



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**PANKREAS KANSERİ TEDAVİSİNDE PHOTOLON GÜDÜMLÜ
FOTODİNAMİK TERAPİNİN UYGULAMASI**

Saadet AKBULUT

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr.Fırat KAÇAR**

Haziran, 2018

İSTANBUL

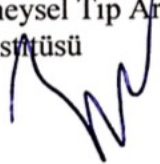
Bu çalışma,12.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafındanBiyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

,Biyomedikal Mühendisliği Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

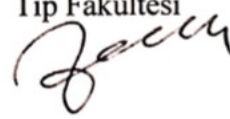
Tez Jürisi


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 ÖZCELEP
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 arkadaşlarım Tuğba AYDOĞAN ve Ayşenur KİRİŞ'e teşekkürü bir borç bilirim.

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

Son olarak, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili annem Şadiye AKBULUT, babam Süleyman AKBULUT ve kardeşlerim Emine, Saliha, Havvanur ve Muhammed Emin AKBULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2018

Saadet AKBULUT

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 KANSERİ	3
2.1.1. Pankreas.....	3
2.1.2. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	5
2.1.4. Pankreas Kanseri Tanısı ve Evrelendirilmesi	7
2.1.5. Pankreas Kanseri Tedavisi.....	9
2.2. FOTODİNAMİK TERAPİ.....	12
2.2.1. Fotodinamik Terapinin Tarihsel Gelişimi	12
2.2.2. Fotodinamik Terapinin Tanımı ve Aksiyon Mekanizması	14
2.2.3. Fotodinamik Terapinin Anti-Tümör Aktivitesi.....	16
2.2.3.1. Direkt Tümör Hücreleri Hasarı.....	17
2.2.3.2. Vasküler Hasar	21
2.2.3.3. Enflamatuvar ve İmmünolojik Yanıtı	21
2.2.4. Fotodinamik Terapinin Komponentleri	22
2.2.4.1. Işığa Duyarlı Ajanlar	22
2.2.4.2. Fotolon ile Fotodinamik Terapi	27
2.2.4.3. Işık Kaynakları.....	28
2.2.4.4. Oksijen.....	30
2.2.5. Fotodinamik Terapinin Sınırları.....	31
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	34
3.1. HÜCRE HATLARI VE KÜLTÜR KOŞULLARI.....	34

3.1.1. Hücre Hatları.....	34
3.1.2. Hücrelerin Kültüre Alınması.....	34
3.2. IŞIK KAYNAĞI.....	35
3.3. IŞIĞA DUYARLI AJAN.....	35
3.3.1. Işığa Duyarlı Ajan.....	35
3.3.2. Fotolon'un Optimal Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	36
3.4. <i>İN VİTRO</i> FOTODİNAMİK TERAPİ UYGULAMALARI.....	36
3.4.1. Optimizasyon Çalışması.....	36
3.4.1.1. <i>MRC-5 Hücre Hattı Üzerinde Optimizasyon Çalışması Uygulamaları</i>	37
3.4.1.2. <i>MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerinde Optimizasyon Çalışması Uygulamaları</i>	38
3.4.2. Ana Çalışma.....	40
3.5. SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK TESTLER.....	41
3.5.1. WST-1 Hücre Canlılık Testi.....	41
3.5.2. Kaspaz 3/BCA Protein Aktivitesi Testi.....	42
3.5.3. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi.....	43
3.6. İSTATİKSEL ANALİZ.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. FOTOLON'UN SİTOTOKSİK ETKİSİ.....	45
4.2. OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ BULGULARI.....	45
4.2.1. MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Optimizasyon Uygulamalarının Bulguları.....	45
4.2.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerindeki Optimizasyon Uygulamalarının Bulguları.....	51
4.3. ANA ÇALIŞMA BULGULARI.....	57
4.3.1. MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Ana Çalışma Bulguları.....	57
4.3.1.1. <i>Kaspaz-3/BCA Protein Aktivitesi Testi Bulguları</i>	57
4.3.1.2. <i>Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi Bulguları</i>	58
4.3.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerindeki Ana Çalışma Bulguları.....	59
4.3.2.1. <i>Kaspaz 3/BCA Protein Aktivitesi Testi Bulguları</i>	59
4.3.2.2. <i>Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi Bulguları</i>	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Pankreas anatomisi ve kan damarları.....	3
Şekil 2.2: Fotodinamik terapinin genel tedavi prosedürü.....	15
Şekil 2.3: Işığa duyarlı ajan aktivasyonunu takiben Tip I ve Tip II reaksiyonlarının şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.4: Fotodinamik terapinin anti-tümör etkilerinin şematik görünümü.....	17
Şekil 2.5: Fotodinamik terapi sonrasında muhtemel direkt tümör hücresi yıkımları.....	18
Şekil 2.6: HpD ve Photofrin®'nin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.7: Bazı ikinci nesil ışığa duyarlı ajanların kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.8: Fotolon'un kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.9: Fotolon'un absorpsiyon bandı.....	28
Şekil 2.10: Fototerapötik pencere.....	30
Şekil 3.1: Lazer sistemi.....	35
Şekil 3.2: 96 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaların yerleşim düzeni.....	37
Şekil 3.3: 24 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaların yerleşim düzeni.....	40
Şekil 4.1: Çalışma konsantrasyonlarındaki hücre canlılık yüzdeleri.....	45
Şekil 4.2: Uygulama 1'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	46
Şekil 4.3: Uygulama 2'ye ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	47
Şekil 4.4: Uygulama 3'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	48
Şekil 4.5: Uygulama 4'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	49
Şekil 4.6: Uygulama 5'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	50
Şekil 4.7: Uygulama 6'ya ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	51
Şekil 4.8: Uygulama 7'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	52
Şekil 4.9: Uygulama 8'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	53

Şekil 4.10: Uygulama 9'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	54
Şekil 4.11: Uygulama 10'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	55
Şekil 4.12: Uygulama 11'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	56
Şekil 4.13: Uygulama 12'ye ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.....	57
Şekil 4.14: MRC-5 hücre hattı Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi bulguları.	58
Şekil 4.15: MRC-5 hücre hattı Annexin-V Apoptoz/Nekroz testi sonuçları.....	59
Şekil 4.16: MIA PaCa-2 hücre hattı Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi bulguları.	60
Şekil 4.17: MIA PaCa-2 hücre hattı Annexin-V Apoptoz/Nekroz testi sonuçları.....	61



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Pankreas kanseri risk faktörleri.....	5
Tablo 2.2: Pankreas kanseri anatomik evrelendirme.....	8
Tablo 2.3: Apoptoz ve nekroz özellikleri.....	20
Tablo 2.4: Klinikte kullanılan bazı ışığa duyarlı ajanlar ve kullanım alanları.....	26
Tablo 3.1: MRC-5 hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulamaları.....	38
Tablo 3.2: MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulamaları.....	39

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

μ	: Mikro
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
®	: Marka Tescil Sembolü

Kısaltmalar	Açıklama
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü 1
AJCC	: Amerikan Kanser Ortak Komitesi
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin Trifosfat
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre Kare
CO₂	: Karbondioksit
CW	: Sürekli Mod
DMEM	: Dulbecco's Modifed Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EUS	: Endoskopik Ultrasonografi
ERCP	: Endoskopik Retrograd Kolanjiopankreatografi
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDT	: Fotodinamik Terapi
HIFU	: Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrason
HpD	: Hematoporfirin Türevleri
g	: Gram
GITSG	: Gastrointestinal Tumor Study Group
ICG	: İndosiyenin Yeşili
İİA	: İnce İğne Aspirasyonu
IRE	: Geri Dönüşümsüz Elektroporasyon
J	: Joule
LAPC	: Lokal İleri Pankreas Kanseri

LED	: Işık Yayan Diyot
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
m-THPC	: Meta-tetra Hidroksifenil Klorin
MR	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Tamponlu Su
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PI	: Proridyum İyodür
p-NA	: p-Nitroanilin
RFA	: Radyofrekans Ablasyon
RIP	: Rseptör Etkileşimli Proteinler
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SBRT	: Stereotaktik Vücut Radyasyon Tedavisi
UICC	: Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği
US	: Ultrasonografi
W	: Watt
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram

ÖZET

DOKTORA TEZİ

PANKREAS KANSERİ TEDAVİSİNDE PHOTOLON GÜDÜMLÜ FOTODİNAMİK TERAPİNİN UYGULAMASI

Saadet AKBULUT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr.Fırat KAÇAR

Fotodinamik Terapi (FDT) Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı kanser tedavisi yöntemidir. Fotodinamik terapi özellikle solid tümörlerde yüksek başarı oranı ile minimal invaziv veya non-invaziv bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik terapi dokuda akümüle olan ışığa duyarlı ajana, ajanı uyaracak bir ışık kaynağına ve ortamda oksijenin varlığına ihtiyaç duymaktadır.

Fotodinamik terapinin mekanizması topikal veya intravenöz olarak verilen ışığa duyarlı ajanın hedef dokuda akümüle olmasının ardından spesifik bir dalga boyunda absorpsiyon yapan bir ışık kaynağı ile uyarılması esasına dayanır. Işığa duyarlı ajan belirli bir ışık enerjisine maruz kaldığında dokuda apoptoza, vasküler dejenerasyona, bağışıklık yanıtına ve hatta tümör hücrelerini nekroz yoluyla doğrudan öldürmeye neden olan reaktif oksijen türlerinin üretilmesini sağlar. Fotodinamik terapinin geleneksel tedavi yöntemlerinde karşılaşılan yan etkileri yoktur. Avantajlar; iyonize olmayan emisyonlar kullanılır, sağlıklı dokuya zarar vermeden lokalize tedavi, tekrarlanabilir, minimal invaziv, hastanede kalış süresinin kısaltılması ve hastanın tedavisi süresinin destekleyen psikolojik durumunun korunması.

Bu çalışmada klinikte en sık saptanan MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde en uygun Fotolon güdümlü Fotodinamik terapi uygulaması için Fotolon akümülyasyon süresi ve lazer enerji yoğunluğu parametreleri araştırılmıştır. Kontrol olarak MRC-5 normal akciğer hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak Fotolon kullanılmıştır. Fotolon suda

çözünebilen ve 630-690 nanometreleri arasında absorpsiyon göstermektedir. Maksimum absorpsiyonu ise yaklaşık 660 nanometrede göstermektedir. Fotolon'un MIA PaCa-2 pankreas epitelyal karsinoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağımlı etkisi araştırılarak terapi sırasında kullanılacak Fotolon'un konsantrasyonu optimize edilmiştir. Fotolon konsantrasyonu 10 μM 'a sabitlenmiştir. Seçilen bu konsantrasyonun hücre canlılığını inhibe ve proliferasyonu etmediği belirlenmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda 60 dakika Fotolon inkübasyonu ve 5 J/cm² lazer enerji yoğunluğu en iyi sonuç alınan parametre olarak belirlenmiştir. Fotolon güdümlü Fotodinamik terapi uygulamalarının MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatları üzerinde neden olduğu ölüm tipi kaspaz-3/BCA protein aktivite analizi ve Annexin-V analizi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak Fotolon güdümlü Fotodinamik terapinin belirlenen parametrelerde hücreler üzerinde %17 oranında apoptoza neden olduğu ancak tek başına küratif bir tedavi olarak uygulanamayacağı belirlenmiştir.

Haziran 2018, 97 sayfa.

Anahtar kelimeler: Pankreas Kanseri, Fotodinamik Terapi, Fotolon

SUMMARY

Ph.D. THESIS

PHOTOLON MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY APPLICATION ON PANCREATIC CANCER TREATMENT

Saadet AKBULUT

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biomedical Engineering

Supervisor : Prof. Dr.Fırat KAÇAR

Photodynamic Therapy (PDT) is an American Food and Drug Administration (FDA) approved method of cancer treatment. Photodynamic therapy is a minimally invasive or non-invasive treatment with a high success rate especially in solid tumors. Photodynamic therapy requires photosensitizer that accumulated in target tissue, light source that illuminate the agent and oxygen in environment tissue.

The mechanism of photodynamic therapy is based on stimulation photosensitizer that given topikal or intravenous with a light source that absorbing a specific wavelength. When the photosensitizer is exposed to a specific light energy, it produces reactive oxygen species that caused directly kill tumor cells that is apoptosis and necrosis, vascular degeneration, reactive immune response. Photodynamic therapy has no side effects that are encountered in conventional treatment methods. Advantages; non-ionizing emissions are used, locally treated, reproducible, minimally invasive, shortening of hospital stay and preservation of the supporting psychological state of the patient during the treatment period without harming healthy tissue.

In this study, Fotolon accumulation time and laser energy intensity parameters were investigated for the most appropriate Fotolon mediated photodynamic therapy application on MIA PaCa-2 cell line which is most frequently detected in clinic. MRC-5 normal lung cell line was used as a control. Fotolon was used as a light sensitive agent in the study. The Fotolon is

water soluble and shows absorbance between 630-690 nanometers. Fotolon shows maximum absorbance at about 660 nanometers. The concentration dependent effect of Fotolon on MIA PaCa-2 pancreatic epithelial carcinoma cells was investigated and the concentration of Fotolon to be used during therapy was optimized. The Fotolon concentration was fixed at 10 μ M. It was determined that this selected concentration did not inhibit and proliferate cell viability. Because of the optimization study, 60 min Fotolon incubation and 5 J/ cm² laser energy density were determined as the best-achieved parameters. The type of death caused by Fotolon mediated photodynamic therapy applications on the MIA PaCa-2 and MRC-5 cell lines was investigated with caspase-3 / BCA protein activity assay and Annexin-V assay.

In conclusion, it was determined that Fotolon mediated photodynamic therapy causes 17% apoptosis on cells in determined parameters but cannot be applied as a curative treatment alone.

June 2018,97 pages.

Keywords: Pancreas Cancer, Photodynamic Therapy, Fotolon

1. GİRİŞ

Dünyada kadın ve erkeklerde sıklık sıralamasında 13. sırada görülen kanser pankreas kanseridir. Türkiye’de ise kadın ve erkeklerde sıklık sıralamasında 10. sırada görülen kanser türüdür. Yine Türkiye’de kansere bağlı ölümler içinde 5. sırada yer almaktadır. Pankreas adenokarsinomu en agresif kanser formlarından biridir. Pankreas kanserinin çoğu kez hastalığın ileri evreleriyle birlikte ortaya çıkan belirtilerin ağırlaşmasıyla tanısı konulabilmektedir. Pankreas kanserinin en sık görülen semptomları sarılık (%56), halsizlik (%86), kilo kaybı (%85), karın ağrısı (%79), koyu renkli idrar (%59), mide bulantısı ve kusmadır (%35-40). Sarılık özellikle erken evrede bulunan hastalarda en sık görülen klinik tablodur. Herhangi bir belirtisi olmayan kişiler için pankreas kanseri tanısı konulabilecek güvenilir spesifik bir test mevcut değildir. Bununla birlikte mevcut hastaların yüzde onuna ameliyat edilebilir evredeyken, yüzde doksanına ise metastaz evresinde (evre 4) ya da lokal ileri pankreas kanseri (LAPC, evre 3) evresindeyken teşhis konulmaktadır (Karanikas ve diğ., 2016).

Tedavisi için en etkili çözüm tümör dokunun cerrahi operasyonla rezeksiyonudur. Palyatif kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları geleneksel tedavi olarak uygulanmaktadır. Kemoterapiye bağlı olarak görülen yan etkilerin şiddeti alınan ilaçlara ve hastaya bağlı olarak değişmektedir. Kemoterapi sırasında kanser hücreleriyle birlikte vücutta hızlı çoğalan saç, kemik iliğinde gelişim gösteren kan hücreleri, sindirim sistemindeki normal hücreler de etkilenmektedir. Buna bağlı olarak da kemoterapi alan hastalarda saç dökülmesi, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı, kusma, düşük kan sayımı, morarma ve enfeksiyon gibi yan etkiler görülmektedir. Radyoterapide de kemoterapide olduğu gibi yan etkiler kişiye ve doza bağlı olarak değişmektedir. Radyoterapide en sık görülen yan etkiler yorgunluk, ciltte kızarıklık, kuruma ve koyuluk, iştahsızlık, kan değerlerinin düşmesidir (Boz ve diğ., 2006). Mevcut kemoterapi ve radyoterapi rejimlerinin başarısız sonuçları ve toksitiden kaynaklanan risklerden dolayı son yıllarda radyofrekans ablasyon (RFA), geri dönüşsüz elektroporasyon (IRE), stereotaktik vücut radyasyon tedavisi (SBRT), yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU), mikrodalga ablasyon, fotodinamik terapi (PDT), kryoablasyon gibi yerel ablasyon tedavi yöntemleri önem kazanmıştır (Pecorino, 2005).

Fotodinamik terapi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış kanser tedavi metodudur. Fotodinamik terapi özellikle solid tümörlerde yüksek oranda başarılı olan minimal invaziv ya da invaziv olmayan tedavi yöntemidir (Shliakhtsin ve diğ., 2009). Fotodinamik terapi uygulama sırasında ışığa duyarlı bir ajana, ajanı uyarabilecek uygun dalga boyuna sahip bir ışık kaynağına ve ortamda mevcut oksijene ihtiyaç duymaktadır. Fotodinamik terapinin mekanizması ışığa duyarlı ajan intravenöz ya da topikal olarak uygulanır ve ajanın istenilen bölgede yoğun olarak toplanması için belirli bir süre beklenir ardından ajanın absorpsiyon spektrumunda ışımaya yapan uygun bir ışık kaynağı ile uyarılması şeklindedir. Işığa duyarlı ajan spesifik olan ışık kaynağı ile uyarıldığında reaktif oksijen türlerinin açığa çıkması beklenir. Reaktif oksijen türleri; kanser hücrelerinde apoptoza ya da nekroza, kanser dokuda vasküler dejenerasyona ya da bir bağışıklık tepkisine neden olabilir. Fotodinamik terapi; lokal olarak uygulanabilmesi, diğer tedavi yöntemleri ile birlikte ya da tek başına uygulanabilmesi, tekrarlanabilir olması, ayakta tedaviye uygun olması, minimal invaziv olması nedeniyle geleneksel tedavi yöntemlerine kıyasla daha avantajlıdır (Lukšienė, 2003).

