374'dür. ICG ve lazer uygulama gruplarında canlılık %108,012 ve %107,319'dur. ICG ve lazer uygulamalarının tek başına toksik etkilerinin olmadığı gösterilmiştir. FDT uygulamasının canlılığı %23,626 düşürdüğü tespit edilmiştir.

6. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarında 24 saatlik ICG akümülyasyonunu takiben 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 24 saat sonra WST-1 analizi gerçekleştirilmiştir (p<0,05). FDT uygulanan hücrelerin canlılıklarını %81,498'dir. ICG ve lazer gruplarında canlılık %119,744 ve %117,914 olduğundan, ICG ve lazerin tek başına toksik etki göstermediği ortaya konmuştur.

7. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarında 24 saatlik ICG akümülyasyonunu takiben 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 48 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır (p<0,05). FDT uygulanan kuyucuklarda hücreyel canlılık %85,928'tir. ICG ve lazer gruplarında yalnız ICG ve lazer uygulamaları toksik bir etki göstermemiş ve canlılık %106,116 ve %104,914 olarak bulunmuştur.

8. grupta, MIA PaCa-2 hücrelerinin ilgili gruplarında 24 saatlik ICG akümülyasyonunu takiben 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır ve 72 saat sonra WST-1 canlılık testi uygulanmıştır (p<0,05). FDT uygulaması yapılan hücrelerin canlılığı %96,560'tır. ICG ve lazer gruplarında, ICG ve lazer toksik bir etki göstermemiş ve hücreyel canlılıklar %128,787 ve %117,492 olarak kaydedilmiştir.

5 ila 8 gruplardaki. FDT uygulamalarında, 200 j/cm² yoğunluktaki lazerin tedavi sonrası bekleme süreleri arttıka hücreyel proliferasyonu inhibisyonun azaldığı görülmüştür. Bu durumun, birim zamanda birim alana etki eden ışıktaki foton miktarının artmasının hücrelerde

difüzyonun artması nedeniyle hipoksitenin meydana gelmesine neden olduğu için gerçekleştiği ön görülmektedir. Ortamdaki oksijen miktarının düşüklüğü meydana gelecek fotodinamik aksiyonların etkisi kısıtlamaktadır (Henderson, et al., 2006; Henderson & Dougherty, 1992; Guo, et al., 2015). Bu nedenle 200 j/cm² yoğunlukta lazer uygulanan FDT gruplarında hücresel canlılığın yüksek olduğu düşünülmektedir.

MIA PaCa-2 pankreas kanser hattının çalışıldığı 8 uygulama grubunun canlılık analizi sonuçlarına çoklu değerlendirme testine yapılmıştır. En anlamlı farkın 3. grubun FDT uygulamasına ait olduğu tespit edilmiştir. 100 j/cm² yoğunlukta ışınlanmanın yapıldığı fotodinamik tedavinin 48 saat sonrasında hücresel proliferasyon inhibisyonun yüksek olması uygulanacak optimal yoğunluğun 100 j/cm² olduğunu göstermiştir.

MRC-5 normal akciğer hücreleri üzerinde yapılan optimizasyon çalışması 9 ila 16. grupları kapsamaktadır.

9 ila 12. gruplarda MRC-5 hücrelerinin ilgili kuyucuklarına 24 saatlik ICG akümülyasyonunu takiben 100 j/cm² lazer uygulaması yapılmıştır ve canlılık analizi tedaviden sonra sırasıyla 0, 24, 48, 72 saat sonra yapılmıştır (p<0,05). Gruplarda yalnız ICG ve lazer uygulamalarının hücresel canlılık üzerine toksik etki göstermedikleri tespit edilmiştir. 9. grupta, FDT uygulamasında canlılık %98, 10. grupta %90, 11. grupta %85, 12. grupta %80 olarak kaydedilmiştir. Fotoduyarlı maddelerin olması gereken özelliklerinden biri de tümör hücrelerinde seçici olarak birikmesidir (Moor ve diğ., 2003; Luksiene, 2003; Johnson ve Walker, 1999). MRC-5 normal hücre hattında ICG'nin yeterli akümülyasyon sağlamaması nedeniyle fotodinamik aksiyonun, tedavi sonrası bekleme sürelerine bağımlı olmaksızın sınırlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

13 ila 16. Gruplarda MRC-5 hücrelerinin ilgili gruplarına 24 saat ICG akümülyasyonunun ardından 200 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulaması yapılmıştır. Canlılıklar tedavi sonrasında sırasıyla 0, 24, 48, ve 72 saat sonra analiz edilmiştir.

13. grupta, ICG uygulanan grupta canlılık %85, lazer uygulanan grupta %78, FDT grubunda %70'dir (p<0,05). 14. grupta, ICG uygulanan grupta canlılık %76, lazer uygulanan grupta %61, FDT grubunda %60'dir (p<0,05). 15. grupta, ICG uygulanan grupta canlılık %122, lazer uygulanan grupta %115, FDT grubunda %98'dir (p<0,05). 16. grupta, ICG uygulanan grupta canlılık %104, lazer uygulanan grupta %96, FDT grubunda %85'dir (p<0,05).

13, 15 ve 16. gruplarda ICG, lazer ve FDT uygulamalarının hücre canlılığına yüksek toksik etki yapmadığı kaydedilmiştir. 14. grupta uygulanan lazer yoğunluğu ve tedavi sonrası bekleme süresine bağlı olarak canlılık %60'a inmiştir.

MRC-5 normal akciğer hücrelerinin optimizasyon deneylerinin sonuçları çoklu değerlendirme testleri ile değerlendirildiğinde gruplar arasında en anlamlı fark 14. grubun FDT uygulamasıdır. MRC-5 hücre hattı normal hücre kontrol hattı olarak çalışılmıştır. Fotodinamik terapi beklenen şekilde, MRC-5 hücre hattı uygulamalarında MIA PaCa-2 pankreatik tümör hücrelerinden daha anlamlı olarak daha düşük oranda canlılığı azaltmıştır ($p<0,05$).