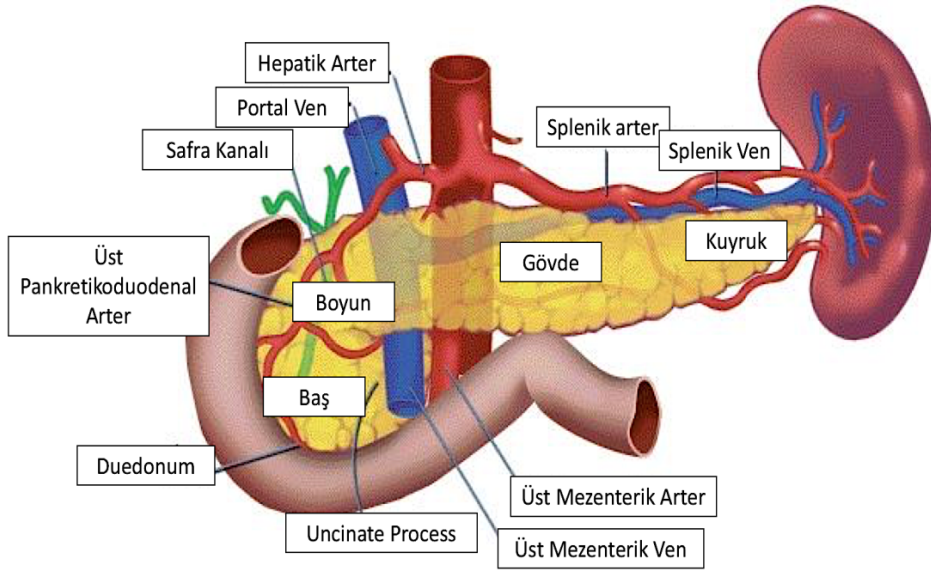
Bu çalışmanın amacı, klinikte sıklıkla karşılaşılan pankreas kanser türlerinden olan MIA PaCa-2 (RL-1420TM) pankreas epitelyal tümör ve MRC-5 (CCL-171TM) normal akciğer fibroblastik hücre hatları üzerinde etkili olabilecek Fotolon güdümlü Fotodinamik terapi parametrelerinin (ajanın dozu, akümülyasyon süresi, uygulama süresi) *in vitro* çalışmalar için belirlenmesini sağlamaktır. Çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak Fotolon kullanılmaktadır. Çalışmada hücre ölüm şeklinin belirlenmesi amacıyla Anneksin-V apoptoza/nekroz tayini ve Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizleri yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PANKREAS KANSERİ

2.1.1. Pankreas

Pankreas 12-20 cm uzunluğunda ve yetişkinlerde 60-140 gram ağırlığında; ikinci ve üçüncü lomber vertebralar hizasında yer almaktadır. Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin salgı yapan bir bezdir. Uncinate process, baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere beş bölüme ayrılır. Bu bölümler Şekil 2.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Baş kısmı pankreasın en kalın kısmıdır ve üst mezenterik damarların sağına doğru uzanır. Uncinate process başın uzantısıdır ve duodenumun C kıvrımına yapışmıştır. Pankreasın en ince kısmı boyundur ve üst mezenterik arter ve üst mezenterik venin ön kısmına doğru uzanır. Gövde pankreasın ana kısmıdır; üst mezenterik arter ve üst mezenterik venin sol kısmına doğru uzanır, ön yüzeyi karın zarı ile çevrilidir. Kuyruk kısmı ise dalak hilusundaki splenorenal bağ tabakaları arasında doğru uzanır (İmamoğlu & Özyardımcı Ersoy, Ocak, 2009; Jones, 2015-2017; Pandol, 2015).



Şekil 2.1: Pankreas anatomisi ve kan damarları.

Pankreas işlevlerine göre endokrin ve ekzokrin pankreas olmak üzere ikiye ayrılır. Tüm organın %85'ini ekzokrin pankreas, %2'sini endokrin pankreas ve %13'ünü ise ekstrasellüler matriks ve damarlar oluşturur. Ekzokrin pankreas temelde sindirimi kolaylaştırmak ve sindirim kanalını korumak amacıyla sekresyon yapar. Ekzokrin salgı, asinar ve duktal hücreler tarafından üretilir.

Günlük 1500-2500 ml, berrak kokusuz, pH 8 civarı plazma ile izotonik salgı üretir. Pankreas salgısı; başta protein, karbonhidrat ve yağların sindiriminde görev alan amilaz, lipaz, pankreatik kolesterol ester hidrolaz, pro-fosfolipaz A2, fosfotaz, kolipaz, tripsin, kimotripsin, elastaz gibi pek çok sindirim enziminin aktif veya inaktif formlarını içerir. Bunlara ek olarak mide asidinin nötralize edilmesini ve enzimlerin optimal pH'sını sağlayan bikarbonat iyonları da bol miktarda bulunur. Endokrin pankreas, Langerhans adacıkları denilen insan pankreasında bir milyondan fazla bulunan ve çapı 0,1-0,2mm arasında değişen hücre gruplarından oluşur. Salgıladıkları hormonlar kapiller kana ve oradan da vücudun kan dolaşımına katılır. Langerhans adacıkları başlıca 4 tip hücreden oluşur. Bunlar; Beta (β), Alfa (α), Delta (δ) ve Pankreatik polipeptit (PP) hücreleridir. Alfa (α) hücreleri; Serotonin, Pankreatik Gastrin Hormonu ve Glukagon hormonunun salgılanmasında görev alır ve Langerhans adacıklarının %20'sini oluşturur. Langerhans adacıklarının %68'ini Beta (β) hücreleri oluşturur. Kandaki glikoz düzeyini azaltan ve glukagon hormonunun salgılanmasını inhibe eden İnsülin ve Amilin hormonları Beta (β) hücreleri tarafından salgılanır. Delta (δ) hücreleri Langerhans adacıklarının %10'unu oluşturur. İnsülin ve Glukagon salınımını baskılayan Somatostatin hormonunun salgılanmasında görev alır. Pankreatik polipeptit hücreleri adacıkların %2'sini oluşturur. F hücreleri de denilen Pankreatik polipeptit hücreleri Somatostatin hormonunun salgılanmasını inhibe eder, safra kesesinin gevşemesini sağlayarak duodenuma boşaltılan safra salgısının azalmasını sağlar (Şeftalioğlu, 1998; Masa Skelin, 2010; Jennings ve diğ., 2015). Pankreasın langerhans adacıkları Şekil 2.2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Şekil 2.2).

2.1.2. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Dünyada, 2015 yılında 425,667 insana pankreas kanseri tanısı konulmuştur. Küresel pankreas kanseri insidansı 2005 yılından 2015 yılına kadar %26,1 oranında artmıştır. Pankreas kanseri dünyada kadın ve erkeklerde 13. sırada en sık görülen kanser türüdür. Kansere bağlı ölümler içinde ise dünyada 7. sıradadır. Türkiye'de ise kadın ve erkeklerde 10. sırada en sık görülen kanser türü pankreas kanseridir. Yine Türkiye'de kansere bağlı ölümler içinde 5. sırada yer almaktadır (Fitzmaurice, Christina, 2017). Pankreas kanserinin %94'ünü ekzokrin dokusundan gelişen adenokarsinomlar oluştururken tüm olguların %6'sını ise pankreasın hormon üreten hücrelerinde gelişen endokrin tümörleri oluşturmaktadır. Pankreas endokrin tümörleri adenokarsinoma kıyasla tanıda ortalama yaşı daha genç ve prognozu daha iyidir (Alteri ve diğ., 2017). Amerikan Kanser Derneği verilerine göre 2017 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 53,670 insana (27,970 erkek ve 25,700 kadın) pankreas kanseri tanısı konulması

öngörülmektedir. Yine Amerikan Kanser Derneği verilerine göre 2017 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 43,090 insanın (22,300 erkek ve 20,790 kadın) pankreas kanserinden dolayı yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir (The American Cancer Society, 2018).

2.1.3. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanseri etiyojisi tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte pankreas kanseri olma riskini artıran birçok faktör vardır. Bunlar kendi içerisinde değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Tablo 2.1'de pankreas kanseri risk faktörleri verilmiştir (The American Gastroenterological Association Clinical Practice and Practice Economics Committee, 1999).

Tablo 2.1: Pankreas kanseri risk faktörleri.

RİSK FAKTÖRLERİ	
Değiştirilebilir Risk Faktörleri	Değiştirilemeyen Risk Faktörleri
Sigara Kullanımı	Yaş
Obezite	Cinsiyet
Yüksek Miktarda Hayvansal Yağ Tüketimi	Etnik Köken
Mesleki Maruziyet (Nikel, petrol ve odun hamurundan kaynaklanan CI-hidrokarbon)	Kronik Pankreatit
Kısmi Gastrektomi	Kalıtsal Genetik Yatkınlık
Diyabet Mellitus	Kan Grubu

Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Sigara kullanımı; pankreas kanseri için risk faktörüdür. Sigara içenlerin sigara içmeyenlere kıyasla pankreas kanserine yakalanma riski %75 oranında daha yüksektir ve bu risk sigarayı bıraktıktan sonra 5 ila10 yıl arasında devam etmektedir (Muniraj ve diğ., 2013). Tüm pankreas kanseri vakalarının %11-32'sinin sigara kullanımına bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Patrick Maisonneuve, Albert B. Lowenfels, 2015). Sigara kullanımının kanser progresyonunu etkilediği

birçok mekanizma bilinmektedir. Nikotin ve sigara dumanına bağlı kanserojen bileşenlerin tümör hücreleri üzerinde doğrudan büyümeyi teşvik ettiği ve miyeloidden türetilen supresor hücrelerin infiltrasyonunu artırdığı bilinmektedir (Yuan ve diğ., 2017).

Obezite; pankreas kanseri için risk faktörüdür. Vücut kitle indeksi 25'den fazla olan insanlarda pankreas kanserine yakalanma riski vücut kitle indeksi 25'in altında olanlardan %20 daha fazladır. Özellikle abdominal obezite, erişkinlikte pankreas kanseri başlangıcıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte obezite, pankreas kanserinden kaynaklanan ölüm oranını da artırmaktadır. Klinik araştırmalarda pankreas kanserinde vücut kitle indeksinin 25'den fazla olması hem genel hem de tekrarsız sağ kalım süresinin azalması, ikincil tümör için riskin artması ve tümör gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Wörmann& Algül, 2013; Hakansson ve diğ., 2005).

Hayvansal yağ tüketimi; pankreas kanseri için belirlenmiş risk faktörlerindedir. Yapılmış klinik araştırmalarda doymuş yağ tüketimi ile pankreas kanseri insidansı arasında pozitif korelasyon mevcut olduğu tespit edilmiştir. Meyve ve sebze tüketimiyle vücuda alınan besinlerin pankreas kanseri gelişimi riski azalmaktadır (Krejs, 2010).

Diyabet Mellitus; pankreas kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Uzun vadede tip 2 diyabet hastalarında pankreas kanserine yakalanma oranı %50 daha fazladır (Henry ve diğ., 2013). Yapılmış bir çalışmada pankreas kanseri hastalarına yapılan glikoz tolerans testi sonucunda hastaların %75'inin diyabet kriterlerini de taşıdığı görülmüştür (Permert ve diğ., 1993).

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Yaş; pankreas kanseri için 50 yaş ve üzerinde insidansı ve ölüm oranını yüksek bir risk faktörüdür. Özellikle 70-80 yaşlarında %80 teşhis oranıyla pankreas kanseri insidansı pik yapmaktadır. Pankreas kanseri nadir olarak aile hikayesinde veya genetik predispozisyon varlığında 45 yaş ve altında da gelişim gösterebilir (Muniraj ve diğ., 2013; Fraumeni, 1975).

Cinsiyet; pankreas kanserinin görülme sıklığını etkileyen risk faktörlerindedir. Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Bu da erkeklerdeki sigara kullanımının kadınlardan yüksek olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Muniraj ve diğ., 2013).

Etnik köken; pankreas kanseri için değiştirilemeyen risk faktörlerindedir. Afrikalı Amerikalılarda pankreas kanseri görülme oranı beyazlardan daha yüksektir (Kumar ve diğ., 2017). 2005 ila 2014 arasına bakıldığında pankreas kanserine bağlı ölüm oranlarında her yıl %0,3 oranında beyaz ırka ait erkeklerde artarken beyaz ırka ait kadınlarda sabit kalmıştır. Bununla birlikte siyah ırka ait kadın ve erkeklerde ise her yıl %0,5 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Anon., 2017).

Kronik pankreatit; pankreas kanseri için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Kalıtsal ve tropikal pankreatit erken yaşta geliştiğinde genel popülasyona kıyasla pankreas kanserine yakalanma ihtimali 50 kat daha fazladır. Kronik pankreatit ise pankreas kanseri için predispozan risk faktörüdür. Kronik pankreatit hastalarının %5 ve daha az kısmında 20 yıllık süre içerisinde pankreas kanseri gelişimi olmaktadır (Muniraj ve diğ., 2013).

Kalıtsal genetik yatkınlık; pankreas kanseri için değiştirilemeyen risk faktörlerinden biridir. Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %10'u ailevi bir dayanağa sahiptir. Ailenin pankreas kanseri öyküsü bireyin pankreas kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. BRCA2 mutasyonunda pankreas kanseri, meme, ovarian, prostat kanseri riski arttığı görülmüştür. Lynch sendromu (STK11), FAMMM (p16), HNPCC, Ataksi Telenjiektazi, Peutz-Jeghers sendromu (CDKN2A) artmış pankreas kanseri riski oluşturur (Kamisawa ve diğ., 2016).

Kan grubu; mekanizması tam olarak anlaşılamamış değiştirilemeyen bir risk faktörüdür. Yapılan bazı çalışmalarda kan grubu O ile karşılaştırıldığında AO, AA, BO veya BB kan gruplarına sahip kişilerin pankreas kanserine yakalanma olasılıkları daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Muniraj ve diğ., 2013).

2.1.4. Pankreas Kanseri Tanısı ve Evrelendirilmesi

Pankreas kanserinin çoğu kez hastalığın ileri evreleriyle birlikte ortaya çıkan belirtilerin ağırlaşmasıyla tanısı konulabilmektedir. Herhangi bir belirtisi olmayan kişiler için pankreas kanseri tanısı konulabilecek güvenilir spesifik bir test mevcut değildir. Klinikte, pankreas kanseri tümörlerinin %10'una lokal evrede, %90'ına ise lokal ileri ve metastatik evrede tanı konulabilmektedir (Chavalitdhamrong ve diğ., 2015). Pankreas kanserinin en sık görülen semptomları sarılık (%56), yorulma (%86), kilo kaybı (%85), karın ağrısı (%79), koyu renkli idrar (%59), mide bulantısı ve kusmadır (%35-40). Sarılık özellikle erken evrede bulunun hastalarda en sık görülen klinik tablodur (The Patient Education Resource Center , 2012).

Pankreas kanserinin tanısında, lokalizasyonunda, invazyonunu saptamada ve evrelemede; ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT), magnetik rezonans görüntüleme (MR), endoskopik retrograd kolanjiyo pankreatografi (ERCP), pozitron emisyon tomografisi (PET), ince iğne aspirasyonu (İİA), anjiyografi, laparoskopi gibi yöntemler kullanılmaktadır (GÖRAL, 2014). Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC) tarafından tüm kanser türlerinin evrelendirilmesini bazı standartlara dayandırmak amacıyla TNM sınıflandırma sistemini geliştirmiştir. TNM sistemi üç ana bilgi parçasına dayanmaktadır. T, primer tümörün boyutunu; N, lenf düğümlerine yayılımını; M, kanserin vücudun diğer organlarına yayılımını ifade eder. TNM sınıflandırma sistemi 6 ile 8 yıl arasında kanserdeki gelişmelere bağlı olarak güncelleştirilmektedir (Compton ve diğ., 2013).

Tablo 2.2: Pankreas kanseri anatomik evrelendirme (Compton ve diğ., 2013).

Evre	Prognostik Gruplar	Evre Tanımı
0	Tis, N0, M0	Karsinoma in situ, Bölgesel lenf nodu metastazı yok, uzak metastaz yok.
IA	T1, N0, M0	En büyük boyutu 2 cm veya daha küçük ve pankreasa sınırlı tümör, bölgesel lenf nodu metastazı yok, uzak metastaz yok.
IB	T2, N0, M0	En büyük boyutu 2 cm'den daha büyük ve pankreasa sınırlı tümör, bölgesel lenf nodu metastazı yok, uzak metastaz yok.
IIA	T3, N0, M0	Çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze olmadan pankreas dışına uzanım gösteren tümör, bölgesel lenf nodu metastazı yok, uzak metastaz yok.
IIB	T1-T3, N1, M0	Pankreasta sınırlıdır ya da pankreasın dışında büyür ancak çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze olmadan pankreas dışına uzanım gösteren tümör, bölgesel lenf nodu metastazı var, uzak metastaz yok.
III	T4, Herhangi N, M0	Çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze tümör (unrezektabl tümör), Bölgesel lenf nodu var/yok, Uzak metastaz yok.
IV	Herhangi T, Herhangi N, M1	Uzak metastaz var.

2.1.5. Pankreas Kanseri Tedavisi

Pankreas kanseri mevcut tedavi protokolleri; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve palyatif terapilerdir. Tümörün evresine ve periferik organlarla olan ilişkisine göre tedavi protokolüne karar verilir.

Küratif Tedavi

Cerrahi: Pankreas kanserinin geç belirti vermesi buna bağlı olarak hastalığın ileri evrelerdeyken teşhis edilmesi nedeniyle cerrahi yöntemler ile müdahale edilebilecek hastaların yüzdesi oldukça düşüktür. Buna rağmen pankreas kanserinin en etkin tedavisi tümörün cerrahi operasyon ile rezeksiyonudur. Tümörün lokalizasyonu ve boyutuna bağlı olarak cerrahi rezeksiyon tipi belirlenmektedir. Rezidüel hastalık düzeyine göre pankreas rezeksiyonları üçe ayrılmaktadır; R0, R1, R2. R0 rezeksiyonda tüm makroskopik ve mikroskopik tümör tamamen çıkarılmaktadır. R1 rezeksiyonda makroskopik tümör tamamen temizlenirken mikroskopik artık tümör odakları kalmaktadır. R2 rezeksiyonda makroskopik rezeksiyon kısmi olarak gerçekleşmektedir (Kafes, 2013; Tewari & Lobo, 2013).

Pankreas kanseri cerrahi tedavisinde farklı küratif rezeksiyon yöntemleri bulunmaktadır. Distal veya total pankreatoduodenektomi ile pankreas kuyruk ve gövde tümörlerinin rezeksiyonu gerçekleştirilir. Pankreasın kuyruk bölgesinde konumlanan ve boyutu 2 cm'den küçük olan tümörlere cerrahi müdahale etmek nispeten daha kolaydır. Ancak pankreas gövdesinden orijinlenmiş tümörlerde tümörün çevre dokulara ve hayati organlara sıçrama olasılığı yüksek olduğu için cerrahi rezeksiyon da güçtür.

Pankreas başı tümörleri cerrahi operasyonu Whipple ile mümkündür. Standart Whipple operasyonunda pankreas başı, safra kesesi, duodenumun bir kısmı, midenin küçük bir kısmı (pilor) ve pankreasın başındaki lenf bezlerinin rezeksiyonundan sonra pankreas ve sindirim organları; pankreas sindirim enzimleri, safra ve mide içeriği sindirim sırasında ince bağırsağa akacak şekilde yeniden bağlanır (Güneyi, 2005). Günümüzde pilor koruyucu Whipple operasyonları standart Whipple operasyonlarına göre daha çok tercih edilir. Pilor koruyucu Whipple operasyonu postoperatif gastrik fonksiyonların standart Whipple operasyonuna kıyasla daha iyi olması yönüyle avantajlıdır. Cerrahi müdahaleye uygun pankreas başı tümörleri için ortanca sağ kalım 11-20 ay ve 5 yıllık sağ kalım oranı %5- 20 arasındadır (Tseng ve diğ., 2003).

Prognoz ve adjuvan tedavi: Pankreas kanseri rezeksiyonundan sonra sağ kalım için en önemli prognostik belirteçler; lenf nodu durumu, tümör boyutu, tümör evresi ve rezeksiyon marjı durumudur.

Adjuvan tedavi postoperatif tedavi olarak tanımlanmaktadır Cerrahi operasyonlardan sonra hastalığın yeniden nüksetmesini önlemek ve bölgedeki mikroskobik tümör odaklarını temizlemek amacıyla cerrahi operasyonun ardından adjuvan kemoterapi ve adjuvan kemoradyoterapi uygulamaları yapılmaktadır. 1985 yılında GITSG (Gastrointestinal Tumor Study Group)'da yayınlanan bir çalışmada tek başına küratif amaçlı uygulanan cerrahi tedaviden sonra ortalama sağ kalım 11 ay iken cerrahi tedavinin ardından uygulanan adjuvan kemoradyoterapilerde ise 18 aya kadar çıktığı gözlemlenmiştir. 1999 yılında EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) çalışmasında, tek başına küratif amaçlı uygulanan cerrahi tedaviden sonra ortalama sağ kalım 12,6 ay olduğu gözlemlenirken cerrahi tedavinin ardından uygulanan adjuvan kemoradyoterapi kolunda seçilen hastalara radyoterapi yanında 5-FU (25mg/kg/gün) verilmiş ve hastalarda ortalama sağ kalımın 17,1 aya çıktığı gözlemlenmiştir (Neoptolemos ve diğ., 2001).

2004 yılında ESPAC-1 (European Study Group of Pancreatic Cancer) çalışmasında hastalar adjuvan kemoradyoterapi, adjuvan kemoterapi (5-FU ile folik asit), adjuvan kemoradyoterapi ardından kemoterapi ve Whipple operasyonu sonrası izlem olarak dört grupta ele alınmıştır. Çalışmada tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, lenf nodu yayılımı ve cerrahi sınırların ortalama sağ kalım üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonunda hiçbir grubun kontrol grubuna üstünlük göstermediği de belirtilmiştir (Neoptolemos ve diğ., 2018). ESPAC-3 çalışmasında genel sağkalım, progresyonsuz sağkalım ve yaşam kalitesi açısından cerrahi tedavinin ardından uygulanan gempitabin ile kombine olarak uygulanan 5-FU/folik asit (FUFA) arasında anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir (Neoptolemos ve diğ., 2012).

Whipple operasyonu sonrası adjuvan kemoradyoterapinin sinerjik etkisinin artırılmasını yönelik 2008 yılında RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) 9704 tarafından yapılan çalışmada hastalara kemoradyoterapi öncesinde ve sonrasında gempitabin veya 5-FU verilerek sağ kalım oranları incelenmiştir. Çalışmada gempitabin verilen hastalarda ortalama sağ kalım 20,5 ay iken 5-FU verilen hastalarda 16,9 ay olduğu gözlemlenmiştir (Regine ve diğ., 2011).

Neoadjuvan Kemoterapi ve Radyoterapi: Neoadjuvan tedavi preoperatif tedavi olarak tanımlanmaktadır.

Sınırlı vasküler tutulumu olan borderline rezektabl hastalarda uygulanan neoadjuvan tedavi, cerrahi operasyondan sonra lokal başarısızlık oranını ve pozitif rezeksiyon marjlarını azaltmaktadır. Lokal ileri evredeki hastalarda uygulanan neoadjuvan tedaviler sayesinde lokal tümör kontrolü sağlamak ya da tümör evresi/boyutu düşürülüp tümör rezektabl potansiyele getirilmektedir. Adjuvan kemoterapi uygulamalarında tümör yatağındaki kötü ilaç salınımı, adjuvan radyoterapi uygulamalarında ise oksijenasyonun azalmasından dolayı dokudaki radyasyona duyarlılığın azalması gibi komplikasyonlar yaşanabilmektedir. Neoadjuvan kemoterapi ve radyoterapilerde bu gibi komplikasyonların önüne geçilebilir. Neoadjuvan kemoterapilerde sık kullanılan ajanlar; 5-FU, irinotekan, kapesitabin, sisplatin, paklitaksel, dosetakseldir.

1987 ve 2000 yılları arasında randomize 116 hasta üzerinde neoadjuvan tedavilerin sağ kalım üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada 116 hastanın 61'ine neoadjuvan kemoterapi uygulanmıştır. 61 hastanın 35'ine 5-FU/mitomisin C verilirken 26'sına gemsitabin verilmiş ve harici radyasyon (5040 cGy) tedavisi uygulanmıştır. Neoadjuvan tedavinin ardından tüm hastalara küratif amaçlı cerrahi operasyon uygulanmış ve sonuç olarak neoadjuvan tedavi alan hastalarda ortanca sağ kalım süresi 23 ay iken neoadjuvan tedavi almayan hastalarda ortanca sağ kalımın 16 ay olduğu gözlemlenmiştir (Sasson ve diğ., 2003). Preoperatif kemoradyoterapi, kemoterapi veya her ikisi ile tedavi alan hastalarda ortanca sağ kalım tanı konulduktan sonra 2 ila 3 yıl aralığındadır (Tewari & Lobo, 2013).

Palyatif Tedavi

Klinikte, pankreas kanseri tümörlerinin %80-90'ına lokal ileri ve metastatik evrede tanı konulabilmektedir. Bu evredeki tümörlerin cerrahi operasyonu çoğu zaman mümkün değildir. Opere edilemeyen bu hastaların ortanca sağ kalımını artırmak, acılarını azaltmak, beslenme desteği sağlamak ve yaşam konforunu düzeltmek amacıyla kemoterapi/radyoterapi ile birlikte bazı girişimsel tedaviler uygulanmaktadır.

Kemoterapi: Hastanın performans durumu ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) veya Karnofsky gibi standart ölçütler kullanılarak sayısal olarak hesaplanır ve buna göre kemoterapi rejimine karar verilir. Hastanın performans skoru yüksekse kemoterapi ilaçları

kombin edilerek verilebilir. Gemcitabin, 5-FU veya kapesitabin en sık tercih edilen palyatif kemoterapi ilaçlarıdır.

Thierry Conroy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metastatik pankreas kanseri hastaları için en etkili palyatif tedavi protokollerini araştırmışlar ve sonuç olarak 5-FU, lökovorin, irinotekan ve oksaliplatin (FOLFIRINOX) kombinasyonu kemoterapi alan hastalarda ortanca sağ kalım 11,1 ay iken gemcitabin alan hastalarda sağ kalımın 6,8 ay olduğu gözlemlenmiştir (Conroy ve diğ., 2011).

Stent ve Cerrahi: Safra kanalının tıkanması sonucu sarılık olan ve cerrahi rezeksiyonun mümkün olmadığı pankreas kanseri hastalarına bu tıkanıklığın giderilmesi amacıyla palyatif tedaviler uygulanmaktadır. Bu amaçla semptomların giderilmesi ve yaşam kalitesinin artması için biliyer by-pass veya stent yerleştirilmesi uygulamaları yapılmaktadır.

Ablatif Teknikler: Radyofrekans ablasyon (RFA), mikrodalga termoterapi, kriyoterapi ve embolizasyon gibi çeşitli ablatif tedaviler ile lokal olarak tümör yıkımı sağlanmaktadır. RFA, dokularda ısı etkisiyle koagülasyon nekrozu oluşturarak tümörün yok olması sağlanır (Pai ve diğ., 2015). Mikrodalga ablasyonda ise elektromanyetik dalgalar polar su moleküllerinin hızla dönmesine neden olmakta, aktarılan enerji sitotoksik derecelerde ısıya çevrilerek tümörün yok olması sağlanır.

Kriyoablasyon hücre hasarı dondurma ve eritme fazlarındaki kompleks hücresel değişiklikler meydana getirerek tümörün yok edilmesi esasına dayanır (Niu ve diğ., 2016). Embolizasyon tümörü besleyen kan damarları kontrollü bir şekilde tıkanarak tümörün beslenmesi kesilir ve beslenemeyen tümör zamanla yok olur (Goode & Matson, 2014).

2.2. FOTODİNAMİK TERAPİ

2.2.1. Fotodinamik Terapinin Tarihsel Gelişimi

Fototerapi: Işığın terapötik bir ajan olarak kullanımı antik dönemlere kadar uzanmaktadır. Antik dönemlerde Mısırlılar, Çinliler ve Hintler tarafından vitiligo, raşitizm, sedef hastalığı, deri kanseri ve psikoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Evrensel ışık kaynağı olan güneş ışınlarını tarihte ilk defa 3000 yıl önce Yunanlılar kullanmıştır. 18. ve 19. yüzyılda güneş ışınları tüberküloz, raşitizm, romatizma, felç, ödem ve kas zayıflığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve helyoterapi olarak adlandırılmıştır. 20. yüzyılın başlarında Niels

Finsen modern Fototerapiyi geliştirmiştir. Yaptığı çalışmalarla kırmızı ışığın iek hastalığı püstüllerinin oluşumunu engellediğini; ultraviyole ışığın ise lupus vulgaris hastalığını tedavi ettiğini bulmuştur. Niels Finsen yaptığı bu çalışmalarla 1903 yılında tıp alanında Nobel ödülü kazanmıştır (Spikes, 1985; Daniell & Hill, 1991; Ackroyd ve diğ., 2001; Hönigsmann, 2013; Hönigsmann, 2013).

Günümüzde fototerapi dermatit ve sedef hastalığı başta olmak üzere dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte yeni doğan bebeklerin sarılık tedavisinde, psikiyatride mevsimsel duygu durum bozukluğu ve uyku bozukluğu gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Urbach ve diğ., 1976; Wentworth, 2005; Zanolli, 2013).

Fotokemoterapi: Fototerapi hastalığı ışık ile tedavi etmeyi amaçlamaktadır. Fotokemoterapi ise hastalığı ışığa duyarlı bir ajanın uygulanmasını takiben ajanın lokalize olduğu doku üzerine ışık hareketi ile tedavi etmeyi amaçlamaktadır. 1834 yılında Kalbrunner bergamot yağından ışığa duyarlı bir madde psoralen izole etmiş ancak teröpatik herhangi bir uygulamada kullanmamıştır. İlk fotokemoterapi denemeleri 1948 yılında Mısır'da El Mofty tarafından yapılmıştır. El Mofty psoralen ve güneş ışınlarını birlikte vitiligo hastalarının tedavisinde kullanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda topikal uygulanan psoralen ve UV ışınları birlikte sedef hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Levine ve diğ., 1989; Fahmy & Abushady, 1947; Fahmy & Abushady, 1948; Allyn, 1962).

Fotodinamik Terapi: 20. yüzyılın başlarında fototerapi ve fotokemoterapinin gelişimine paralel olarak Herman von Tappeiner ve Oscar Raab Fotodinamik Terapi'nin temellerinin atıldığı öncü çalışmalar yapmışlardır. Herman von Tappeiner ve Oscar Raab yaptıkları çalışmada ışığa duyarlı ajan olarak akridin kimyasalı ve görünür ışığın paramesyum kültürü üzerindeki etkisini gözlemlədiler. Bu çalışmaların sonunda uygulanan tedavi protokolünün paramesyum üzerinde toksik bir etki oluşturduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise bu toksik etkinin oluşabilmesi için ortamda oksijene ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir. 1904 yılında gözlemlerini 'Fotodinamik Eylem' olarak tanımlamışlardır (Simplicio ve diğ., 2002; Almeida ve diğ., 2004; Agostinis ve diğ., 2004). Fotodinamik terapide yaygın olarak kullanılan Hematoporfirin (HpD)'nin klinikte ilk uygulaması 1911 yılında W. Hausman tarafından yapılmıştır (Hausmann, 1911). 1913 yılında Meyer-Betz 200 mg Hematoporfirin (HpD) kendi vücuduna enjekte ettikten sonra 2 ay boyunca güneş ışığına maruz kaldığında fototoksik reaksiyonlar yaşamıştır (Meyer-Betz, 1913). 1942 yılında Auler ve

Banzer sistemik uygulamadan sonra porfirin floresans ışması ile porfirinlerin sıçanların tümör dokusunda seçiciliğini keşfettiler. 1955 yılında Samuel Schwartz Hematoporfirin (HpD) türevini geliştirdi. Lipson ve Baldes floresans ışma ile bileşiğın tümör dokuda lokalize olduğunu bildirmiştir (Jain ve diğ., 2003). 1966 yılında Lipson ve arkadaşları tarafından Mayo Kliniklerinde meme tümörü dokusunda Hematoporfirin (HpD)'nin lokalize olması ve tümörün görünür hale geldiğini göstermişlerdir (Withers & Peters, 1988; Kessel, 1992). 1978 yılında ilk sistematik Fotodinamik terapi çalışma Roswell Park Kanser Enstitüsü'nde (New York, Amerika) Dr. Thomas Dougherty kutanöz ve subkutanöz tümörü olan 113 hastaya Hematoporfirin (HpD) verildikten sonra kırmızı ışığa maruz bırakılmış ve 111 hastanın bu tedaviye kısmi veya tam bir yanıt verdiğı gözlemlenmiştir. 1993 yılında klinik kullanım için Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration (FDA))'dan onay olan ilk ışığa duyarlı ajan Photofrin® (porfimer sodium)'dur (Usuda ve diğ., 2006).

O tarihten sonra Fotodinamik terapi, yapılan yeni çalışmalarla birlikte giderek gelişmiş birçok kanser türü başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmış ve alternatif tedavi yöntemleri arasında yerini almıştır (Baltazar ve diğ., 2015).

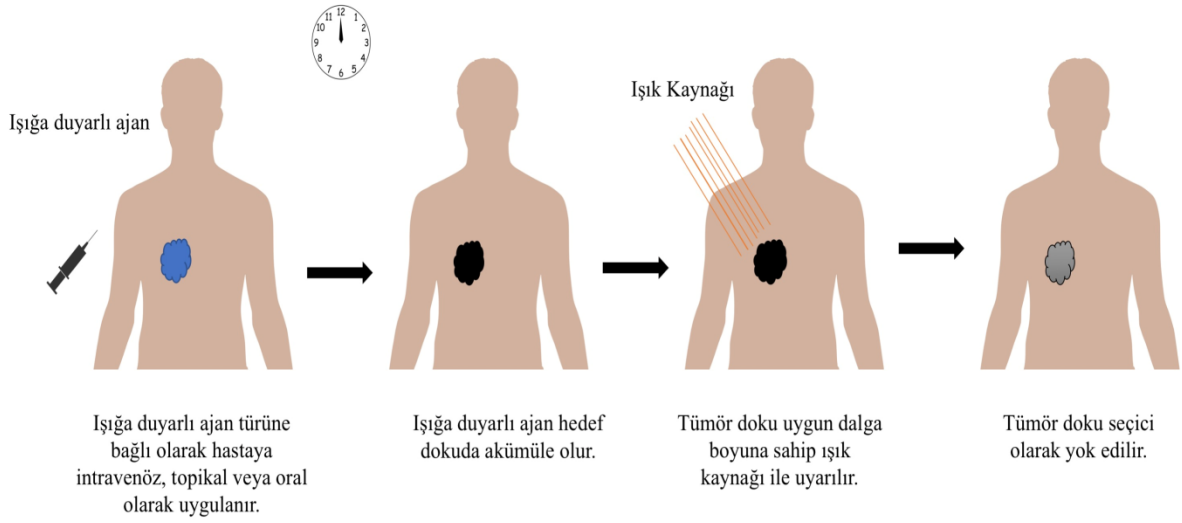
2.2.2. Fotodinamik Terapinin Tanımı ve Aksiyon Mekanizması

Fotodinamik terapi Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration (FDA)) tarafından onaylanmış başta onkolojik, dermatolojik ve oftalmolojik endikasyonlar olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan alternatif bir tedavi yöntemidir (Agostinis ve diğ., 2011; Gürsoy ve diğ., 2012).

Fotodinamik terapi ışığa duyarlı ajan, ışık ve oksijen olmak üzere üç komponent içeren iki aşamalı bir tedavi yöntemidir. Bu üç bileşenin her biri tek başına zararsız iken birlikte uygun kombinasyonlarla bir araya geldiklerinde singlet oksijen ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak hücre zarına ve/veya organellere zarar vermektedir (Konopka & Goslinski, 2007; Dolmans ve diğ., 2003; Bacellar ve diğ., 2015; Straten ve diğ., 2017)

Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizması halen araştırma konusudur. Buna rağmen kabul edilmiş aksiyon mekanizmasının moleküler etkisi, ışık ile aktif hale getirilen ışığa duyarlı ajanın reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturması sonucu diğer moleküller ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır.

Fotodinamik terapinin genel tedavi prosedürü sırasında ışığa duyarlı ajan türüne bağlı olarak hastaya intravenöz, topikal veya oral olarak uygulanır ve hedef dokuda akümüle olduktan sonra ışığa duyarlı ajanın absorbe ettiği aralıkta uygun dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile uyarılması şeklindedir. Şekil 2.3’de Fotodinamik terapinin genel tedavi prosedürü ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Şekil 2.3) (Brown ve diğ., 2004; Abrahamse & Hamblin, 2016; Foote, 1968).

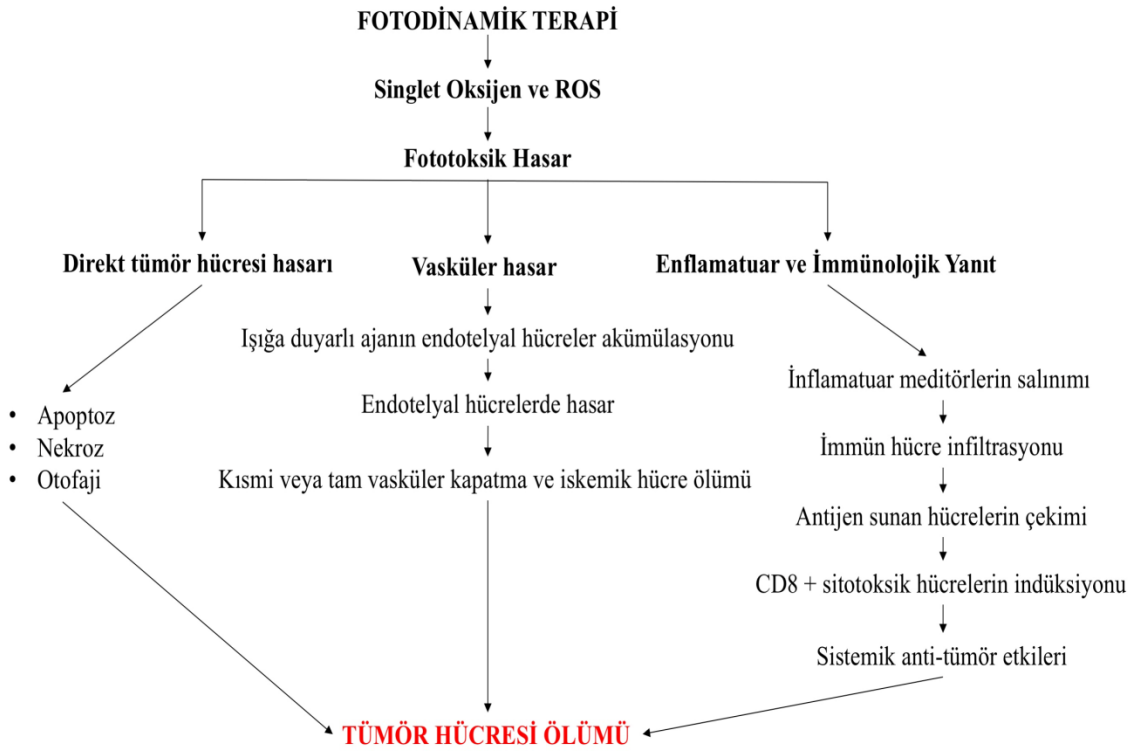


Şekil 2.2: Fotodinamik terapinin genel tedavi prosedürü.

Aktif hale gelen ışığa duyarlı ajan bir dizi fotokimyasal reaksiyonlar meydana getirmektedir. Uygun dalga boyundaki ışığı absorbe eden ışığa duyarlı ajan foton emilimi yaparak düşük enerji seviyesine sahip tekil durumdan (S_0) uyarılmış tekil duruma geçer (S_1). Kararsız ve kısa ömürlü uyarılmış tekil durumdaki (S_1) enerji seviyesinde bulunan ışığa duyarlı ajan tekrar taban seviyesine (S_0) geri dönebilir ve enerjisini foton enerjisi olarak yayabilir. Bu geçiş floresans ışımaya olarak adlandırılır ve tıpta teşhis ve optik izleme amaçlı kullanılabilir (Wagnieres ve diğ., 1998). Buna karşılık olarak uyarılmış tekil durumda bulunan (S_1) ışığa duyarlı ajan daha yüksek enerji seviyesine sahip uyarılmış üçlü duruma (T_1) geçebilir. Uyarılmış üçlü durumda (T_1) bulunan ışığa duyarlı ajan düşük enerji seviyesine sahip tekil duruma (S_0) geri dönebilir ve bu geçiş fosforesans ışımaya olarak adlandırılır. Fosforesans, floresansa kıyasla daha uzun süren bir ışımadır. Alternatif olarak uyarılmış üçlü durumda (T_1) bulunan ışığa duyarlı ajan enerjisini moleküler oksijene veya biyolojik substratlara aktararak Tip I veya Tip II reaksiyonları aracılığıyla

özelliklerine bağlı olarak direkt ve indirekt tümör yıkımı şeklinde gerçekleşmektedir (De Rosa& Bentley, 2000; Castano ve diğ., 2004; Juzeniene & Moan, 2007; Plaetzer ve diğ., 2008). Bunlar;

- Direkt tümör hücresi hasarı (apoptoz, nekroz ve otofaji),
- Vasküler hasar ve
- Enflamatuar ve immünolojik yanıt (Şekil 2.5) (Robertson ve diğ., 2009).