Optimizasyon deneyleri sonunda FDT uygulamasının en başarılı sonucu elde ettiği parametreler 3. gruba ait 100 j/cm^2 ve tedavi sonrası 48 saat bekleme süresi olduğu belirlenmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerine ait 3. grubun uygulama parametrelerine sahip olan MRC-5 hücrelerine ait 11. grupta ICG, lazer uygulamasının toksite göstermediği gibi, FDT uygulamasının da hücre canlılığının inhibisyonunda nispeten başarılı olmamıştır. Böylece, kullanılacak parametrelerin normal hücrelerde toksik etki göstermediği ortaya konmuştur.

Tez çalışmasının ikinci aşamasını ana deneyler oluşturmaktadır. Ana deney uygulamalarında, optimizasyon deneyleri ile belirlenen parametreler kullanılarak gerçekleştirilen FDT uygulamalarının neden olduğu hücre ölüm tipleri araştırılmıştır. Bu amaçla Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizi ve Annexin-V analizi yapılmıştır.

Ana deney 3.4.2' de açıklandığı gibi MIA PaCa-2 hücre hattında ve MRC-5 hücre hattında ayrı ayrı tasarlanmıştır.

Kaspaz-3/BCA protein analizi, apoptoz sürecindeki en etkili 3 etmenden biri olan ve DNA yıkımına neden olan kaspaz aktivitesinin ölçümü ve BCA protein değerlendirme kiti ile toplam protein ölçümü yapılmıştır. Bu analiz için ilgili gruplara $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ICG yüklenerek 24 saat akümüasyonu sağlanmıştır ve FDT uygulaması için ilgili gruplara 100 j/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. Tedavi sonrasında hücreler 48 saat bekletilmiş ardından kaspaz-3/BCA protein analiz protokolü 3.5.2' de açıklandığı şekilde uygulanmıştır.

MIA PaCa-2 hücrelerine ait analiz sonuçları değerlendirildiğinde, ICG ve lazer grubunda anlamlı bir kaspaz-3/BCA protein aktivitesi artışı kaydedilmemiştir ($p<0,05$). FDT grubunda kaspaz-3/BCA aktivitesi %110,046 olarak ölçülmüştür ($p<0,05$). FDT uygulamasının

hücrelerde kaspaz-3/BCA aktivitesini %10,046 oranında anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir ($p<0,05$).

Normal kontrol hücre hattı olarak kullanılan MRC-5 hücre hattında Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi sonuçları ICG grubunda %96,592, lazer grubunda %95,438 ve FDT grubunda %100,733'dür. Bu sonuçlara göre MRC-5 hücre hattında ICG, lazer ve FDT gruplarında anlamlı bir artış tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Apoptozu başlatan moleküler mekanizmaların aktive ettiği kaspazlar apoptozun ekstresek yolağını tetikler. Kaspaz-3/BCA protein analizi sonucu fotodinamik terapi ile meydana gelen aksiyonun hücreleri apoptoza sürüklediği gösterilmiştir.

Annexin-V analizi, hücrelerde tetiklenen apoptoz ve nekrozun kantitatif olarak tayin eder. Annexin-V kullanılarak ana deney gruplarındaki apoptoz ve nekrozun kantitatif tayini için ilgili deney gruplarına 100 µg/mL konsantrasyonda ICG yüklenerek 24 saat akümüasyonu sağlanmıştır ve FDT uygulaması için ilgili gruplara 100 j/cm² enerji yoğunluğunda lazer uygulanmıştır. Tedaviden 48 saat sonra hücrelere Annexin-V analiz protokolü 3.5.3' te açıklandığı şekilde uygulanmıştır.

MIA PaCa-2 pankreatik tümör hücre gruplarının analiz sonuçlarına göre, ICG grubunda ve lazer grubunda hücrelerin hücre sel canlılık yüksek oradan korunmuştur ($p<0,05$). FDT uygulamasının canlılığı %44,742 oranında düşürdüğü görülmüştür. FDT'den 48 saat sonra hücrelerin %4,225'in erken apoptotik evrede, %35,791'inin de geç apoptotik evrede oldukları %4,725'inin otofaji ya da nekroz ile ölüme sürüklendiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak FDT'nin hücrelerin %40,016'sını apoptoza sürüklediği orta konulmuştur.

MRC-5 normal akciğer hücrelerinde yapılan ana deney uygulamalarının Annexin-V sonuçlarına ICG ve lazer gruplarında canlılık yüksek oranda korunmuştur ($p<0,05$). FDT grubunda ise hücrelerin %47,525'inin canlı olduğu %48,401'inin erken ve geç evrede apoptoza sürüklendiği tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Ana deneylerin analiz sonuçlarına göre pankreatik hücrelerin FDT ile yüksek oranda apoptoz yoluyla ölüme sürüklendikleri görülmüştür. FDT'den 48 saat sonra hücrelerin büyük bir kısmının geç apoptotik evrede oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle fotodinamik aksiyonun ilk hasar bölgesinin mitokondri olduğunu söylemek doğru olacaktır. Fotodinamik stres

uygulandığında mitokondriyal membranının tamamen zarar görerek apoptoik süreci hızlandırdığı bilinmektedir (Oleinick ve diğ., 2002; Kessel ve Reiners, 2007; Buytaert ve diğ., 2007; Wu ve Xing, 2012; Moor, 2000; Henderson ve Dougherty, 1992). Bu nedenle hücrelerin geç apoptotik evde olmaları ICG'nin mitokondri membranında lokalize olmuş olması muhtemeldir.

Sunulan tez çalışmasında, ICG'nin yakın kızılötesi spektrumda dalga boyuna sahip bir lazer kaynağı ile aktivasyonu ile sağlanan fotodinamik terapinin pankreatik adenokarsinom hücrelerine sitotoksik etki etki yaptıkları ve hücreleri yüksek oranda apoptoza sürüklediği gösterilmiştir. Meydana gelen yanıtın fotoduyarlı madde konsantrasyonu ve ışın miktarına bağımlı olduğu gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçları, literatürde mevcut olan ICG tabanlı FDT'nin farklı kanser türlerinde etkileri üzerine yapılan çalışmalara benzer olarak, ICG-FDT'nin pankreas kanser hücrelerinde de hücrel büyüme inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları skuamöz hücreli karsinom ve kolon karsinom hücreleri üzerinde yapılmış olup, ICG-FDT daha düşük konsantrasyonlarda da etkili olmuştur (Abels ve diğ., 2000; Baumler ve diğ., 1999).