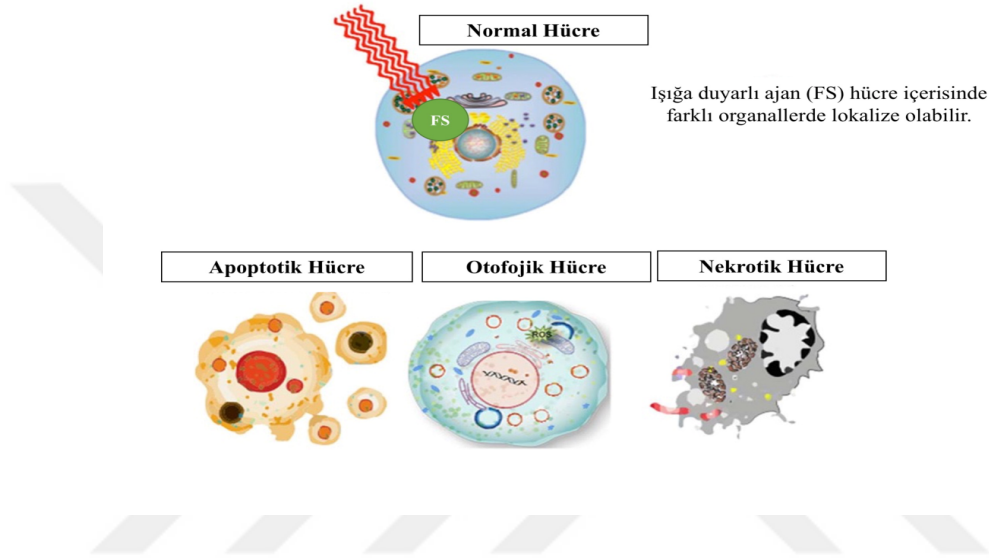


Şekil 2.4: Fotodinamik terapinin anti-tümör etkilerinin şematik görünümü.

2.2.3.1. Direkt Tümör Hücresi Hasarı

Fotodinamik terapi sırasında açığa çıkan reaktif oksijenlerin ömürleri 0.04 mikro saniyen kısa ve etki alanları 0.02 µm çapındadır. Dolayısıyla ışığa duyarlı ajan hücre içerisinde lokalize olduğu alan ve çok yakın çevresinde fotodinamik hasar sonucu tümör yıkımı meydana getirebilir. Bunlar fotodinamik terapinin direkt etkileridir. Işığa duyarlı ajanın hücre içerisinde lokalize olduğu yer ışığa duyarlı ajanın iyon yüküne, hidrofobikliğin derecesi (-4 ile +4 arasında) ve asimetri derecesine bağlıdır. Hidrofobikliğin derecesi 2 ve daha düşük olan ışığa duyarlı ajanlar hücre membranını geçerek hücre içindeki organelere tutulma eğilimindedirler.

Hidrofobikliğinin derecesi negatif olan ışığa duyarlı ajanlar ise hücre membranı boyunca tutulma eğilimindedirler ve endositoz aracılığı ile hücre içerisine alınırlar. Işığa duyarlı ajanların çoğu çekirdekte birikmez dolayısıyla mutasyonlara neden olma ihtimali çok düşüktür. Fotodinamik terapi apoptoz, nekroz veya otofaji gibi hücre ölümlerine neden olarak dokuda direkt tümör hücresi yıkımını sağlayabilir (Şekil 2.5) (Castano ve diğ., 2004).



Şekil 2.5: Fotodinamik terapi sonrasında muhtemel direkt tümör hücresi yıkımları.

Apoptoz; sistematik süreçler içeren kontrollü hücre ölüm mekanizmasıdır. Farklı organellerin fotodinamik terapi kaynaklı hasarını takip eden birçok yolak izleyerek başlatılabilir.

Fotodinamik terapi sırasında endoplazmik retikulum ve mitokondride lokalize olan ışığa duyarlı ajanların apoptozu indükleyebilir (Oleinick ve diğ., 2002). Mitokondride meydana gelen hasar membran permeabilitesinin bozulmasına ve mitokondrinin membranında bulunan sitokrom-c sitoplazmaya sızmasına neden olur. Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve prokaspaz-9 sitoplazmada bulunan sitokrom-c ile bağlanıp apoptozom adında bir kompleks oluşturarak kaspaz-3, 7, 6, 2, 9 'un aktifleşmesini sağlar. Bu kaspazlar apoptotik yolağı aktifleştirirler (Maccormack, 2008; Mroz ve diğ., 2011; Buytaert ve diğ., 2007).

Endoplazmik retikulumun hücre içi kalsiyum homeostazının korunması, protein sentezi, posttransyonal modifikasyon ve proteinler doğru katlanmasında önemli görevleri vardır. Endoplazmik retikulum fotodinamik terapiden kaynaklı strese sitozolik Ca^{+2} 'un artmasına ve endoplazmik retikulumun membranında lokalize olan kaspaz-12'nin aktifleşmesine ve

sitoplazmaya geçmesine neden olarak apoptotik yolağın aktifleşmesini sağlar (Kessel ve diğ., 2006; Moserova & Kralova, 2012).

Tüm bunların yanında yapılan çalışmalar fotodinamik terapi sırasında düşük dozlarda ışığa duyarlı ajan konsantrasyonu ve ışık kaynağı kullanılması tedavinin apoptoz ile hücre yıkımına neden olma eğiliminde olduğunu göstermektedir (Lennon ve diğ., 1991; Mroz ve diğ., 2011; Noodt ve diğ., 1996).

Nekroz; programlanmamış patolojik hücre ölüm mekanizmasıdır. Hücrenin şişmesi, organellerin zarar görmesi, plazma membranının parçalanmasıyla birlikte hücre içi serbest bırakılır ve hücrel inflamasyonun meydana gelmesiyle karakterize edilir.

Fotodinamik terapi sırasında hücreyi nekroza sürükleyen mekanizmalar halen araştırma konusudur. Bununla birlikte ışığa duyarlı ajanın hücre membranında lokalize olması ve burada meydana gelen hasar sonucu hücrenin nekroza sürüklendiğini de belirten çalışmalar mevcuttur. Işığa duyarlı ajanın hücre membranında akümüle olması fotodinamik terapi sırasında membrandaki fosfolipitlerin ve kolesterolün peroksidasyonuna neden olmaktadır. Bu durumun membran yapısının bozulmasına ve nekrozun başlamasına neden olduğu belirlenmiştir (Finger, 1996; Henderson, 1992; Geiger ve diğ., 1995; Delebe ve diğ., 2015; Castano ve diğ., 2006; Hsieh ve diğ., 2003).

Tüm bunların yanında yapılan çalışmalar fotodinamik terapi sırasında yüksek dozlarda ışığa duyarlı ajan konsantrasyonu ve ışık kaynağı kullanılması tedavinin nekroz ile hücre yıkımına neden olma eğiliminde olduğunu göstermektedir.

Apoptoz ve nekroza ait özellikler Tablo 2.3' de verilmiştir.

Otofaji; apoptoz ve nekroza farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Otofaji tip II programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanan hücrenin kendi kendine yıkıma uğrattığı bir süreçtir. Otofaji hasarlı organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin endozomal-lizozomal sistem yoluyla yıkımını sağlamaktadır. Otofaji kromatin yoğunlaşma olmadan büyük sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize edilir (Ouyang ve diğ., 2018).

Fotodinamik terapi sırasında hücrelerde otofajinin rolü tartışmalı olmasına rağmen yapılan bazı çalışmalarda otofaji ve hücre ölümleri arasında ROS oluşumuna dayanan bir ilişki olduğu

gösterilmektedir. Bununla birlikte ışığa duyarlı ajanın lizozomda lokalize olması ve burada meydana gelen hasar sonucu hücrenin otofajiye sürüklendiğini de belirten çalışmalar mevcuttur (Inguscio ve diğ., 2012; Panzarini ve diğ., 2011; Reiners Jr ve diğ., 2010). Otofaji, tümör oluşumunu inhibe eden aynı zamanda otofajiyi teşvik eden Beclin-1 proteini tarafından düzenlenir. Prootofajik protein Beclin-1 Bcl-2 ile bağlandığı bilinmektedir. Bcl-2 ise fotodinamik terapinin klinik çalışma ve araştırmalarında sıkça rastlanan tedavi sırasında foto hasar olarak fonksiyon kaybeden bir proteindir. Bcl-2'nin fonksiyon kaybetmesi ise otofajinin başlamasına yol açabilir (Scherz-Shouval ve diğ., 2007; Yu ve diğ., 2006).

Tablo 2.3: Apoptoz ve nekroz özellikleri.

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol Açan Nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddeler Ağır metaller Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler
Morfolojik Özellikler	Hücre membran bütünlüğü kaybolur Hücre şişer Büyük vakuoller oluşur Organeller parçalanır Hücre lizisi gerçekleşir Fosfatidilserin translokasyonu yoktur	Hücre membranı sağlamdır Hücre küçülür Blebler oluşur Kromatin kondensasyonu gerçekleşir Organeller sağlamdır Apoptotik cisimcikler oluşur Erken evrede fosfatidilserin translokasyonu gözlenir
Biyokimyasal Özellikler	İyon dengesi bozulur ATP gerekmez DNA rastgele parçalanır	Programlıdır ATP gerektirir DNA kırıkları merdiven şeklini alır
Diğer Özellikler	Hücre gruplar halinde ölür Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır Enflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Makrofajlar tarafından fagosite edilirler Enflamasyon görülmez

2.2.3.2. Vasküler Hasar

Anjiogenezis; kanser hücrelerinin yayılması, proliferasyonu, onlara besin ve oksijen taşınması için son derece önemlidir. Bu nedenle seçici olarak mikrovasküler hasar ve anjiogenezis oluşumunun engellenmesi fotodinamik terapinin etkinliğinin artması için önemlidir. Fotodinamik terapi sırasında vasküler hasar oluşan hipoksi ve beraberindeki besin maddelerinin yoksunluğu sonucu meydana gelmektedir. Genel olarak zayıf ve inkomplet hücresel sınırlara sahip olan yeni oluşan bu damarlar ışığa duyarlı ajanın akümüasyonu için avantaj teşkil etmektedir (Fingar ve diğ.). Bununla birlikte ışığa duyarlı ajanlar endotel hücreleri ve tümör mikrovasküler endoteline güçlü bir afinite ile tutunurlar. Çünkü fotodinamik terapi sırasında indüklenen ışığa duyarlı ajan kanda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) veya düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) gibi taşıyıcı moleküllere bağlanır ve bu moleküller endotel hücreleri ve tümör mikrovasküler endoteline özgü çok sayıda spesifik reseptör bulundurmaktadır (Bhuvaneswari ve diğ., 2009; Krammer, 2001). Endotele lokalize olan ışığa duyarlı ajanın aktive olmasıyla birlikte kan dolaşımının sınırlanmasını veya endotel hücrelerin hasar görmesine neden olur. Birincil etkilerin devamı olarak fotodinamik terapi sonrasında trombojenik bölgeler oluşur ve trombosit agregasyonu, vazoaaktif moleküllerin salınımı vazokonstrüksiyona, damar geçirgenliğinde artışa, trombosit aktivasyonuna, kan akımında staza ve damar sisteminin kapanması gibi bir dizi reaksiyon meydana gelir (Lucky ve diğ., 2015; Abels, 2004).

2.2.3.3. Enflamatuvar ve İmmünolojik Yanıtı

Anti-tümör spesifik immün süreç ve konak immün sistemin güçlendirilmesi fotodinamik terapi sonrasında tam tümör kontrolü ve/veya tam tümör yanıtı için önemli rol oynamaktadır. Fotodinamik terapinin tümör hücrelerinde nekrozu indüklemesine müteakip enflamatuvar yanıt oluşturarak anti tümör bir yanıtın oluşmasını sağlar. Fotodinamik terapi tümörün mikro çevresini değiştirerek çeşitli vazoaaktif maddeler, kompleman bileşenleri ve pıhtılaşma kaskadları, proteinazlar, peroksidazlar, ROS, lökosit kemoatraktanlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer immünoregülatörler ve akut faz yanıtı meditörlerinin salınımını uyarır. Birçok stres türüne yanıt olarak hücreler ısı şok proteinleri üretir. Vücut fotodinamik terapi ile kaynaklanan tümör dokusu hasarını tanır ve tedavi edilen bölgeye nötrofillerin ve makrofajların salınımı sağlar. Bununla birlikte anti tümör bağışıklığı aktifleştirilmiş antijen sunucu hücrelerin varlığına bağlıdır ve fotodinamik terapi antijen sunucu hücrelerin aktivitesini artırabilir ve CD4 yardımcı T lenfositleri salgılanarak CD8 sitotoksik T hücrelerini aktive edebilir ve nekrozu

indükleyebilir. Aynı zamanda apoptoza neden olarak uzun süreli tümör kontrolünü sağlayabilir (Allison & Moghissi, 2013; Nowis ve diğ., 2005; Nowis ve diğ., 2005). Rabdomiyosarkom taşıyan sıçan modeli üzerinde yapılan bir çalışmada fotodinamik terapinin bağışıklık sistemi üzerine etkisinin araştırılmıştır. Çalışmada fotodinamik terapinin dolaşımdaki nötrofilleri artırdığı ve tümör büyümesini yavaşlattığı gözlemlenmiştir. Kompleman sistem bileşenleri biyokimyasal kaskadlardır ve otuzdan fazla serum ve hücre yüzey proteinleri içermektedir. Aktifleştirilen kompleman sistem fotodinamik terapi tarafından konukçu tepkisi olarak tanımlanan önemli bir unsurdur. Kompleman sistem sadece doğrudan enflamasyon aracı olarak değil aynı zamanda sitokinler, interlökin-1 beta (IL-1 beta), TNF-alfa, IL-6, IL-10, granülosit koloni-uyarıcı faktör, tromboksan, prostaglandinler, lökotrienler, histamin ve koagülasyon faktörleri gibi bir düzine ikincil enflamatuvar moleküllerin salınımını da uyarır (Vree ve diğ., 1996; Gollnick ve diğ., 2006; Walport, 2001; Stott & Korbelik, 2007; Korbelik & Cecic, 2008).

2.2.4. Fotodinamik Terapinin Komponentleri

2.2.4.1. Işığa Duyarlı Ajanlar

Fotodinamik terapinin üç komponentinden biri olan ışığa duyarlı ajanlar hedeflenen bölgede akümüle olup uygun dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile uyarıldıktan sonra gelen enerjiyi absorbe eden ve bu enerjiyi ortamdaki biyomoleküllere transfer eden doğal veya sentetik yapıdaki bileşiklerdir. Fotodinamik terapinin başarılı olabilmesi için seçilen ışığa duyarlı ajanın sahip olduğu kimyasal, biyolojik ve foto-fiziksel özellikleri önemlidir.

İdeal bir ışığa duyarlı ajanın sahip olması gereken başlıca özellikler şunlardır;

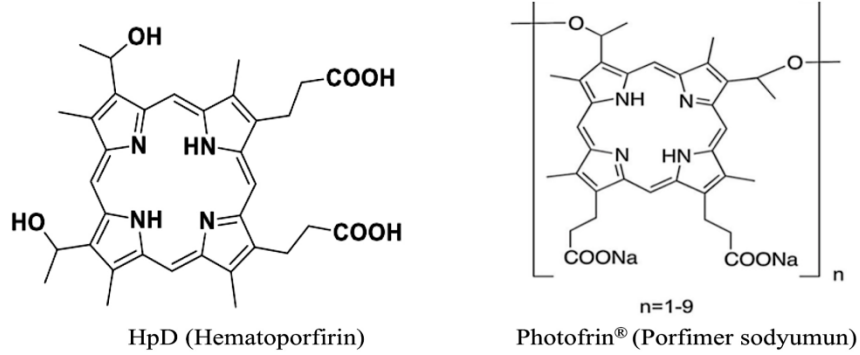
- Kolay elde edilebilir olması, düşük üretim maliyeti ve depolandığında uzun süre stabil kalıp bozulmaması için saf kimyasal yapıda olmalı,
- Tümör dokuda çevre dokuya kıyasla seçicilik göstererek akümüle olmalı,
- Hücre içerisine kolay alınabilmesi için hidrofobik yapıda olmalı ancak sistemik olarak verilen ışığa duyarlı ajanların amfilik yapıda olması tercih edilir. Böylelikle ışığa duyarlı ajanın engelsiz bir şekilde tümör dokuya ulaşması hedeflenir (Calzavara-Pinton ve diğ., 2007; Kessel & Woodburn, 1993; Luo & Kessel, 1997).
- Karanlıkta toksik etkisi olmamalı ancak uygun dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile uyarıldığında toksik etki göstermeli,
- Deri ve epitel dokulardan hızlıca temizlenebilmeli,

- Kıızıl ve kızıl ötesi spektrumda (600-800 nm) güçlü bir absorbsiyona sahip olmalı çünkü 800 nm dalga boyundan daha uzun dalga boylarında tek foton absorbsiyonu oksijeni harekete geçirmek için yeterli enerji sağlayamaz.
- Işığın dokudaki penetrasyon derinliğini artırmak için 700 nm üzerindeki dalga boylarında yüksek absorbsiyona sahip olmalı çünkü hemoglobinin gibi endojen moleküller ve dokuda bulunan su 700 nm'nin altında güçlü emilime sahiptir bu da ışığın penetrasyon derinliğini sınırlandırmaktadır.
- Uyarılmış üçlü durumdaki (T_1) ömrü uzun olmalı,
- Güçlü singlet oksijen kuantum verimine sahip olmalı böylece ışığa duyarlı ajanın uyarılmasından sonra çok miktarda reaktif oksijen türünün üretimi sağlayabilir (Meisel & Kocher, 2005; DeRosa & Crutchley, 2002; Pinheiro ve diğ., 2009; Sigusch ve diğ., 2005; Allison ve diğ., 2004).

Bu birbirinden farklı birçok özelliği taşıyan bir ajanı bulmak ve geliştirmek, ışığa duyarlı ajan olarak nitelendirmek oldukça zordur. Bununla birlikte bütün bu gereksinimleri karşılamayan birçok ışığa duyarlı ajan klinikte kullanım için onay almıştır. Bu ajanlar daha çok birinci ve ikinci nesil ışığa duyarlı ajanlardır.

Photofrin[®] ve HpD Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration (FDA)) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency (EMA)) tarafından klinikte kanser ve pre-kanser tedavisinde kullanım için onaylanmış birinci nesil ışığa duyarlı ajanlardır. Çeşitli monomerik, dimerik ve oligomerik porfirinlerin karışımından oluşan komplekslerdir. Photofrin[®]'nin maksimum dalga boyunda ışık emilim yoğunluğu düşüktür. Işık emilim yoğunluğunun düşük olması 630 nm'de yani maksimum absorbsiyon yaptığı dalga boyunda ışığı zayıf bir şekilde emdiği anlamına gelmektedir. Işık emilim değerinin yüksek olması fotodinamik etkinin de potansiyelinin artırmaktadır. Bununla birlikte 630 nm'nin dokudaki penetrasyon derinliği 2-3 mm ile sınırlı olduğu için yüzeysel tümörlerin tedavisinde kullanılmasıyla sınırlı kalmasına neden olmaktadır. Tümör doku seçicilikleri oldukça düşüktür buna bağlı olarak cilt fototoksitesisi 4 ila 6 hafta devam etmektedir bu da kullanan hastaların suni ve gün ışığından kaçınmaları gerektiğini göstermektedir. Ajanın hastaya verilmesi ile ışıkla uyarılması arasında geçen sürenin fazla olması (48-72 saat) birinci nesil ajanların dezavantajları arasındadır (Allison ve diğ., 2004; O'Connor ve diğ., 2009). Bu dezavantajların üstesinden gelmek, tedavi etkinliğini artırmak, cilt fototoksitesisine sahip olmayan ve tümör seçici ajanların geliştirmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır.