Literatürde FDT'nin rezekte edilemeyen pankreatik tümörlerde etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur fakat sınırlı sayıdadır (Selvasekar ve diğ., 2002; Liu ve diğ., 2000). Yapılan çalışmalar FDT'nin displazi/neoplaziye veya ileri palyatif tümörlerin tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir (Korbelik, 1996; Hooper, 2000; Triesscheijn ve diğ., 2006; Sibata ve diğ., 2001). FDT'nin ilk klinik uygulaması olan mTHPC tabanlı uygulama lokal ileri pankreas kanseri hastalarında başarılı sonuçlar vererek umut vermiştir (Bown ve diğ., 2002). Verteporfin[®] tabanlı FDT'nin faz I ve II çalışmaları yapılmış, ileriki aşamaların çalışmaları devam etmektedir (Huggett ve diğ., 2014).

Günümüzde pankreas kanserinin kesin tedavi yöntemi, elimizdeki bilgiler ışığında, yalnızca cerrahidir. Fakat klinikte hastaların %20'sinden daha azı küratif tedavi için uygun olduğundan, hastaların opere edilebilir duruma getirilmesi gereklidir (Siegel ve diğ., 2016; Cid-Arregui ve Juarez, 2015; Ryan ve diğ., 2014). Bu çalışması ile ortaya konan ICG-FDT'nin insan pankreatik adenokarsinom hücrelerinde büyüme apoptotik yol ile inhibisyonuna ICG'nin ve lazerin yalnız uygulamalarında toksiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, ICG-FDT klinik uygulamalar için uygun bir görünüş ortaya koymaktadır. Klinikte, rezekte edilemeyen primer

tümörlerde, metastatik tümörlerde ameliyat esnasında palyatif tedavi seçeneği olarak tercih edilebilir. ICG-FDT'nin klinik etkisinin daha net öngörülmesi için in vivo araştırmalar ve klinik denemeler yapılması gerekmektedir.

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



KAYNAKLAR

- Abels, C., Fickweiler, S., Weiderer, P., Baumler, W., Hofstadter, F., Landthaler, M., & Szeimies, R. (2000). Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Archives of Dermatological Research*, 292, 404-411.
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656-669.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K., Foster, T., Girotti, A., Gollnick, S., Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281.
- Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D., & Somanath, P. (2012). Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy*, 32(12), 1095-1111.
- Allison, R., & Sibata, C. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Phototherapy*, 7(2), 61-75.
- Allison, R., Downie, G., Cuenca, R., Hu, X., Childs, C., & Sibata, C. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27-42.
- Al-Waili, N., Butler, G., Beale, J., Hamilton, R., Lee, B., & Lucas, P. (2005). Hyperbaric oxygen and malignancies: a potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy. *Medical Science Monitor: Internatiol Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 11(9), RA279-289.
- American Cancer Society. (2018). *Treating Pancreatic Cancer*. Şubat 28, 2018 tarihinde <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/treating.html> adresinden alındı
- Anans, S., Ortel, B., Pereira, S., Hasan, T., & Maytin, E. (2012). Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Letters*, 326(1), 8-16.
- Andriulli, A., Festa, V., Botteri, E., Valvano, M., Koch, M., Bassi, C., Sebastiano, P. (2012). Neoadjuvant/preoperative gemcitabine for patient with localized pancreatic cancer: a meta-analysis of prospectine studies. *Annals of Surgical Oncology*, 19(5), 1644-1662.
- Bacellar, I., Tsubone, T., Pavani, C., & Baptista, M. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20523-20559.
- Bacellar, I., Tsubone, T., Pavani, C., & Baptista, M. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20523-20559.
- Baines, C. (2010). Role of the Mitochondrion in Programmed Necrosis. *Frontiers in Physiology*, 1, 156.

- Bardeesy, N., & DePinho, R. (2002, Aralık). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897-909.
- Baumler, W., Abels, C., Karrer, S., Weiss, T., Messmann, H., Landthaler, M., & Szeimies, R. (1999). Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *British Journal of Cancer*, 80(3-4), 360-363.
- Beg, A. (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in Immunology*, 23(11), 509-512.
- Ben-Hur, E., Heldman, E., Crane, S., & Rosenthal, I. (1998). Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: A possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy. *FEBS Letters*, 236(1), 105-108.
- Berg, K., & Moan, J. (1997, 65 3). Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochemistry and Photobiology*, s. 403-409.
- Bown, S., & Lovat, L. (2000). The biology of photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 10, 533-550.
- Bown, S., Rogowska, A., Whitelaw, D., Lees, W., Lowat, L., Ripley, P., Hatfield, A. (2002). Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut*, 50(4), 549-557.
- Bramhall, S., Allum, W., Jones, A., Alwood, A., Cummins, C., & Neoptolemos, J. (1995). Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *British Journal of Cancer*, 82(1), 111-115.
- Brancaleon, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 17(3), 173-186.
- Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T., Hamblin, M., & Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Review*, 34, 643-690.
- Brown, S., Brown, E., & Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology*, 5(8), 497-508.
- Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1776(1), 86-107.
- Campbell, F., & Verbeke, C. (2013). *Pathology of the Pancreas a Practical Approach*. London: Springer-Verlag.
- Canti, G., Lattuada, D., Nicolini, A., Taroni, P., Valentini, G., & Cubeddu, R. (1994). Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anticancer Drugs*, 5(4), 443-447.

- Cantisani, C., Paolino, G., Bottoni, U., & Calvieri, S. (2015). Daylight-Photodynamic Therapy for the treatment of Actinic Keratosis in Different Seasons. *Journal of Drugs in Dermatology*, 14(11), 1349-1353.
- Casas, A., Di Venosa, G., Hasan, T., & Al Batlle. (2011). Mechanism of resistance to photodynamic therapy. *Current Medical Chemisrty*, 18(16), 2486-2515.
- Castano, A., Mroz, P., & Hamblin, M. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6(7), 535-545.
- Castano, P., Demidova, T., & Hamblin MR. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279-293.
- Cauvin, J. (1815). Des Bienfaits de l'insolaiton. Paris, Fransa: Doktora Tezi, Paris Üniversitesi.
- Cecic, I., & Korbelik, M. (2002). Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Letters*, 183(1), 43-51.
- Chen, B., Pogue, B., Hoopes, P., & Hasan, T. (2005). Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *International Journal of Radiotion Oncology, Biology, Physic*, 15(61 (4)), 1216-1226.
- Chen, B., Pogue, B., Hoopes, P., & Hasan, T. (2006). Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 16(4), 279-305.
- Chen, Q., Huang, Z., Chen, H., Shapiro, H., Beckers, J., & Hetzel, F. (2002). Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 76(2), 197-203.
- Chiu, S., Xue, L., Usuda, J., & Oleinick, N. (2003, Ocak 20). Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 89(8), 1590-1597.
- Cho, Y., McQuade, T., Zhang, H., Zhang, J., & Chan, F. (2011). RIP1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in necrosis and T cell activation. *PLoS One*, 6(8), e23209.
- Christofferson, D., Li, Y., Hitomi, J., Zhou, W., Upperman, C., Zhu, H., Yuan, J. (2012). A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF α production. *Cell Death & Disease*, 14(3), e320.
- Cid-Arregui, A., & Juarez, V. (2015). Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World Journal Gastroenterology*, 21(31), 9297-9316.
- Claude, L., & Mornex, F. (2003). Chemoradiation in pancreatic carcinoma. *Cancer Radiotherapy*, 7(4), 254-265.

- Conrad, M., Angeli, J., Vandenabeele, P., & Stockwell, B. (2016). Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Drug Delivery*, 15(5), 348-366.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Mi. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817-1825.
- Crescanzi, E., Varriale, L., Iovivo, M., Chiaviello, A., Veneziani, B., & Palumbo, G. (2004). Photodynamic therapy with indiocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 537-544.
- Cronin-Fenton, D., Erichsen, R., Mortensen, F., Dikinis, S., Norgaard, M., & Jacobsen, J. (2011). Pancreatic cancer survival in central and northern Denmark from 1998 through 2009: a population-based cohort study. *Clinical Epidemiology*, 3(1), 19-25.
- Daniell, M., & Hill, J. (1991). A History of Photodynamic Therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 340-348.
- de Vree, W., Essers, M., de Bruijn, H., Star, W., Koster, J., & Sluiter, W. (1996). Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Research*, 1(56 (13)), 2908-29011.
- Di, X., Zhang, G., Zhang, Y., Takeda, K., Rivera Rosade, L., & Zhang, B. (2013). Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5. *Oncotarget*, 4(9), 1349-1364.
- DiMaio, C. (2015). Pancreatic cysts and tumors. B. E. Sands (Dü.), *Mount sinai expert guides: Gastroenterology* (s. 304-322). John Wiley & Sons.
- Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (2003). Photodynamic Therapy for Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3, 380-387.
- Dougherty, T. (2002). An update on photodynamic therapy applications. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, 20, 3-7.
- Dougherty, T., Gomer, C., Henderson, B., Jori, G., Kessel, D., Korbely, M., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889-905.
- Dougherty, T., Henderson, B., Schwartz, J., & Lipson, R. (1992). Historical Perspective. B. Henderson, & T. Dougherty (Dü) içinde, *Photodynamic Therapy* (s. 1-15). New York: Marcel Dekker.
- Du, L., Defoe, M., Ruzinova, M., Olsen, J., & Wang-Gillam, A. (2015). Perioperative therapy for surgically resectable pancreatic adenocarcinoma. *Hematology/Oncology Clinica of North America*, 29(4), 717-726.

- Ebgelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., & Hazan, R. (2006). Bacterail programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLOS Genetics*, 2(10), e135.
- Eeson, G., Chang, N., McGahan, C., Khurshed, F., Buczkowski, A., Scudamore, C., Chung, S. (2012). Determination of factors predictive of outcome for patients undergoing a pancreaticoduodenectomy of pancreatic head ductal adenocarcinomas. *Journal of The International Hepato Pancreato Biliary Association*, 14(5), 310-316.
- Erental, A., Sharon, I., & Engelberg-Kulka, H. (2012). Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: An apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway. *PLoS Biology*, 10(3), e1001281.
- Erkiert-Polguj, A., Halbina, A., Polak-Pacholezyk, I., & Rotsztejn, H. (2016). Light-emitting diodes in photodynamic therapy in non-melanoma skin cancer-Own observations and literature review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 18(2), 105-110.
- Falasca, M., Kim, M., & Casari, I. (2016). Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochimica et Biophysica, Acta*, 1865(2), 123-132.
- Fingar, V., Kik, P., Haydon, P., Cerrito, P., Tseng, M., Abang, E., & Wieman, T. (1999). Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *British Journal of Cancer*, 79(11-12), 1702-1708.
- Fingar, V., Wieman, T., & Haydon, P. (1997). The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin. *Photochemistry and Photobiology*, 66(4), 513-517.
- Fingar, V., Wieman, T., Park, Y., & Henderson, B. (1992). Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. *Journal of Surgical Research*, 53(5), 524-528.
- Firey, P., & Rodgers, M. (1987). Photo-properties of a silicon naphthalocynaine: a potential photosensitizer for photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 45, 535-538.
- Flandin, I., Mornex, F., Claude, L., Kubas, A., Khodri, M., Wautot, V., Partensky, C. (2004). Chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Radiotherapy*, 8(1), 80-87.
- Foote, C. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, 54(5), 659.
- Foster, T., Primavera, M., Marder, V., Hilf, R., & Sporn, L. (1991). Photosensitized release of von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Cancer Research*, 51(12), 3261-3266.
- Fox, I., & Wood, E. (1960). Indocyanine Green: physical and physiologic properties. *Proceeding the Staff Meeting. Mayo Clinic*, 38, 732-744.