HpD ve Photofrin®'nin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



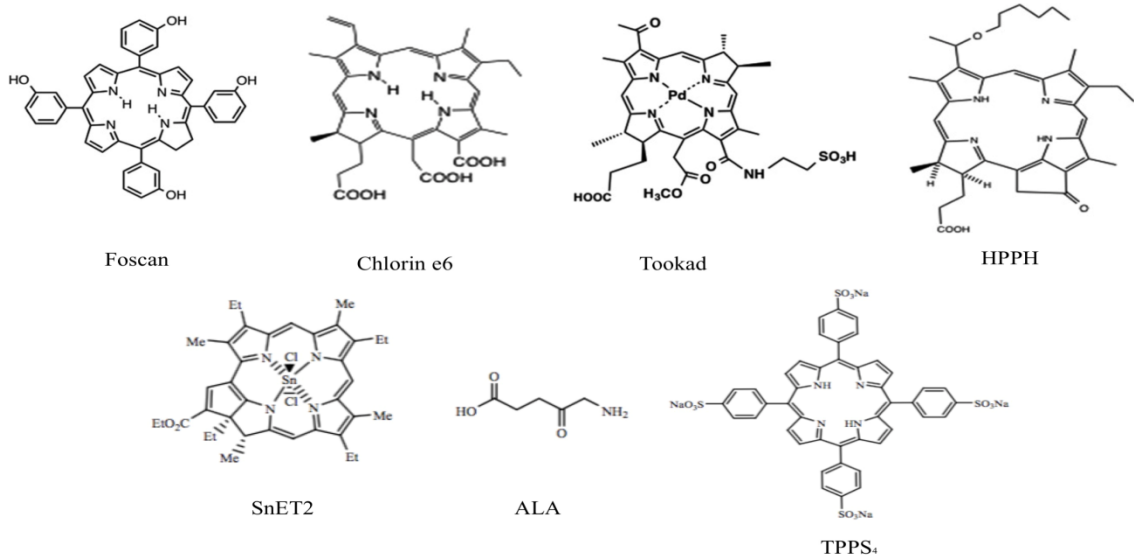
Şekil 2.6: HpD ve Photofrin®'nin kimyasal yapısı.

Porfrin içeren porfirinoid bileşikler veya klorinler, bakteriyoklorinler, ftalosiyaninler, feoforbidler, bakteriyoforbidler, teksafrinler gibi porfrin bazlı makrosiklik yapılar ayrıca porfirinoid olmayan antrakinonlar, fenotiyazinler, ksantanlar, siyaninler, kurkuminodler gibi bilinen kimyasal yapılara sahip olan bileşikler ikinci nesil ışığa duyarlı ajanlar olarak bilinirler. Birinci nesil ışığa duyarlı ajanların aksine 630 nm dalga boyundan daha uzun dalga boylarında maksimum absorpsiyon yaparlar böylece dokuda daha derine penetre olabilirler. İkinci nesil ışığa duyarlı ajanların singlet oksijen kuantum verimi daha güçlüdür. Buna ek olarak tümör dokuda normal dokuya kıyasla daha iyi ve daha kısa sürede akümüle olurlar bu da daha iyi bir anti tümör etki göstermelerini ve tedavi süresinin kısalmasını sağlamaktadır. Buna bağlı olarak hastadaki gün ve suni ışığa karşı olan cilt fototoksitesisi daha kısa sürmektedir (Zhang ve diğ., 2018).

Işığa duyarlı ajanların özellikleri büyük ölçüde kimyasal ve fiziksel parametrelere bağlıdır. Amino-levulinik asit (ALA), mono-L-aspartil klorin e6 (MACE), Lutexaphyrin, AIPcS4, tetrafenilporfin (TPPS3, TPPS4) gibi bazı ikinci nesil ışığa duyarlı ajanlar hidrofildir. Chlorin e6 (Ce6), meta-tetrahidroksifenilchlorin (mTHPP), bakterio-kloropil-a, 2-[1-oksoasetil]-2 devinilpirofeophorbid-a (HPPH), Tookad, SnET2 gibi porfirin halka yapılarından oluşanlar ve süstitüe edilmemiş ftalosiyaninler gibi bazı ikinci nesil ışığa duyarlı ajanlar ise yüksek ölçüde hidrofobiktir. Işığa duyarlı ajanın hidrofobikliğinin derecesi; hastaya uygulama yolunu ve ajanın biyodağılımı/farmakokinetik profilini etkilemektedir. Hidrofobik ajanlar tümör dokuda normal dokuya 7:1 ila 8:1 oranla; hidrofilik ajanlar ise 2:1 oranla daha çok akümüle

olmaktadırlar. Hidrofobik karakteristiği olan ajanlar hücre membranından içeri nüfuz edip hücre içinde lokalize olmasına rağmen sulu çözeltilerde özellikle sistemik olarak hastaya verilen ajanlar fizyolojik ortamda agregat oluşturabilir bu da yetersiz biyodağılım sebebiyle ajanın foto-fiziksel ve anti tümör özelliklerini etkileyebilir. Buna ek olarak hidrofobik olan ajanların fizyolojik çözücüler ve vücut sıvılarında yetersiz çözünürlüğü klinik uygulamalarını sınırlandırabilir. Dolayısıyla klinik olarak başarılı bir ışığa duyarlı ajanın hidrofobisite ve lipofilisite derecesi arasında bir denge olmalıdır.

Bazı ikinci nesil ışığa duyarlı ajanların kimyasal yapısı Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.7: Bazı ikinci nesil ışığa duyarlı ajanların kimyasal yapısı.

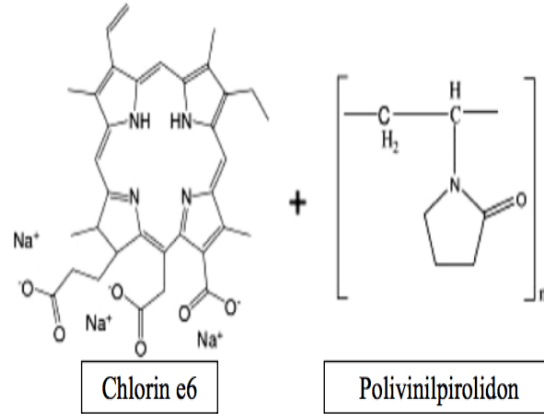
Daha etkin bir fotodinamik terapi amacıyla daha uzun dalga boyuna sahip ışık kaynakları ile aktive edilebilen, ışığa hassasiyet süresi daha kısa olan ve en önemlisi tümöre özgü olarak akümüle olan üçüncü nesil ışığa duyarlı ajanların geliştirilmesi üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bunu mevcut ışığa duyarlı ajanları ya tümöre özgü hedeflenmesini sağlamak amacıyla peptitler, antikorlar modifiye edip ya da dokuya verimli bir şekilde taşınmasını sağlamak amacıyla enkapsüle edip değiştirmek suretiyle yapılabilir.

Tablo 2.4: Klimikte kullanılan bazı ışığa duyarlı ajanlar ve kullanım alanları.

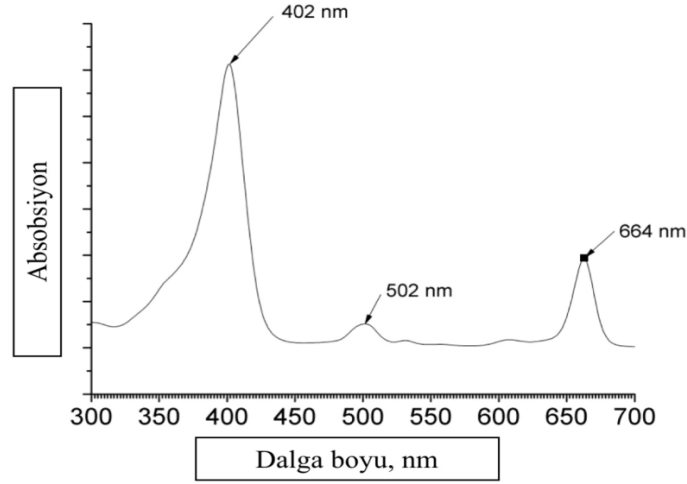
Sınıf	Işığa Duyarlı Ajan	Marka Adı	Dalga boyu (nm)	Kanser Türü	Onaylı Olduğu Ülke
Hematoporfirin	Hematoporphyrin derivative (HpD)	Photofrin	630 nm	Endobronşiyal küçük olmayan akciğer kanseri, özafagus kanseri, mesane kanseri, mide kanseri ve servikal kanser.	Kanada (1993), Japonya (1994), Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (1995), Şu anda kırktan fazla ülke tarafından onaylandı
		Photogem			
Protoporfirin ön ilacı	5-ALA	Levulan	635 nm	Aktinik keratoz tedavisi, bazal hücreli karsinom, baş ve boyun ve jinekolojik tümörlerin tedavisi. Beyin, baş ve boyun ve	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (1999) ve Avrupa (2001) tarafından onaylandı
	5-ALA-hexylester/H-ALA	Hexvix	375 -400 nm	Mesane tümörlerin tanısı.	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu tarafından onaylandı (2010)
		Cysview			
	5-ALA-methylester/M-ALA	5-ALA-benzylester	Metvixia	635 nm	Aktinik keratoz, Bowen hastalığı ve hücre karsinomu
Benzvix			Henüz onaylanmadı		
Klorinler	Meta-tetrahidroksipeni klorin (m-THPC)/Temoporfirin	Foscan	652 nm	Baş ve boyun, prostat ve pankreas tümörleri.	Avrupa' da onaylandı (2001)
		Aptocine	644 nm	Akciğer kanseri ve çeşitli kökenlerden katı tümörler	Japonya' da onaylandı (2003)

2.2.4.2 Fotolon ile Fotodinamik Terapi

Fotolon deri tümörlerinin ve intraoküler organların mukozal malignitelerinin fotodinamik tanısı ve tedavisi için 2001 yılında Belarus Cumhuriyeti'nden 2004 yılında ise Rusya Federasyonu tarafından onaylanmıştır. Fotolon 1:1 oranına sahip chlorine6 ve polivinilpirolidon (PVP) bileşiğidir ve Şekil 2.9'da Fotolon'un kimyasal yapısı gösterilmiştir. Chlorin e6'nın hidrofilik PVP ile bağlanması Fotolon'un da hidrofilik bir yapıda olmasını sağlamıştır. Dolayısıyla suda ve alkol içerisinde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Fotolon 640 nm ve 680 nm arasında yoğun absorpsiyon bandına sahiptir, en yoğun absorpsiyonu 660 nm de yapmaktadır ve absorpsiyon bandı Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Fotolon chlorine e6 ile kıyaslandığında stabilitesi, çözünürlüğü, biyoelverişliliği ve ışığa duyar etkisi yönünden kıyaslandığında avantajlıdır. Bununla birlikte tümör dokuda yüksek seçicilikle ve daha kısa sürede akümüle olur buna bağlı olarak da cilt fototoksitesisi chlorine e6 ya kıyasla daha düşüktür (Başyazı, 2009; Copley ve diğ., 2008; Istomin ve diğ., 2010; Płonka ve diğ., 2015).



Şekil 2.8: Fotolon'un kimyasal yapısı.



Şekil 2.9: Fotolon'un absorpsiyon bandı.

2.2.4.3. Işık Kaynakları

Fotodinamik terapinin üç komponentinden biri olan ışık kaynakları hedeflenen bölgede akümüle olan ışığa duyarlı ajanın aktive edilmesini sağlarlar. Yeni ışığa duyarlı ajanların geliştirilmesine paralel olarak ışık kaynakları ve ışık dağıtım sistemleri de geliştirilmektedir. Fotodinamik terapi sırasında kullanılacak ışık kaynağının seçimi; ışığa duyarlı ajanın absorpsiyon yaptığı spektruma, tümörün özelliklerine (lokasyonu, boyutları, ulaşılabilirliği ve doku karakteristiği), ışık sistemin büyüklüğüne ve maliyetine bağlıdır (Brancaleon & Moseley, 2002; Tong & Kohane, 2012).

Hedef alana erişimin daha kolay olduğu dermatolojik hastalıkların tedavisi için optik filtreler ile ilişkili lambalar kullanılmaktadır. Kullanılan filtreler sayesinde hedef alan UV hasarından ve IR ile indüklenmiş ısıdan korunur.

Zamanla yarı iletken malzemelerin geliştirilmesiyle geniş bir dalga boyu aralığına sahip LED (Light emitting diodes-ışık yayan diyotlar)'ler uygulama imkânı bulmuştur. LED'ler düşük maliyeti, indirgenmiş boyutları, sabit dar bant emisyonu, optik filtrelere ihtiyacı olmaması ve büyük ışınlanma alanlarını veya karmaşık anatomik şekilleri kapsayacak şekilde monte edilebilir olmasıyla lambalara iyi bir alternatif olmuştur (Triesscheijn ve diğ., 2006; Brown ve diğ., 2004; Trachtenberg ve diğ., 2008; Erkiert-Polguj ve diğ., 2016).

Işığın kolayca erişemediği derin yerleşmiş veya daha büyük tümörlerin fotodinamik terapisi için ışığın doğru bir şekilde iletilmesini sağlayan optik fiberlerle entegre edilebilen lazer

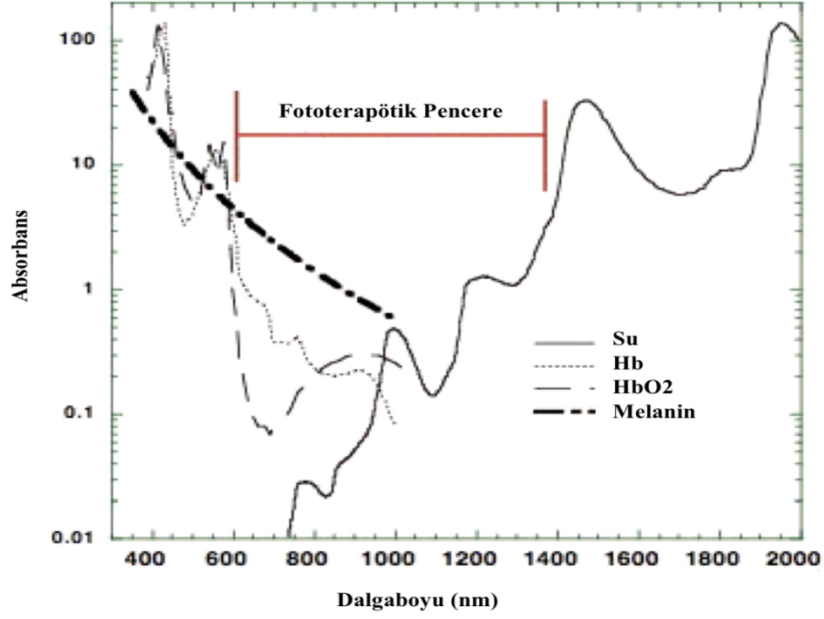
sistemleri kullanılmaktadır. Lazerler içerisinde en güvenilir ve uygun maliyetli olan diyot lazerler tercih edilmektedir. Diyot lazerler sabit dalga boyu ile ışık yayılımı yapmaktadırlar.

Günümüzde fotodinamik terapi uygulamalarında en sık kullanılan lazerler; helyum-neon lazerleri (633 nm), galyum-alüminyum-ardışık diyot lazerler (630–690, 830 veya 906 nm) ve argon lazerlerdir (488-514 nm).

Işık kaynağının yanı sıra uygulama protokolü de önemlidir. Aynı ışık kaynağına sahip farklı ışınlanma protokolleri farklı fotodinamik terapi sonuçlarının oluşmasına neden olmaktadır. Toplam ışık dozu (J), akıcılık (J/cm^2) ve akıcılık oranı (W/cm^2) gibi ışık doz rejimleri anti tümör reaksiyonlarını etkilemektedir. Özellikle yüksek akıcılık oranları (W/cm^2) tümör dokusundaki oksijen miktarının hızlı bir şekilde azalmasına neden olmaktadır. Bu durum terapi sırasında ulaşılan tümör hacmini sınırlandırır. Bununla birlikte en uygun doz rejimleri vakaya bağlıdır. Bu nedenle ışık dozimetrisinin tam olarak anlaşılması fotodinamik terapinin önemli bir parçasıdır (Henderson ve diğ., 2006; Henderson ve diğ., 2006).

Fototerapötik Pencere

Işık kaynağının ışıma yaptığı dalga boyu, ışığın doku içerisindeki penetrasyon derinliği açısından önemlidir. Işığın tümör dokusundaki penetrasyonu oldukça karmaşıktır. Işık tümör dokuya girdiğinde ya dağılır ya da emilir her ikisi de dokunun tipine ve ışığın dalga boyuna bağlıdır. Dokunun ışığı absorbe etme karakteristiği dalga boyunun artması ile azalır dolayısıyla daha uzun dalga boyuna sahip ışıklar, dokuda absorbe edilmeden daha verimli bir şekilde nüfuz etmektedir. Kısa dalga boyuna sahip ışığın dokudaki melanin, flavinler, deoksihemoglobin, kollajen ve nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu gibi endojen kromoforlar tarafından absorbe edilmesi; 1200 nm'den uzun dalga boyuna sahip ışığın dokudaki su tarafından absorbe edilmesi '*Fototerapötik pencere*' kavramının oluşmasını sağlamaktadır. Şekil 2.11'de Fototerapötik pencere verilmiştir.



Şekil 2.10: Fototerapötik pencere.

Fotodinamik terapide kullanılan 650 nm'den kısa dalga boyuna sahip ışık kaynakları dokuda daha az penetre olur ve endojenler tarafından absorbe edilir bu da yüksek oranda ciltte fotosensitiviteye neden olmaktadır. Bununla birlikte 850 nm'den daha uzun dalga boyuna sahip ışık kaynakları singlet oksijen üretmek için yeterli enerjiye sahip değildir. Bu nedenle maksimum doku geçirgenliği 650-850 nm arasında gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak da tercih edilen ışığa duyarlı ajan bu aralıkta güçlü elektronik geçiş yoğunluğuna sahip olmalıdır.

2.2.4.4. Oksijen

Fotodinamik terapi mekanizmasındaki üçüncü komponent moleküler oksijendir. Dokulardaki oksijen varlığının sabit olduğunu varsayarsak fotodinamik terapiye olan etkisi ihmal edilebilir. Bununla birlikte oksijen konsantrasyonu farklı tümörlerde ve hatta aynı tümörün farklı bölgeleri arasında damar yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Özellikle anoksik mikro çevresiyle karakterize edilen derin solid tümörlerde oksijen eksikliği sınırlayıcı bir faktör olmaktadır (Woodhams ve diğ., 2007).

Fotodinamik terapide tümörün yüksek akıcılık oranıyla ışınlanması dokudaki oksijen miktarının hızlı bir şekilde azalmasına, reaktif oksijen türlerinin üretimini durmasına buna bağlı olarak da tedavinin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır (Yang ve diğ., 2010).