- Fox, I., Brooker, L., Heseltine, D., Essex, H., & Wood, E. (1956). New dyes for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proceeding Staff of Meeting. Mayo Clinic*, 32(18), 478-484.
- Fuchs, J., & Thiele, J. (1998). The Role of Oxygen in Cutaneous Photodynamic Therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(5), 835-847.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S., Abrams, J., Adam, D., Agostinis, P., Altucci, L. v. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., Malorn. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.
- Garg, A., Maes, H., Romano, E., & Agostinis, P. (2015). Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(8), 1410-1424.
- Garg, A., Nowis, D., Golab, J., & Agostinis, P. (2010). Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis*, 15(9), 1050-1071.
- Garg, A., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D., & Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805(1), 53-71.
- Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J., Pinton, P. (2015). p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1779-1784.
- Giorgi, C., Bonora, M., Missiroli, S., Poletti, F., Ramirez, F., Morciano, G., Pinton, P. (2015). Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling. *Oncotarget*, 30(6(5)), 1435-1445.
- Giraudeau, C., Moussaron, A., Stallivieri, A., Mordon, S., & Frochot, C. (2014). Indocyanine green: photosensitizer or chromophore? Still a debate. *Current Medicinal Chemistry*, 21(16), 1871-1897.
- Gollnick, S., Evans, S., Baumann, H., Owczarczak, B., Maier, P., Vaughan, L., Henderson, B. (2003). Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *British Journal of Cancer*, 2(88 (11)), 1772-1779.
- Gollnick, S., Vaughan, L., & Henderson, B. (2002). Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Research*, 15(62 (6)), 1604-1608.
- Gong, Z., Holly, E., & Bracci, P. (2011). Survival in population-based pancreatic cancer patients: San Francisco Bay area, 1995-1999. *American Journal of Epidemiology*, 174(12), 1373-1381.

- Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Current topics in developmental biology*, 78, 217-245.
- Gray, M., Lipson, L., Maeck, J., Parker, L., & Romeyn, D. (1967). Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 99(6), 776-771.
- Guo, H., Lin, L., Chen, P., Ho, M., Huang, W., Lee, Y., Wang, H. (2015). Low-fluence rate, long duration photodynamic therapy in glioma mouse model using organic light emitting diode (OLED). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(3), 504-510.
- Gülen, M., Akıncı, M., Aşıcı, B., Kocakuşak, A., Kaya, M., & Yücel, A. (2005). *Anrezektabl Periapuller Kanserlerin Cerrahi ve Cerrahi Dışı Yöntemlerle Palpasyonun Karşılaştırılması*. İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Hammel, P., Neuzillet, C., Bendaoud, S., Lekhal, C., de Mestier, L., & Hentic, O. (2015). Pancreatic adenocarcinoma: 10 years of progress. *Bulletin du Cancer*, 102(6), 62-71.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- He, J., Edil, B., Cameron, J., Schulick, R., Hruban, R., Herman, J., Wolfgang, C. (2013). Young patients undergoing resection of pancreatic cancer fare better than their older counterparts. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17(2), 339-344.
- Henderson, B., & Dougherty, T. (1992). How Does Photodynamic Therapy Work? *American Society of Photobiology*, 55(1), 145-157.
- Henderson, B., Busch, T., & Snyder, J. (2006). Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 489-493.
- Hooper, M. (2000). Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncology*, 1(4), 212-219.
- Huang, Z. (2005). A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(3), 283-293.
- Huggett, M., Jermyn, M., Gillams, A., Illing, R., Mosse, S., Novelli, M., Pereira, S. (2014). Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 110(7), 1698-1704.
- Jain, K., Paranandi, K., Sridharan, S., & Basu, A. (2013). Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *American Journal of Cancer Research*, 20(3(3)), 251-265.
- Jalde, S., Chauhan, A., Lee, J., Chaturvedi, P., Park, J., & Kim, Y. (2018). Synthesis of novel Chlorin e6-curcumin conjugates as photosensitizers for photodynamic therapy against pancreatic carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 10(147), 66-76.

- Johnson, D., & Walker, C. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 295-312.
- Juarranz, A., Jaen, P., Sanz-Rodriguez, F., Cuevas, J., & Gonzalez, S. (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148-154.
- Juzeniene, A., Peng, Q., & Moan, J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(12), 1234-1245.
- Kang, R., Zeh, H., Lotze, M., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 571-580.
- Karoumpalis, I., & Christodoulou, D. (2016). Cystic lesions of the pancreas. *Annals Gastroenterology*, 29(2), 155-161.
- Ke, B., Tian, M., Li, J., Liu, B., & He, G. (2016). Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy. *Medicinal Research Review*, 36(6), 983-1035.
- Kessel, D. (2004). Photodynamic Therapy: from the beginning. *Photodiagnosis/Photodynamic Therapy*, 1, 3-5.
- Kessel, D., & Reiners, J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1024-1028.
- Kim, C., Ahmed, S., & Hsueh, E. (2011). Current surgical management of pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(3), 126-135.
- Kinsella, T., Seo, Y., Willis, J., Stellato, T., Siegel, C., Harpp, D., Schulak, J. (2008). The impact of resection margin status and postoperative CA19-9 levels on survival and patterns of recurrence after postoperative high-dose radiotherapy with 5-FU-based concurrent chemotherapy for resectable pancreatic cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 31(5), 446-453.
- Kircher, S., Krantz, S., Nimeiri, H., Mulcahy, M., Munshi, H., & Benson, A. (2011). Therapy of locally advanced pancreatic adenocarcinoma: unresectable and borderline patients. *Expert Review Anticancer Therapy*, 11(10), 1555-1565.
- Konan, Y., Gurny, R., & Allemann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66(2), 89-106.
- Korbelik, M. (1996). Induction of tumour immunity by photodynamic therapy. *Journal of Clinic Laser in Medicine and Surgery*, 14(5), 329-334.
- Korbelik, M., & Sun, J. (2006). Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(8), 900-909.