Fotodinamik reaksiyon ile birlikte oksijen tüketim oranının oksijen difüzyon oranını aştığı durumlarda oksijen tükenmesi meydana gelmektedir. Bununla birlikte fotodinamik terapinin peritümöral vaskülatörü tıkanması sonucunda tümör dokusuna kan akışı azalır ve hipoksi meydana gelmektedir. Fotodinamik terapi protokolü optimizasyon aşamasında oksijen seviyesini kontrol etmek amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Dokulardaki oksijen miktarını izlemek için geliştirilen teknikler sayesinde ışık akı hızını ayarlamak mümkündür. Hedef dokuya ulaşan toplam ışık dozunu koruyacak şekilde ya hedef dokuyu aralıklarla ışınlandırarak ya da ışınlanma süresini artırarak oksijenin tüketim ve difüzyon hızı arasında denge sağlanabilir. Hedef dokudaki oksijen reperfüzyonunu artıran bu stratejiler tümör yanıtında sınırlı bir iyileşme göstermektedir çünkü bu stratejiler tedavi öncesinde hipoksik olan hücreler üzerinde işe yaramamaktadır. Ayrıca hedef dokudaki oksijen miktarını artırmak için ışınlanma süresini artırmak tedavi süresinin uzamasına neden olmaktadır. Bu nedenle farklı stratejiler ve yöntemler geliştirilmektedir (Blake ve diğ., 2013).

Özofagus kanserli hastalar üzerinde hiperbarik oksijenli bir oda içerisinde gerçekleştirilen fotodinamik terapi uygulamaları sonrasında hastaların sağ kalım sürelerinin uzadığı bazı vakalar kaydedilmiştir. Diğer bir strateji ise yine doku oksijenini artırmak için normobarik oksijen solunumu ile fotodinamik terapinin kombinasyonudur. Normobarik oksijen solunumu uzun dönem tümör kürleri açısından hiperbarik oksijenden daha iyi sonuçlar vermiştir (Schouwink ve diğ., 2001).

2.2.5. Fotodinamik Terapinin Sınırları

Fotodinamik terapinin klinik uygulamalardaki başarısına katkı sağlayan en kritik iki faktör ışığa duyarlı ajanın hedef tümör dokuda seçici olarak akümüle olması ve ışığın sadece hedef tümör dokuya iletilmesidir.

Yüzeysel lezyonlarda ışığa duyarlı ajanın direk tedavi edilecek tümör dokuya uygulanması ajanın tümör hücrelerinde seçici olarak akümüle olmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak ışığa duyarlı ajan intravenöz olarak hastaya verildiğinde hedef tümör dokuya ulaşım birikebilmesi için yeteri kadar dolaşımda kalması gerekir. Sızan vaskülatür, zayıf lenfatik drenaj, anormal stromal kopmozisyon, düşük pH, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörlerinin sayısının artması gibi tümör dokusunun anormal fizyolojisi ajanın tümör vaskülatürü yoluyla ekstravazasyonuna izin vererek pasif olarak hedef tümör dokuda akümüle olmasını kolaylaştırmaktadır. Bu durum gelişmiş geçirgenlik ve tutunma etkisi olarak da bilinir.

Işığa duyarlı ajanın hedef tümör dokuda seçici olarak akümüle olması nanopartiküller ve lipoproteinler gibi hedefli dağıtım ajanları ile kaplanarak geliştirilebilir. Böylece uygun olmayan biyodağılım önlenir ve biyoyararlanım geliştirilebilir. Sonuç olarak fotodinamik terapi ile çevredeki sağlıklı doku korunurken hedef tümör dokunun yıkımı sağlanmış olur bu da geleneksel tedavi yöntemleri ile kıyaslandığında fotodinamik terapinin başlıca avantajlarından biri olarak kabul edilmektedir. Yüksek seçiciliğinin sonucu olarak azaltılmış yan etkileri ve spesifik direnç mekanizmalarının olmaması fotodinamik terapinin hastalığın nüksetmesi veya çoklu lezyonların tedavisinde de tekrar tekrar kullanılmasına imkân vermektedir. Fotodinamik terapi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte kombin edilerek de uygulanmaktadır.

Fotodinamik terapi lokalize ve erken evre solid tümörler için etkili bir tedavi yöntemidir. Ancak ileri evrelerdeki daha büyük tümörlerde ışığın dokudaki penetrasyonu sınırlı olduğu için tedavinin etkinliğini sınırlanmaktadır. Yüzeysel olmayan veya büyük hedef tümör dokularına ulaşan ışığın penetrasyon derinliğinden kaynaklanan zorluklardan dolayı tedavi etkili olamamaktadır. Fotodinamik terapi sırasında yapılan ışımanın tümörün her noktasına ulaşabilmesi, etkili olup tümörü yok edebilmesi için uygun ışık dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Gelişmiş Monte Carlo hesaplamalarına rağmen klinikte uygulanan fotodinamik terapi yetersiz tümör ışınlamalarından dolayı rezidüel tümör büyümesini kontrol etmede ve tümörün nüksetmesini önlemede başarısız olabilmektedir. Tümör dokunun aşırı ışınlanması çevre normal dokuda toksik bir etki oluşturup ve olumsuz tepkiye yol açabilmektedir. Bu durumda fotodinamik terapi palyatif tedavi amaçlı uygulanarak hastanın yaşam kalitesini artırmak ve hastalığın ilerlemesini önlemek hedeflenmekte ya da farklı tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Bu amaçla vücut boşluğunun lümenine bakan iç tümörlerin ışınlanması optik fiberler kullanılarak endoskopi yoluyla yapılmaktadır. Daha büyük tümörler de ise hedef dokudaki ışık dozunun homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla tümör kütlelerinin içerisine birkaç farklı noktadan optik fiber sokulmasıyla doku içerisinde de ışınlama yapılmaktadır.

Metastatik tümörleri fotodinamik terapi ile tedavisinde birincil amaç ışınlanmış alan dışındaki tümör hücrelerini tanıyan ve yok etme potansiyeline sahip bir sistemik anti tümör bağışıklık yanıtının oluşturulmasını desteklemektir. Böylece ışınlanmış alan dışındaki lezyonların gelişimi de kontrol altına alınabilir. Fotodinamik terapinin bağışıklık sistemine olan etkisinden

bahseden klinik raporlar mevcut olsa da ileri evredeki metastaz yapmış hastalıkların tedavisinde başarılı olamamaktadır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE HATLARI VE KÜLTÜR KOŞULLARI

3.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada MIA PaCa-2(RL-1420TM) pankreas epitelyal tümör ve MRC-5 (CCL-171TM) normal akciğer fibroblastik hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları ATCC 'den temin edilmiştir. MRC-5 hücre hattı, 27 yaşında psikiyatrik nedenlerle 14 haftalıkken hamileliği sonlandıran bir kadının erkek fetüsünden elde edilen fibroblastik hücrelerdir. MIA PaCa-2 hücre hattı, Kafkasya asıllı 65 yaşında bir erkeğin pankreas karsinoma dokusundan elde edilen epitelyal hücrelerdir.

3.1.2. Hücrelerin Kültüre Alınması

Hücreleri çözmek ve canlılıklarının kontrollerinin sağlanması amacıyla azot tankından alınan içinde hücreler bulunan kryotüpler kademeli olarak önce -20 °C dolapta ardından 37 °C su banyosunda yaklaşık 2 dakika kadar çözülünceye kadar bekletilmiştir. Kryotüpün etrafı alkolle temizlendikten sonra laminar kabin içerisine alınmıştır. Kryotüp içerisinde bulunan 1 ml hacmindeki hücreler falkonlara alınarak üzerine 5 ml taze besiyer eklenmiştir. Ardından 1500 rpm hızda 4 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 1ml taze besiyer ile homojenize edilip sayım yapılmıştır. Sayım yapıldıktan sonra flasklara hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler büyüyüp, istenilen morfolojik özellikleri gösterdiklerinde ve zeminde daha fazla hücre gelişimi için alan kalmadığında çalışılacak hücreler için alt kültür işlemine geçilmiştir; daha sonra çalışılacak hücreler için ise dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dondurma işlemi için flasktaki tüm besiyeri falkona alınıp santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml içeriğinde %90 oranında RPMI 1640 ve %10 oranında DMSO olan dondurma besiyeri eklenerek yeni kryotüp içerisine alınmıştır. Hücre hatlarına zarar gelmesini önlemek amacıyla kryotüpler kademeli olarak önce -20 °C'de 1 saat, -80 °C'de 24 saat bekletildikten sonra azot tankında saklanmıştır.

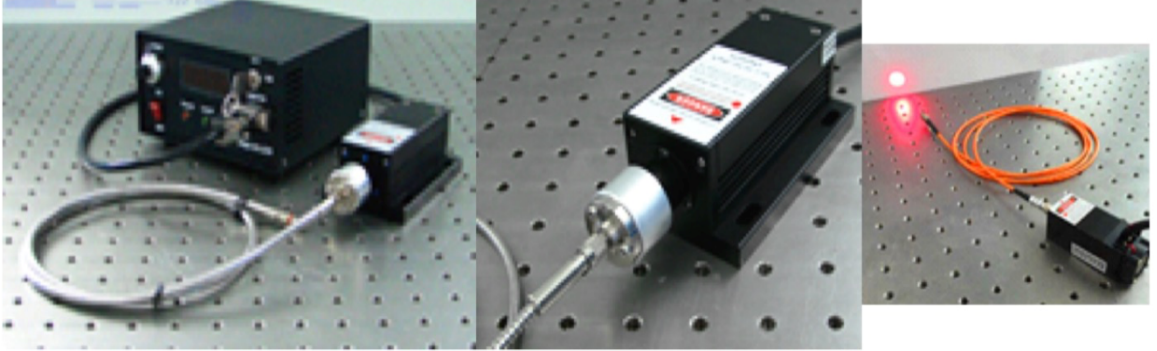
MIA PaCa-2pankreas epitelyal karsinoma hücre hattı %10 FCS, 100 u/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren NaHCO₃ solüsyonu ve 2 µM L-glutamin içeren RPMI 1640 kültür ortamında flasklarda 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

MRC-5 normal akciğer fibroblastik hücre hattı %10 FCS, %10 FCS, 100 u/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren NaHCO₃ solüsyonu ve 2 µM L-glutamin içeren DMEM kültür ortamında flasklarda 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

Hücrelerin 2 gün ara ile besi ortamı yenilenmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılarak 96'lık hücre plakalarına (10.000 hücre/kuyu) ekilip 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2. IŞIK KAYNAĞI

Çalışmada ışık kaynağı olarak 660±5 nm dalga boyuna sahip kırmızı diyot lazer (OEM-MD, CNI Lasers, Çin) kullanılmıştır. Maksimum 2000 mW çıkış gücüne sahip ayarlanabilir olan lazer sönümsüz modlu özelliktedir. Lazer ışığının hedefe iletilmesi için 400 µm kalınlığında paslanmaz çelikle kaplanmış fiberler kullanılmıştır. Lazer ışığının çıkış gücü her uygulama öncesinde optik güç ölçer ile kontrol edilmiştir. Lazer sistemi Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Lazer sistemi.

3.3. IŞIĞA DUYARLI AJAN

3.3.1. Işığa Duyarlı Ajan

Çalışmada ışığa duyarlı/ışığa hassaslaştırıcı ajan olarak Fotolon (APO-CARE Pharma GmbH, Bielefeld, Germany) kullanılmıştır. Fotolon görünür dalga boyunda ışıma yapmaktadır.

Özellikle 630-690 nanometreleri arasında absorbands gösteren Fotolon, maksimum absorpsiyonu yaklaşık 660 nanometrede göstermektedir (Igor Buzalewicz, 2017).

Her uygulama öncesinde kuru toz halindeki Fotolon PBS ile çözelti haline getirilerek taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan Fotolon çözeltisi uygulamalar sırasında vorteks ile karıştırılmış ve herhangi bir bozunmayı önlemek amacıyla karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Fotolon'un Optimal Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada Fotolon'un optimal konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 9 farklı Fotolon konsantrasyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakaların, her bir kuyucuğuna 10.000 MIA PaCa-2 pankreas epitelyal karsinoma hücre hattı ekilmiştir. Hücreler yaklaşık 24 saat 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler ekildikten sonra 2,5 µM, 5 µM, 6,5 µM, 10 µM, 12,5 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM Fotolon ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol grubu hücrelerine ise içerisinde Fotolon olmayan aynı miktarda besiyer ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kuyuculardaki besiyerleri aspire edilerek her kuyuya DMEM besiyeri ve WST-1 karışımından 10 µl verilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyonun sonunda hücrelerin 440 nm'deki absorbands değerleri 630 nm referans dalgaboyu alınarak ELISA ile ölçülmüştür.

3.4. İN VİTRO FOTODİNAMİK TERAPİ UYGULAMALARI

3.4.1. Optimizasyon Çalışması

Çalışmada değişen Fotolon akümülyasyon süreleri ve lazer ışığının enerjisine bağlı olarak her tedavi protokolü için 4 grup üzerinden *in vitro* uygulamaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmasının sonuçları WST-1 hücre canlılık testi ile değerlendirilerek iki hücre hattı için ayrı ayrı optimum inkübasyon süresi ve enerji yoğunluğu belirlenecektir. Her uygulama için mevcut olan gruplar aşağıdaki gibidir.

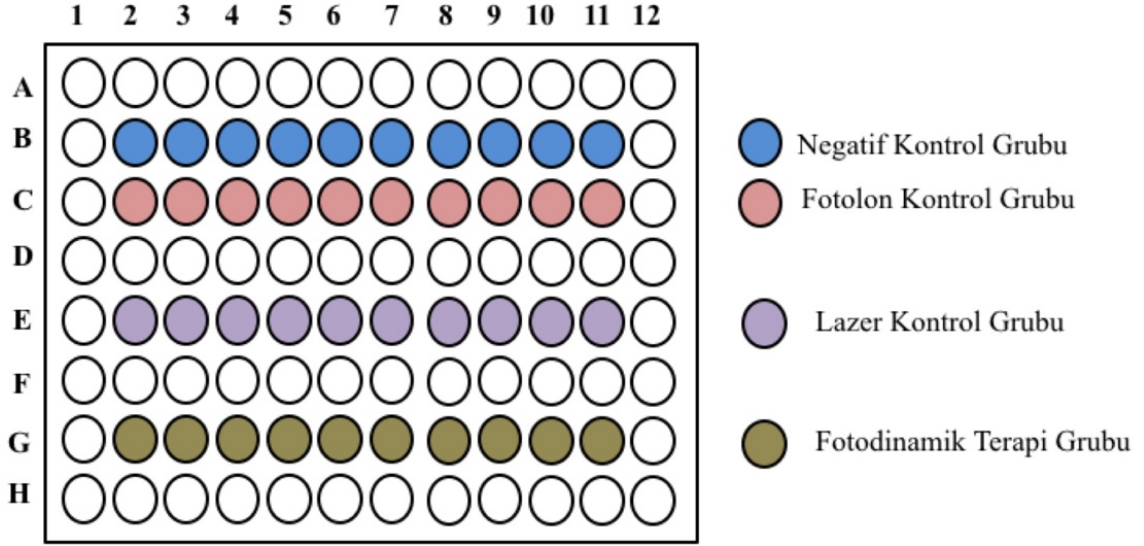
Grup 1: Negatif Kontrol Grubu; Fotolon uygulanmadı, Lazer uygulanmadı.

Grup 2: Lazer Kontrol Grubu; Lazer uygulandı, Fotolon uygulanmadı.

Grup 3: Fotolon Kontrol Grubu; Fotolon uygulandı, Lazer uygulanmadı.

Grup 4: Fotodinamik Terapi Grubu; Fotolon uygulandı, Lazer uygulandı.

Grupların 96 kuyucuklu plaka üzerindeki yerleşimi Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: 96 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaların yerleşim düzeni.

3.4.1.1. MRC-5 Hücre Hattı Üzerinde Optimizasyon Çalışması Uygulamaları

Bu çalışmada MRC-5 normal akciğer fibroblastik hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için gerekli olan optimum inkübasyon süresi ve enerji yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için; 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon sürelerinin ve 1 J/cm^2 , $2,5 \text{ J/cm}^2$ ve 5 J/cm^2 olmak üzere üç farklı lazer ışığı enerjilerinin uygulamaları yapılmıştır. Sonuçlar 4, 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 hücre canlılık testiyle değerlendirilmiştir.

Çalışma 6 farklı uygulama üzerinden dizayn edilmiştir. Tablo 3.1’de uygulamalar ve numaralandırılması verilmiştir. Uygulama 1’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 1 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 2’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra $2,5 \text{ J/cm}^2$ enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 3’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 4’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra 1 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 5’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra $2,5 \text{ J/cm}^2$ enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 6’de hücreler $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek için her uygulama 3 paralelli kendi içerisindeki gruplar 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.1: MRC-5 hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulamaları.

İnkübasyon Süresi	Uygulanan Lazer Işığın Enerji Yoğunluğu		
	1 J/cm ²	2,5 J/cm ²	5 J/cm ²
30 dakika	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3
60 dakika	Uygulama 4	Uygulama 5	Uygulama 6

3.4.1.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerinde Optimizasyon Çalışması Uygulamaları

Bu çalışmada MIA PaCa-2 pankreas epitelyal karsinoma hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için gerekli olan optimum inkübasyon süresi ve lazer enerji yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için; 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon sürelerinin ve 1 J/cm², 2,5 J/cm² ve 5 J/cm² olmak üzere üç farklı lazer ışığı enerjilerinin uygulamaları yapılmıştır. Sonuçlar 4, 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 hücre canlılık testiyle değerlendirilmiştir.

Çalışma 6 farklı uygulama üzerinden dizayn edilmiştir. Tablo 3.2’de uygulamalar ve numaralandırılması verilmiştir. Uygulama 7’de hücreler 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 8’de hücreler 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 2,5 J/cm² enerjisi ile uyarılmıştır. Uygulama 9’de hücreler 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 10’de hücreler 10 µM Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 11’de hücreler 10 µM Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Uygulama 12’de hücreler 10 µM Fotolon ile 60 dakika inkübe edildikten sonra 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek için her uygulama 3 paralelli kendi içerisindeki gruplar 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 3.2: MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi uygulamaları.

İnkübasyon Süresi	Uygulanan Lazer Işığın Enerji Yoğunluğu		
	1 J/cm ²	2,5 J/cm ²	5 J/cm ²
30 dakika	Uygulama 7	Uygulama 8	Uygulama 9
60 dakika	Uygulama 10	Uygulama 11	Uygulama 12

Optimizasyon çalışmasında hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar uygulanan protokol aşağıdaki gibidir;

1. Flasklarda çoğalmaya bırakılan hücrelerin 2 gün ara ile besi ortamı yenilenmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılarak sayımı yapılmıştır. 96'lık hücre plakalarına (10.000 hücre/kuyu) ekilip 24 saat boyunca 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyonun sonunda Fotolon Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Grupları için taze Fotolon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,0002 gr kuru toz halindeki Fotolon 6mL PBS ile 10 µM'lık çözelti haline getirilmiştir. Hazırlanan çözeltiden Fotolon Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Gruplarına 100 µL verilmiştir. Negatif Kontrol Grubu ve Lazer Kontrol Grubuna ise 100 µL besiyer verilmiştir.
3. Uygulanan tedavi protokolüne göre hangi uygulama yapılıyorsa ona ait akümülyasyon süresi kadar 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.
4. Akümülyasyon süresinin sonunda bütün gruptaki besiyerleri mikropipetle çekilerek taze besiyerler verilmiştir.
5. Besiyerleri tazelandikten sonra Lazer Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Grupları uygulanan tedavi protokolüne göre hangi uygulama yapılıyorsa ona ait lazer ışığı enerjisi ile uyarılmıştır. Negatif Kontrol Grubu ve Fotolon Kontrol Grubunun bu ışımadan etkilenmesi engellemek amacıyla ışık geçirmeyen siyah alüminyum folyo kullanılmıştır.

6. Uygulamalar bittikten sonra hücre canlılıklarının belirlenmesi amacıyla sonuçlar 4, 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 hücre canlılık testiyle değerlendirilmiştir.