- Korbelik, M., Sun, J., & Cecic, I. (2005). Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. *Cancer Research*, *1*(65 (3)), 1018-1026.
- Kousis, P., Henderson, B., Maier, P., & Gollnick, S. (2007). Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Research*, *1*(67 (21)), 10501-10510.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Green, D. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differentiation*, *16*(1), 3-11.
- Kros, G., Korbelik, M., & Dougherty, G. (1995). Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, *71*(3), 549-555.
- Krzykawska-Serda, M., Daqbrowski, J., Arnaut, L., Szczygiel, M., Urbanska, K., & Elas, M. (2014). The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, *73*, 239-251.
- Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Bast, R., & Gansler, T. (2003). *Cancer Medicine* (6. Baski). ABD: BC Decker.
- Kuroda, T., Kumagi, T., Yokota, T., Seike, H., Nishiyama, M., Imai, Y., Abe. (2013). Improvement of long-term outcomes in pancreatic cancer and its associated factors within the gemcitabine era; a collaborative retrospective multicenter clinical review of 1,082 patients. *BMC Gastroenterology*, *31*(13), 134-142.
- Kurohane, K., Tominaga, A., Katsuhiko, S., North, J., Namba, Y., & Oku, N. (2001). Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Letter*, *167*(1), 49-56.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differentiation*, *14*(1), 44-55.
- Lee See, K., Forbes, I., & Betts, W. (1984). Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivate. *Photochemistry and Photobiology*, *39*(5), 631-634.
- Legmann, P., Vignaux, O., Dousset, B., Baraza, A., Palazzo, L., Dumontier, I., Bonnin, A. (1998). Pancreatic tumors: comparison of dual-phase helical CT and endoscopic sonography. *American Journal of Roentgenology*, *170*(5), 1315-1322.
- Lemasters, J. (2005). Dying a thousand deaths: Redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*, *129*(1), 351-360.
- Li, X., Gou, S., Liu, Z., Ye, Z., Wang, C. (2018). Assessment of the American Joint Commission on Cancer 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic

- Neuroendocrine Tumors: A Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. *Cancer Medicine*, 7(3), 626-634.
- Lipson, R., Baldes, E., & Gray, M. (1967). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, 20(12), 2255-2257.
- Lipson, R., Baldes, E., & Olsen, A. (1964). Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Diseases of the Chest*, 64, 676-679.
- Liu, C., Kwan, D., Saxton, R., & McFadden, D. (2000). Hypericin and Photodynamic Therapy Decreases Human Pancreatic Cancer in Vitro and in Vivo. *Journal of Surgical Research*, 93(1), 137-143.
- Longo, J., Lozzi, S., Simioni, A., Morais, P., Tedesco, A., & Azevedo, R. (2009). Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B*, 9(94(2)), 143-146.
- Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve efficiency treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 39(12), 1137-1150.
- Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. (2010). Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Digestive Diseases*, 28(4-5), 645-656.
- Matroule, J., Volanti, C., & Piette, J. (2006). NF-kappaB in photodynamic therapy: discrepancies of a master regulator. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5), 1241-1246.
- 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.
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Kroemer. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, NY)*, 16(334(6062)), 1573-1577.
- Mizushima, N., & Klionsky, D. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 27, 19-40.
- Moor, A. (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 57(1), 1-13.
- Moor, A., Ortel, B., & Hasan, T. (2003). Mechanism of Photodynamic Therapy. T. Patrice (Dü.) içinde, *Photodynamic Therapy* (s. 19-44). Hong Kong: Sun Fung Offset Binding Company Limited.
- Mordon, S., Cochrane, C., Tylecz, J., Betrouni, N., Mortier, L., & Koncar, V. (2015). Light emitting fabric technologies for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(1), 1-8.

- Morgan, J., & Oseroff, A. (2001). Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2(49), 71-86.
- Mornex, F., Gerard, J., Chauffert, B., & Brun, M. (2000). Concomitant chemoradiotherapy and preoperative radiotherapy in exocrine pancreatic adenocarcinoma. *Annales de Chirurgie*, 125(2), 111-117.
- Mornex, F., Girard, N., Delpero, J., & Partensky, C. (2005). Radiochemotherapy in the management of pancreatic cancer-part 1: neoadjuvant treatment. *Seminars in Radiation Oncology*, 15(4), 226-234.
- Morton, C., Brown, S., Collins, S., Ibbotson, S., Jenkinson, H., Kurwa, H., Pearse, A. (2002). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Report of a workshop of the British Photodermatology Group. *British Journal of Dermatology*, 146, 552-567.
- Moser, J. (1998). *2nd and 3rd Generation Photosensitizers*. (15. baskı b.). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G., & Hamblin, M. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancer (Basel)*, 3(2), 2516-2539.
- Muniraj, T., Jamidar, P., & Aslanian, H. (2013). Pancreatic cancer; a comprehensive review and update. *Disease a Month*, 59(11), 368-402.
- Nahimisa, T. (1982). Inducynanine Green test and its development. *The Tokai Jorunal of Experimental and Clinical Medicine*, 7, 419-423.
- Nelson, J., Liaw, L., & Berns, M. (1987). Tumor destruction in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 46(5), 829-835.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochemica at Biophysica Acta*, 1833(12), 3448-3459.
- Oleinick, N., Morris, R., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical&Photobiology Sciences*, 1(1), 1-21.
- Oliveira, C., Turchiello, R., Kowaltowski, A., Indig, G., & Baptista, M. (2011). Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology & Medicine*, 15;51(4), 824-833.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B., & Bao, J. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487-498.
- Pass, H. (1993). Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst*, 85, 443-456.

- Patrice, T. (2003). *Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Paulson, A., Tran Cao, H., Tempero, M., & Lowy, A. (2013). Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *144*(6), 1316-1326.
- Perek, S. (2002). Pankreas Kanseri. *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyumu*. *28*, s. 215-230. İstanbul: Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyumu Bildirisi.
- Pisters, P., Wolff, R., Crane, C., & Evans, D. (2005). Combined-modality treatment for operable pancreatic adenocarcinoma. *Oncology (Williston Park)*, *19*(3), 393-410.
- Pollom, E., Koong, A., & Ko, A. (2015). Treatment Approaches to locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *29*(4), 741-759.
- Porcu, E., Salis, A., Gavini, E., Rasso, G., Maestri, M., & Giunchedi, P. (2006). Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments. *Biotechnology Advances*, *34*, 768-789.
- Prasad, P. (2003). *Introduction to Biophotonics* (1. baskı). Kanada: John Wiley & Sons Inc.
- Ravanat, J., & Cadet, J. (1995). Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, *8*, 379-388.
- Reginato, E., Wolf, P., & Hamblin, M. (2014). Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World Journal of Immunology*, *27*(4 (1)), 1-11.
- Robertson, C., Evans, D., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): a hort review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, *96*(1), 1-8.
- Ryan, D., Hong, T., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, *371*(11), 1039-1049.
- Sant, M., Allemani, C., Santaquilani, M., Knijn, A., Marchesi, F., Capocaccia, R., & EURO CARE Working Group. (2009). EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *European Journal of Cancer*, *45*(6), 931-991.
- Scherer, K., Bisby, R., Botchway, S., & Parker, A. (2017). New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *17*(2), 171-189.
- Schmidt-Erfurth, U., & Hasan, T. (2000). Mechanism of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, *45*(3), 195-214.