3.4.2. Ana Çalışma

Optimizasyon çalışması WST-1 hücre canlılık testi sonuçları değerlendirilerek MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hattı için Fotolon inkübasyon süresi ve lazer ışığı enerjisi parametresi belirlenmiştir. Ana çalışmada optimizasyon çalışmasında belirlenen parametreler kullanılmıştır. Kaspaz 3/BCA protein aktivitesine ile birlikte Anneksin-V apoptoz/nekroz analizi ile ana çalışma etkinliği değerlendirilmiştir. Uygulamalar için mevcut olan gruplar aşağıdaki gibidir.

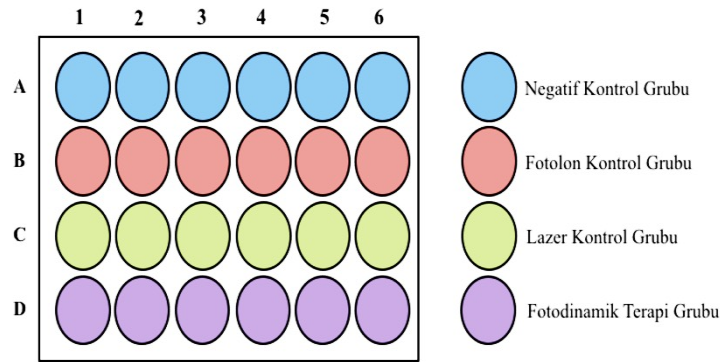
Grup 1: Negatif Kontrol Grubu; Fotolon uygulanmadı, Lazer uygulanmadı.

Grup 2: Lazer Kontrol Grubu; Lazer uygulandı, Fotolon uygulanmadı.

Grup 3: Fotolon Kontrol Grubu; Fotolon uygulandı, Lazer uygulanmadı.

Grup 4: Fotodinamik Terapi Grubu; Fotolon uygulandı, Lazer uygulandı.

Grupların 24 kuyucuklu plaka üzerindeki yerleşimi Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: 24 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaların yerleşim düzeni.

Ana çalışmada hücre hatlarının alt kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar uygulanan protokol aşağıdaki gibidir;

1. Flasklarda çoğalmaya bırakılan hücrelerin 2 gün ara ile besi ortamı yenilenmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılarak sayımı yapılmıştır. 24'lük hücre

plakalarına (1.000.000 hücre/kuyu) ekilip 24 saat boyunca 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

2. İnkübasyonun sonunda Fotolon Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Grupları için taze Fotolon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,0002 gr kuru toz halindeki Fotolon 6mL PBS ile 10 µM'lık çözelti haline getirilmiştir. Hazırlanan çözeltiden Fotolon Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Gruplarına 100 µL verilmiştir. Negatif Kontrol Grubu ve Lazer Kontrol Grubuna ise 100 µL besiyer verilmiştir.

3. Optimizasyon çalışması sonunda elde edilen ve WST-1 hücre canlılık testiyle değerlendirilen sonuçlara göre belirlenen inkübasyon süresi kadar 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

4. Akümülyasyon süresinin sonunda bütün gruptaki besiyerleri mikropipetle çekilerek taze besiyerler verilmiştir.

5. Besiyerleri verildikten sonra Lazer Kontrol Grubu ve Fotodinamik Terapi Gruplarına optimizasyon çalışması sonunda elde edilen ve WST-1 hücre canlılık testiyle değerlendirilen sonuçlara göre belirlenen lazer ışığı enerjisi ile uyarılmıştır. Negatif Kontrol Grubu ve Fotolon Kontrol Grubunun bu ışımadan etkilenmesi engellemek amacıyla ışık geçirmeyen siyah alüminyum folyo kullanılmıştır.

6. Uygulamalar bittikten sonra hücre ölüm şeklinin belirlenmesi amacıyla Anneksin-V apoptoza/nekroz tayini ve Kaspaz-3/BCA protein aktivitesianalizleri yapılmıştır.

3.5. SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK TESTLER

3.5.1. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Normal fizyolojik hücreler tetrazolyum tuzlarının yapısında bulunan heterosiklik halkaları mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla parçalayarak renkli farmozon kristalleri oluşmasını sağlarlar. Hücreler canlılığını kaybettiklerinde ise herhangi bir renk değişimi meydana gelmez.

Optimizasyon çalışmasının sonunda MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hatları üzerinde uygulanan Fotolon güdümlü fotodinamik terapinin neden olduğu hücre canlılık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla WST-1 (Roche, 11644807001) kiti kullanılmıştır.

Uygulamaların ardından WST-1 hücre canlılığı belirlenirken aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilmiştir.

1. 4, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonların sonunda 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğundaki besiyerleri aspire edilerek kuyulara DMEM besiyeri ve WST-1 karışımından 10 µl verilmiş ve 4 saat 37°C'de %5 karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir.

2. 4 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin 440 nm'deki absorbans değerleri 630 nm referans dalgaboyu alınarak ELISA ile ölçülmüştür.

3. Uygulamalara ait grupların yüzde hücre canlılıkları, negatif kontrol kuyularının absorbans ölçümlerinin sonucunda elde edilen canlılık oranı %100 canlı kabul edilerek hesaplanmıştır. Yüzde Canlılık= $[\text{Absorbans ortalama} / \text{Negatif Kontrol Grubu Kuyucukları Absorbans ortalama}] \times 100$ formülü kullanılmıştır.

3.5.2. Kaspaz 3/BCA Protein Aktivitesi Testi

Normal fizyolojik şartlarda hücre sitoplazmasında inaktif proenzimler şeklinde bulunan kaspazlar, proteolitik parçalanmadan sonra aktifleşirler. Kaspaz-3 apoptozun efektör fazındaki en önemli kaspazlar arasındadır. Apaf-1 ile sitokrom-c bağlanarak kompleks oluşturur ve kaspaz-9 prokaspaz-3'ün aktifleşmesini sağlar. Böylece apoptotik uyarılarla başlayan ölüm sinyali kaspaz-3'e nakledilir. DNAase aktivasyonuna neden olan kaspaz-3'ün DNA fragmentasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir.

Ana çalışma sonunda MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hatları üzerinde uygulanan Fotolon güdümlü fotodinamik terapinin tetiklediği hücre ölüm şeklinin belirlenmesi amacıyla kaspaz-3 protein aktivitesi analiz edilmiştir. Kaspaz bir protein aktivitesi olduğu için Kaspaz-3 protein aktivitesine ek olarak BCA total protein analizi de yapılmıştır.

Bunun için Kaspaz-3 kolorimetrik değerlendirme kiti (BioVision Research Products, California, CA, USA) ve BCA protein değerlendirme kiti (BioVision Research Products, California, CA, USA) kullanılmıştır. Kaspaz-3 analiz yöntemi işaretli substratın (DEVD-pNA)

kaspaz-3 aktivitesi sırasında ayrılmasına ve *p*NA (p-nitroanilide)'nin ışığa vermesi esasına dayanmaktadır.

Uygulanan tedavilerin ardından Kaspaz-3 ve BCA total protein düzeyi belirlenirken aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilmiştir.

1. 24 kuyucuklu plakaların her kuyusundaki hücreler ayrı ayrı ependorflara alınarak 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
2. Pellet 100 µl soğutulmuş lizis tampon çözeltisi eklenerek homojenize edilmiştir. Ardından 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Inkübasyonun ardından 10.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek supernatant yeni bir ependorfa alınarak 100 µl lizis tampon çözeltisi eklenmiştir.
4. 96 kuyucuklu plakaların her kuyusuna 50 µl tedavi protokolü uygulanmış hücrelerden elde edilen protein örneği ve 50 µl 2X reaksiyon tamponu verilmiştir. Ardından 5 µl kaspaz-3 kolorimetrik substratı eklenerek ve 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Değerler 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Spectrum) cihazıyla ölçülmüştür. BCA protein analizi için ise 96 kuyucuklu plakaların her kuyusuna 25 µl tedavi protokolü uygulanmış hücrelerden elde edilen protein örneği ve 200 µl BCA çalışma reaktanı verilerek 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Değerler 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Thermo Spectrum) cihazıyla ölçülmüştür.
5. Sonuçlar değerlendirilirken Kaspaz-3 protein analizi sonuçları BCA total protein tayini sonuçlarına bölünerek hesaplanmıştır.

3.5.3. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi

Normal fizyolojik şartlarda hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfotidilserin hücrenin apoptoza girmesiyle hücre zarının dış yüzeyine çıkar. Dış yüzeye çıkan fosfotidilserin floresan bir madde olan FITC ile işaretlenmiş Annexin-V kullanılarak apoptotik hücreler görünür hale getirilirler. Nekrotik hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen flüoresan propidyum iyodür (PI) boyası ile görünür hale getirilir. PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre zarından geçerek DNA'yı boyar.

Ana çalışma sonunda MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hatları üzerinde uygulanan Fotolon güdümlü fotodinamik terapinin tetiklediği apoptozun erken ve geç evredeki kantitatif olarak belirlemek amacıyla Annexin V-FITC apoptoza tayin testi (Merck Millipore, MCH100105) yapılmıştır.

Uygulanan tedavilerin ardından Annexin V-FITC belirlenirken aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilmiştir.

1. 24 kuyucuklu plakaların her kuyusundaki hücrelerdeki besi ortamı uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilerek ve 1X bağlayıcı tampon içinde 1×10^6 hücre/ml süspansiyon edilmiştir.
2. 100 µl ependorfa alınarak üzerine 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklenmiştir. Hücreler vorteksenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir.
3. Her tüpe 400 µl 1X bağlayıcı tampon konulacak ve 1 saat içinde akış sitometrik ölçüm yapılmıştır.
4. Hücreler, her bir hücrenin Annexin-V ve PI ışınım miktarına göre diyagrama yerleştirilmiştir. Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve hem Annexin-V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik olarak değerlendirilmiştir.

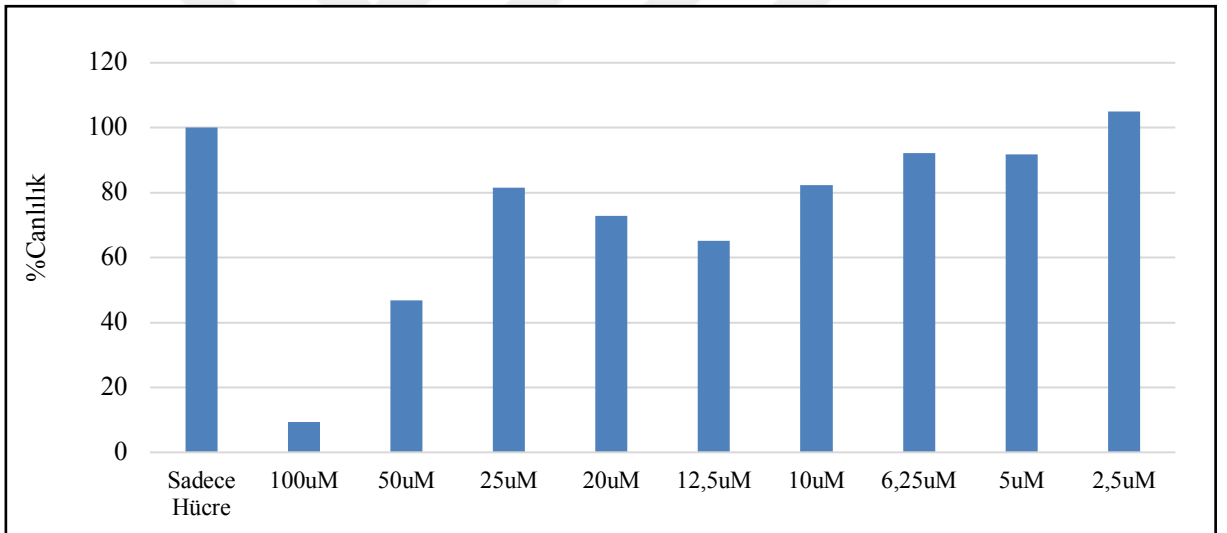
3.6. İSTATİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır. Her uygulama içerisindeki gruplar arasındaki farkı belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Tüm uygulamalardaki grupların ikili olarak karşılaştırılması için çoklu karşılaştırma testi Tukey HSD uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak alınmıştır (Güven Aralığı %95).

4. BULGULAR

4.1. FOTOLON'UN SİTOTOKSİK ETKİSİ

Çalışmada ilk olarak Fotolon'un uygulamalar sırasında kullanılacak dozunu optimize etmek amacıyla MIA PaCa-2 pankreas epitelyal karsinoma hücre hattı 9 farklı Fotolon konsantrasyonu ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda WST-1 testiyle hücre canlılıkları analiz yapılmıştır. Fotolon konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı yüzdeleri 100 μM için %9,31, 50 μM için %46,80, 25 μM için %81,45, 20 μM için %72,87, 12,5 μM için %65,24, 10 μM için %82,25, 6,5 μM için %92,16, 5 μM için %91,79, 2,5 μM için %106,03 olarak tespit edilmiş, Şekil 4.1'de gösterilmiştir ($p < 0,05$). WST-1 testi sonuçları değerlendirilerek uygulanacak konsantrasyon 10 μM Fotolon olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1: Çalışma konsantrasyonlarındaki hücre canlılık yüzdeleri.

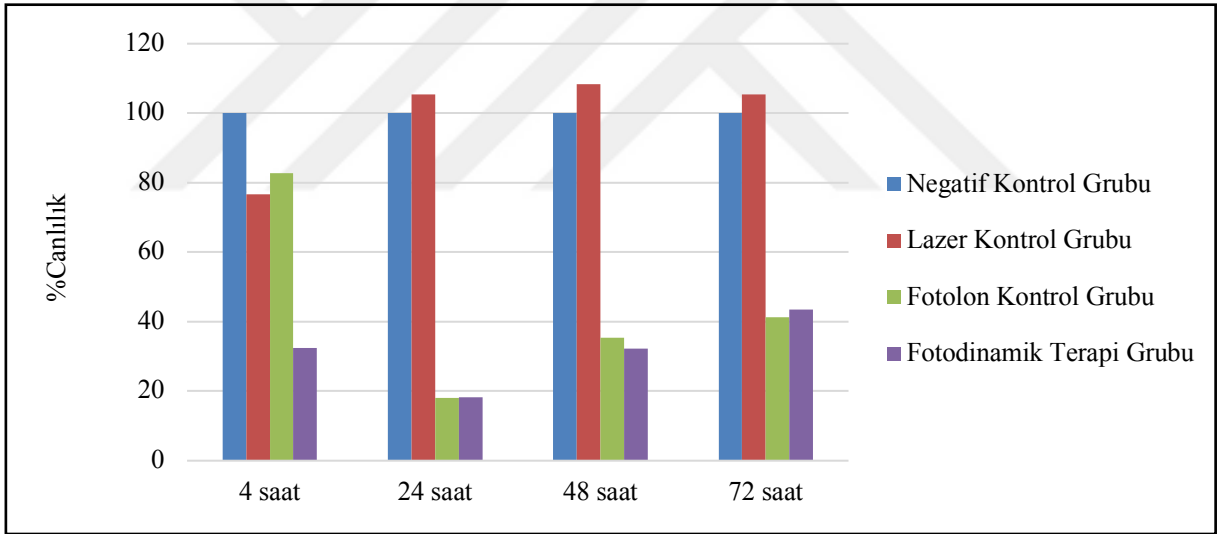
4.2. OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ BULGULARI

4.2.1. MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Optimizasyon Uygulamalarının Bulguları

MRC-5 hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için 2 farklı parametre optimize edilmiştir. Optimize edilen ilk parametre, fotoduyarlı madde olan Fotolon'un inkübasyon süresidir. 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Optimize edilen ikinci parametre ise uygulanacak lazer yoğunluğudur. 1 J/cm^2 , 2,5 J/cm^2 ve 5 J/cm^2 olmak üzere 3 farklı lazer yoğunluğu denenmiştir.

Çalışmalar 6 farklı uygulama üzerinden yapılmıştır.

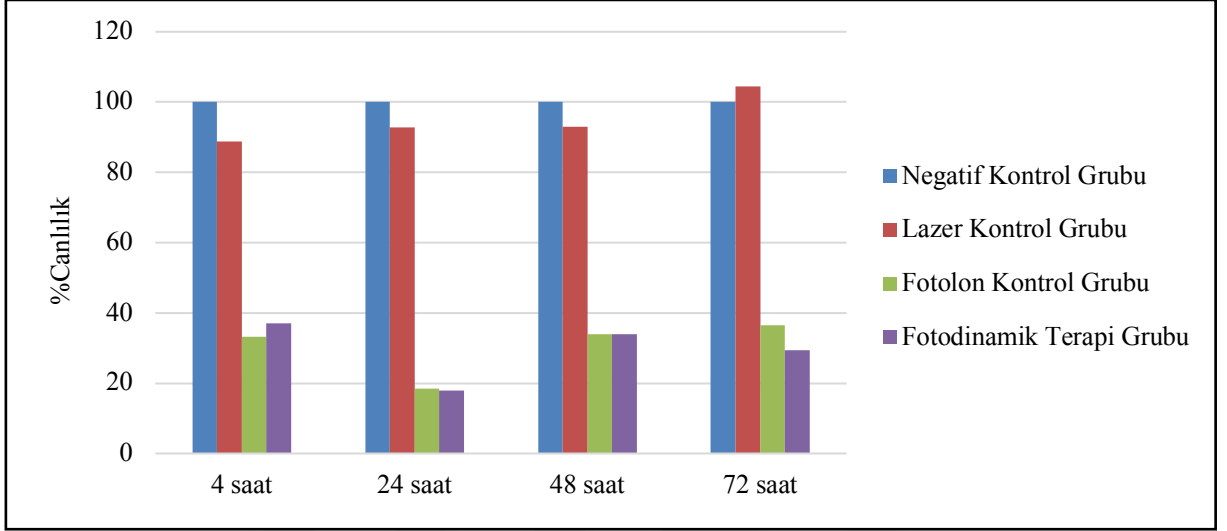
Uygulama 1'e ait sonuçlar Şekil 4.3'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %82, lazer kontrol grubunda %76, Fotodinamik terapi grubunda ise %32 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %18, lazer kontrol grubunda %105, Fotodinamik terapi grubunda ise %18 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %35, lazer kontrol grubunda %108, Fotodinamik terapi grubunda ise %32 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %41, lazer kontrol grubunda %105, Fotodinamik terapi grubunda ise %43 olarak belirlenmiştir (p<0,05).



Şekil 4.2: Uygulama 1'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

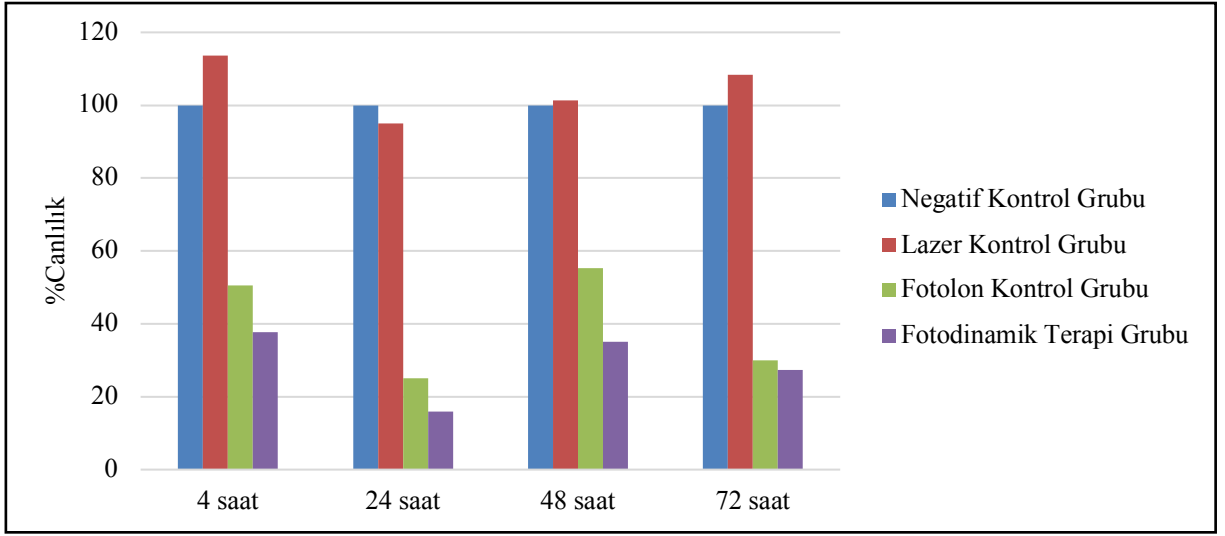
Uygulama 2'ye ait sonuçlar Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %33, lazer kontrol grubunda %88, Fotodinamik terapi grubunda ise %37 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %18, lazer kontrol grubunda %92, Fotodinamik terapi grubunda ise %17 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 48 saat sonundaki hücre canlılık

yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %34, lazer kontrol grubunda %92, Fotodinamik terapi grubunda ise %33 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %36, lazer kontrol grubunda %104, Fotodinamik terapi grubunda ise %29 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).



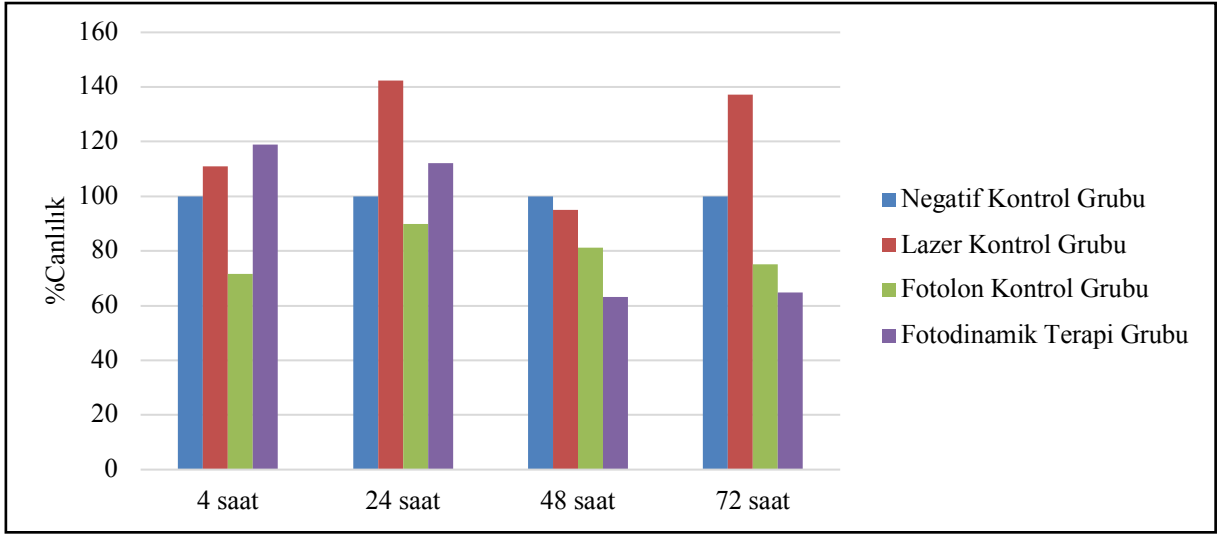
Şekil 4.3: Uygulama 2'ye ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 3'e ait sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %50, lazer kontrol grubunda %113, Fotodinamik terapi grubunda ise %37 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %25, lazer kontrol grubunda %94, Fotodinamik terapi grubunda ise %15 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %55, lazer kontrol grubunda %101, Fotodinamik terapi grubunda ise %35 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %29, lazer kontrol grubunda %105, Fotodinamik terapi grubunda ise %27 olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).



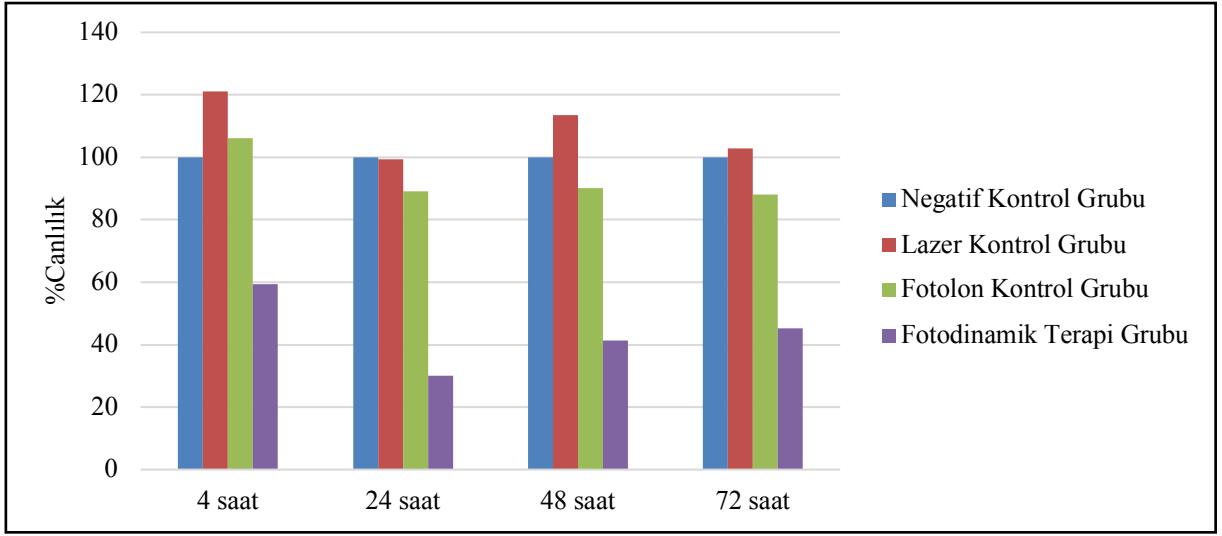
Şekil 4.4: Uygulama 3'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 4'e ait sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %71, lazer kontrol grubunda %111, Fotodinamik terapi grubunda ise %118 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %89, lazer kontrol grubunda %142, Fotodinamik terapi grubunda ise %112 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %81, lazer kontrol grubunda %95, Fotodinamik terapi grubunda ise %63 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %75, lazer kontrol grubunda %137, Fotodinamik terapi grubunda ise %64 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



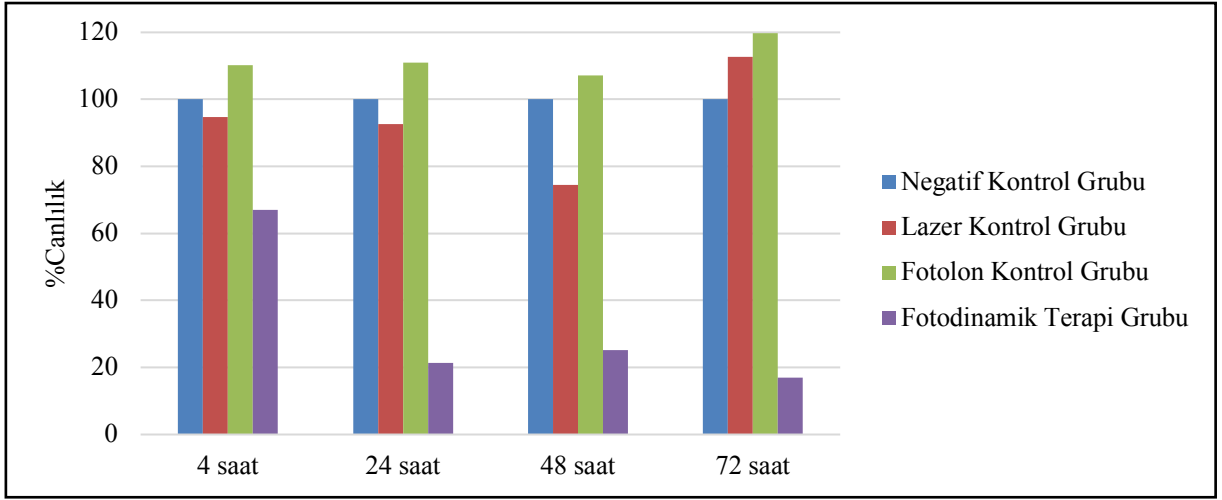
Şekil 4.5: Uygulama 4'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 5'e ait sonuçlar Şekil 4.7'da verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %106, lazer kontrol grubunda %121, Fotodinamik terapi grubunda ise %59 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %89, lazer kontrol grubunda %99, Fotodinamik terapi grubunda ise %30 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %90, lazer kontrol grubunda %113, Fotodinamik terapi grubunda ise %41 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %88, lazer kontrol grubunda %102, Fotodinamik terapi grubunda ise %45 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.6: Uygulama 5'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 6'ya ait sonuçlar Şekil 4.8'da verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %94, lazer kontrol grubunda %110, Fotodinamik terapi grubunda ise %67 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %92, lazer kontrol grubunda %110, Fotodinamik terapi grubunda ise %21 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %74, lazer kontrol grubunda %107, Fotodinamik terapi grubunda ise %25 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %112, lazer kontrol grubunda %119, Fotodinamik terapi grubunda ise %16 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



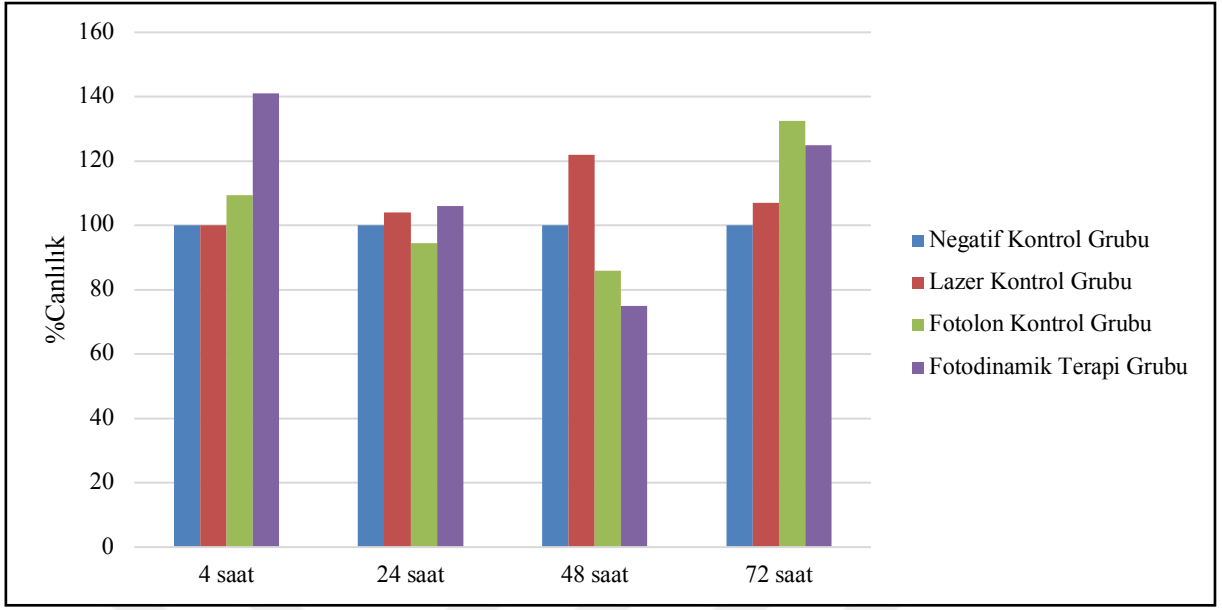
Şekil 4.7: Uygulama 6'ya ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

4.2.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerindeki Optimizasyon Uygulamalarının Bulguları

MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için 2 farklı parametre optimize edilmiştir. Optimize edilen ilk parametre, fotoduyarlı madde olan Fotolon'un inkübasyon süresidir. 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Optimize edilen ikinci parametre ise uygulanacak lazer yoğunluğudur. 1 J/cm², 2,5 J/cm² ve 5 J/cm² olmak üzere 3 farklı lazer yoğunluğu denenmiştir.

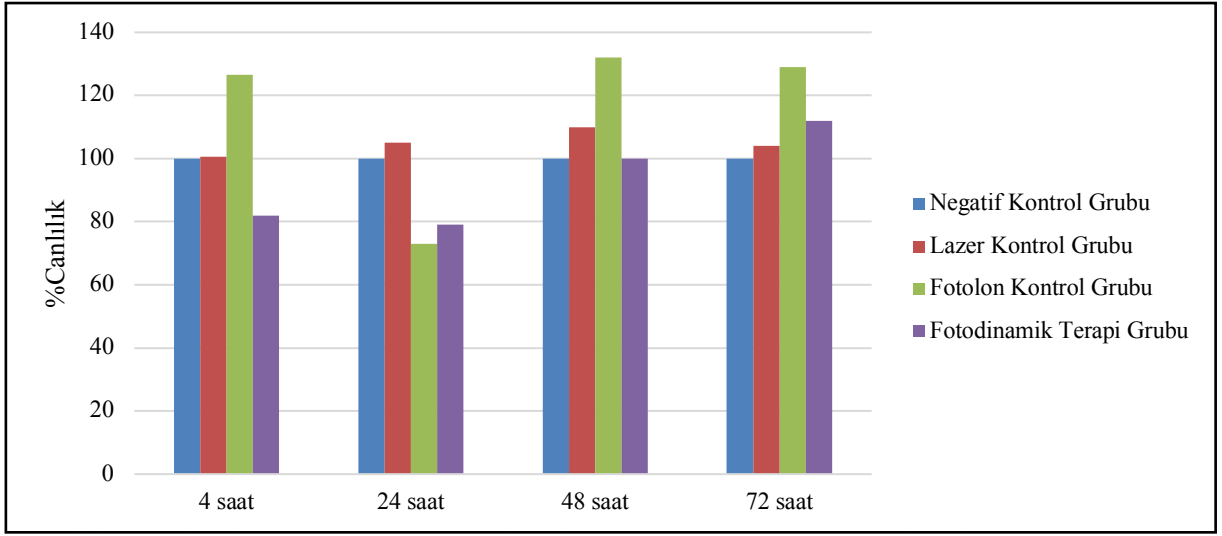
Çalışmalar 6 farklı uygulama üzerinden yapılmıştır.

Uygulama 7'a ait sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %109,5, lazer kontrol grubunda %100, Fotodinamik terapi grubunda ise %141 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %94,5, lazer kontrol grubunda %104, Fotodinamik terapi grubunda ise %106 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %86, lazer kontrol grubunda %122, Fotodinamik terapi grubunda ise %75 olarak belirlenmiştir (p<0,05). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %132,5, lazer kontrol grubunda %107, Fotodinamik terapi grubunda ise %125 olarak belirlenmiştir (p<0,05).



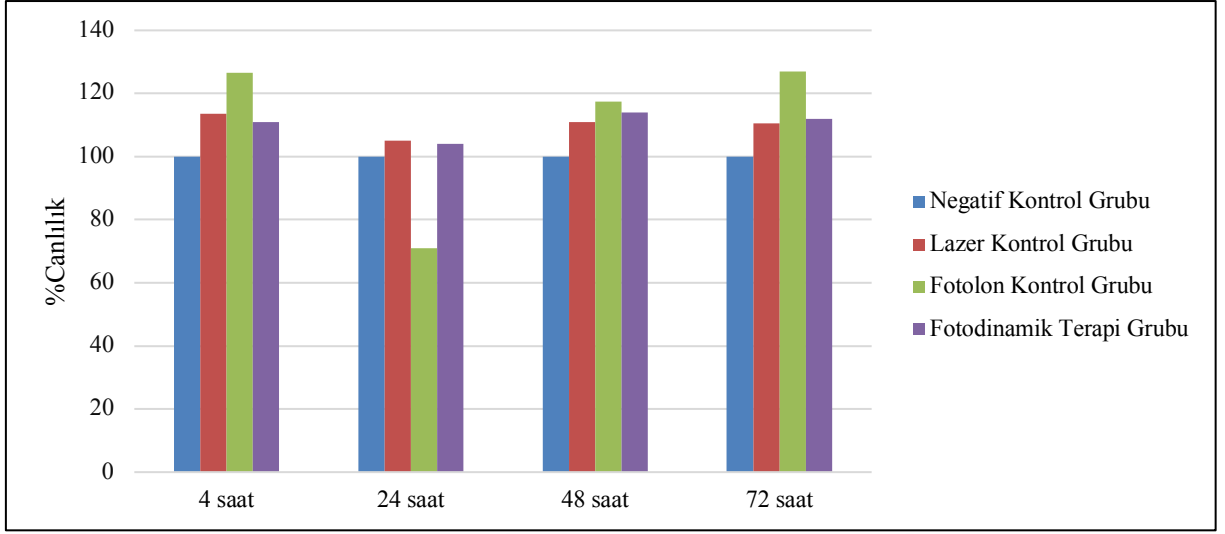
Şekil 4.8: Uygulama 7'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 8'e ait sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %126,5, lazer kontrol grubunda %100,5, Fotodinamik terapi grubunda ise %82 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %73, lazer kontrol grubunda %105, Fotodinamik terapi grubunda ise %79 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %132, lazer kontrol grubunda %110, Fotodinamik terapi grubunda ise %100 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %129, lazer kontrol grubunda %104, Fotodinamik terapi grubunda ise %112 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



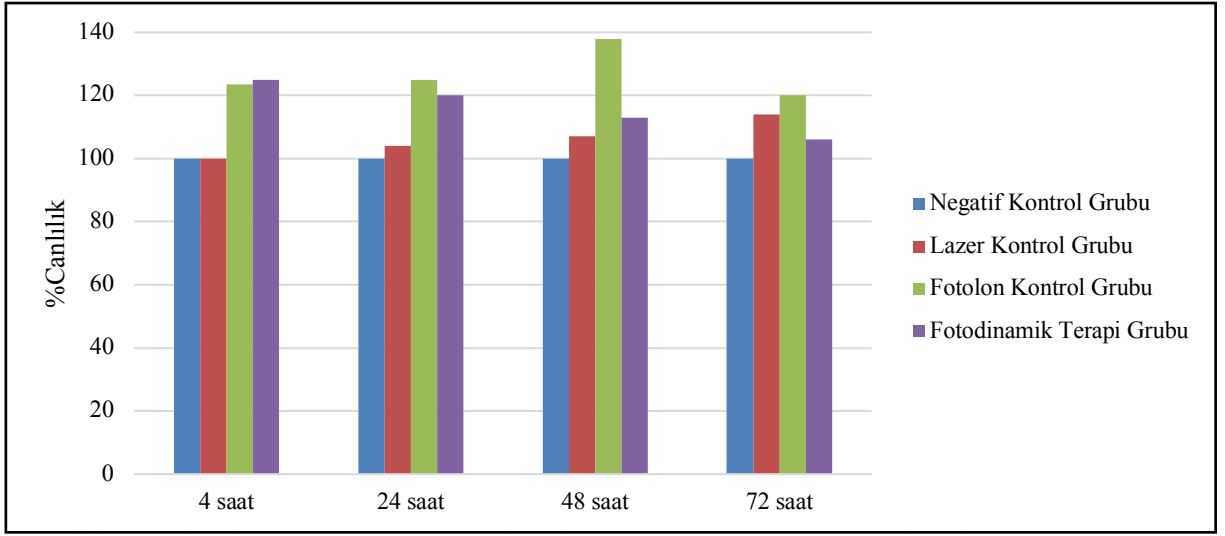
Şekil 4.9: Uygulama 8'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 9'a ait sonuçlar Şekil 4.11'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %126,5, lazer kontrol grubunda %113,5, Fotodinamik terapi grubunda ise %111 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %71, lazer kontrol grubunda %105, Fotodinamik terapi grubunda ise %104 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %117,5, lazer kontrol grubunda %111, Fotodinamik terapi grubunda ise %114 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %127, lazer kontrol grubunda %110,5, Fotodinamik terapi grubunda ise %112 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