- Schultz, D., & Harrington, W. (2003). Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6), 345-369.
- Schwarz, L., & Katz, M. (2015). Diagnosis and Management of Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29(4), 727-740.
- Scourides, P., Böhmer, R., Kaye, A., & Morstyn, G. (1987, 47 13). Nature of the tumor-localizing components of hematoporphyrin derivate. *Cancer Research*, s. 3439-3445.
- Selvasekar, C., Birbeck, N., Mcmillan, T., & Wain, M. (2002). Photodynamic therapy and the alimentary tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 15(7), 899-915.
- Separovic, D., Joseph, N., Breen, P., Bielawski, J., Pierce, J., Van Buren, E., Bielawska, A. (2011). Combining anticancer agents photodynamic therapy and LCL85 leads to distinct changes in the sphingolipid profile, autophagy, caspase-3 activation in the absence of cell death, and long-term sensitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(3), 372-377.
- Shaib, W., Ip, A., Cardona, K., Alese, O., Maithel, S., Kooby, D., El-Rayes, B. (2016). Contemporary Management of Borderline Resectable and Locally Advances Unresectable Pancreatic Cancer. *Oncologist*, 21(2), 178-187.
- Sharikova, A., Finley, J., Liang, X., & Zhu, T. (2013). PDT dose dosimetry for pleural photodynamic therapy. S. BIOS (Dü.) içinde 8568. San Francisco, Kaliforniya: Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXII.
- Shen, Y., Nesbitt, H., Callan, B., Taylor, M., Love, M., McHale, A., & Callan, J. (2017). Oxygen generating nanoparticles for improved photodynamic therapy of hypoxic tumours. *Journal of Controlled Release*, 264, 333-340.
- Shirasu, N., Nam, S., & Kuroki, M. (2013). Tumor-targeted photodynamic therapy. *Anticancer Research*, 33(7), 2823-2831.
- Sibata, C., Colussi, V., Oleinick, N., & Kinsella, T. (2001). Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2(6), 917-927.
- Siegel, R., Miller, K., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7-30.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013, Ocak 17). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1), 11-30.
- Slack, J. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121(16), 1569-1580.
- Sohal, D., Willingham, F., Falconi, M., Raphael, K., & Crippa, S. (2017). Pancreatic Adenocarcinoma: Improving Prevention and Survivorship. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 37, 301-310.

- Sperti, C., Pasquali, C., Pastorelli, D., Ferronata, A., Decet, G., & Pedrazzoli, S. (2003). Adenocarcinoma of the pancreas: the rationale for neoadjuvant therapy. *Acta Bio-Medica*, 74(2), 91-95.
- Spikes, J. (1990). Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.*, 6, 259-274.
- Squadroni, M., & Fazio, N. (2010). Chemotherapy in pancreatic adenocarcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14(4), 386-394.
- Star, W., Marijnissen, H., van der Berg-Blok, A., Versteeg, J., Franken, K., & Reinhold, H. (1986). Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Research*, 46(5), 2532-2540.
- Svaasand, L. (1984). Optical Dosimetry for direct and interstitial photoradiation therapy of malignant tumors. *Progress Clinical and Biological Research*, 170, 91-114.
- Szeimies, R., Baumler, W., Steinbach, P., Karrer, S., Goetz, A., Abels, C., Landthaler, M. (1997). Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B.*, 38(2-3), 178-183.
- Şimşek, H. (1993). Pankreasın yapısı ve konjenital anomaliler. H. Telater, & H. Şimşek, *Gastroenteroloji* (s. 917-923). Ankara: Hekimler Yayın Birliği.
- Tang, H., Hamblin, M., & Yow, C. (2007, Nisan). A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug resistant pathogens. *Journal of infection and chemotherapy*, 13, 87-91.
- Tempero, M., Malafa, M., Al-Hawary, M., Asbun, H., Bain, A., Behrman, S., Komand. (2017). Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(18), 1028-1061.
- Tempero, M., Malafa, M., Behrman, S., Benson, A., Casper, E., Chiorean, E., Mul. (2014). Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 12(8), 1083-1093.
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J., & Stewart, F. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*, 11(9), 1034-1044.
- Tseng, W., Saxton, R., Deganutti, A., & Liu, C. (2003). Infrared laser activation of indocyanine green inhibits growth in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 27, e42-45.
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2005). Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, 12(2), 1528-1234.
- Tummala, P., Junaidi, O., & Agarwal, B. (2011). Imaging of pancreatic cancer: An overview. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(3), 168-174.

- Turrini, O., Paye, F., Bachellier, P., Sauvanet, A., Sa Cunha, A., Le Treut, Y., French Surgical Association. (2013). Pancreatectomy for adenocarcinoma in elderly patients: postoperative outcomes and long term results: a study of the French Surgical Association. *European Journal of Surgical Oncology*, 39(2), 171-178.
- Tüik, T. İ. (2015, Mart 24). *Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015*. Şubat 28, 2018 tarihinde <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526> adresinden alındı
- Türkiye İstatistik Kurumu, T. (2016). *Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015*. Aralık 21, 2017 tarihinde <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526> adresinden alındı
- Vabulas, R., Wagner, H., & Schild, H. (2002). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 270, 169-184.
- Varghese, A., Lowery, M., Yu, K., & O'Reilly, E. (2016). Current management and future directions in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 122(24), 3765-3775.
- Vaupel, P., Thews, O., & Hoekel, M. (2001). Treatment resistance of solid tumors. *Medical Oncology*, 18(4), 243-259.
- Von Hoff, D., Ervin, T., Arena, F., Chiorean, E., Infante, J., Moore, M., Van Cutsem, E. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703.
- von Wichert, G., Seufferlein, T., & Adler, G. (2008). Palliative treatment of pancreatic cancer. *Journal of Digestive Diseases*, 9(1), 1-7.
- Wang, L., Huang, Z., Lin, H., Hetzel, F., & Liu, M. (2013). Effect of Photofrin-mediated photocytotoxicity on a panel of human pancreatic cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3), 244-251.
- Wayne, J., Wolff, R., Pisters, P., & Evans, D. (2001). Multimodality management of localized pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 7(1), 35-46.
- Wilson, B. (2002). Photodynamic therapy for cancer principles. *Cancer Journal of Gastroenterology*, 16, 393-396.
- Wilson, B., & Patterson, M. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, 53(9), R61-109.
- Wilson, B., Jeeves, W., & Lowe, D. (1985). In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochemistry and Photobiology*, 42, 153-162.
- Wolff, R. (2012). Neoadjuvant therapy for resectable and borderline resectable adenocarcinoma of the pancreas. *Current Drug Targets*, 13(6), 781-788.
- Wood, S., Holroyd, J., & Brown, S. (1997). The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochemistry and Photobiology*, 65(3), 397-402.

- Wörmann, S., & Algül, H. (2013). Risk factors and therapeutic in pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*, 18(3), 282.
- Wu, S., & Xing, D. (2012). Mechanism of mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis under photofrin-mediated photodynamic therapy. *Journal of X-ray Sciences and Technology*, 20(3), 363-372.
- Xie, Z., & Klionsky, D. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102-1109.
- Xue, L., Chiu, S., & Oleinick, N. (2010). Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(2), 248-255.
- Yadav, D., & Lowenfels, A. (2013). The epidemiology of pancreatic and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252-1261.
- Yang, A., & O'Reilly, E. (2015). Novel directions in neoadjuvant therapy for pancreas adenocarcinoma. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 585-601.
- Yasuda, K., Nakajima, M., & Kawai, K. (1993). Staging of pancreatic carcinoma by endoscopic ultrasonography. *Endoscopy*, 25(2), 151-155.
- Yokoyama, Y., Ebata, T., Sugawara, G., Takahashi, Y., Kokuryo, T., Tsunoda, N., Nagino, M. (2012). Borderline resectable pancreatic cancer- a definition and effective treatment strategy. *Gan to Kagaku Ryoho*, 39(3), 337-341.
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., & Goto, M. (2008). Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver*, 2(3), 137-154.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 4952-4957.
- Yuan, J., & Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development*, 24(23), 2592-2602.
- Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011, Temmuz 28). Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 17(24), 2897-2908.
- Zhang, H., Ma, W., & Li, Y. (2009). Generation of effective vaccines against liver cancer by using photodynamic therapy. *Laser in Medical Sciences*, 24(4), 549-552.
- Zhao, P., Zheng, M., Yue, C., Luo, Z., Gong P., & Gao, G. (2014). Improving drug accumulation and photothermal efficacy in tumor depending on size of ICG loaded lipid-polymer nanoparticles. *Biomaterials*, 35, 6037-6046.
- Zuluaga, M., & Lange, N. (2018). Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15(17), 1655-1673.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayşenur Kiriş
Doğum Yeri	Fatih İstanbul
Doğum Tarihi	24.10.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	5544001015
E-Posta Adresi	kirisaysenur@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Sakarya Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	14.06.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	Fatih Üniversitesi
Enstitü Adı	Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Biyomedikal Mühendisliği Programı

Makale ve Bildiriler	
Kiriş Aydoğan T., Akbulut S., Kiriş A. ve diğerleri, 2017, Chlorine e6 tabanlı Fotodinamik Terapinin MiaPaCa-2 ve MRC-5 hücreleri üzerindeki etkisi, <i>Archives of Clinical and Experimental Medicine ACEM</i> , 2(2).	
Tabakoğlu HÖ., Kiriş T., Kiriş A. ve diğerleri, 2016, <i>Biyomedikal Optik ve Lazerler</i> , Biyomedikal Mühendisliğinin Temelleri, Asyalı M. H. (ed), Nobel Akademik Yayıncılık.	
Kiris T., Akbulut S., Kiris A. ve Tabakoglu HO., 2015, Optical characterization of pancreatic normal and tumor tissues with double integrating sphere systems, <i>Optical Interactions with Tissue and Cells XXVI</i> , Proceedings Vol. 9321, 932111	
Kiriş A., Tabakoğlu HÖ. ve diğerleri 2015, Fotodinamik Terapi Uygulanan Meme Kanserli Nude Farelerde Tedavi Etkinliğinin FT-Raman ve FT-Spektroskopisi	

ile Karakterizasyonu: Erken Dönem Sonuçları, *Proceeding of Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi'15*.

Kiriş A. ve diğerleri, 2014, Primer Meme Kanserinde Fotodinamik Terapi ve Kemoterapinin Etkisi, *Proceeding of 19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.

Kiris A., Karatepe O., Kiris T. ve diğerleri, 2014, İleri evre pankreas tümörlerinde deneysel bir yaklaşım, *Proceeding of 19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.

Kiriş A., Akbulut S., Kiriş T. ve diğerleri, 2014, Primer Meme Kanseri Hücrelerinde Kemoteröpatik İlaç-Doz Değişimlerinin Hücre Canlılığına Etkisi, *Proceeding 19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.

Kiriş A., ve diğerleri, 2014, ICG Tabanlı FDT'nin in vivo Etkisinin Araştırılması, *Proceeding of Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi'14*.

Kiris A., 2014, *Combined Effects of Chemotherapy and Indocyanine Green Mediated Photodynamic Therapy on ex vivo Human Primer Breast Cancer Cells*, Thesis (MSc.), Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü, Fatih University.

Rencüzoğulları Ç., Bireller E.S., Engin C., Kiriş A. ve diğerleri, 2013, Volume:1, Investigation On Corilagin and Photodynamic Therapy On Brain Glioblastoma Cell Lines, *1st Cell Death Research Congress wit International Participation*.

Karatepe O., Kiriş A. ve diğerleri, 2013, Çift Toplayıcı Küre Sistemi ile Tümörlü ve Sağlıklı Pankreas Dokusunun Optik Özelliklerinin Karakterizasyonu: Prospektif Klinik Çalışmanın Erken Dönem Sonuçları, Volume:1, *Proceeding of 11. Ulusal Hepatopankreatobiliyer Cerrahi Kongresi*.

Kiriş A., Kiriş T. Ve diğerleri, 2013, ICG kemoteröpatik bir ajan mıdır, *Proceeding of 13. Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi*.

Kiriş A., 2011, Çark Deresi'nde Toplam Koliform Bakteri ve *E.coli* Tayini, Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi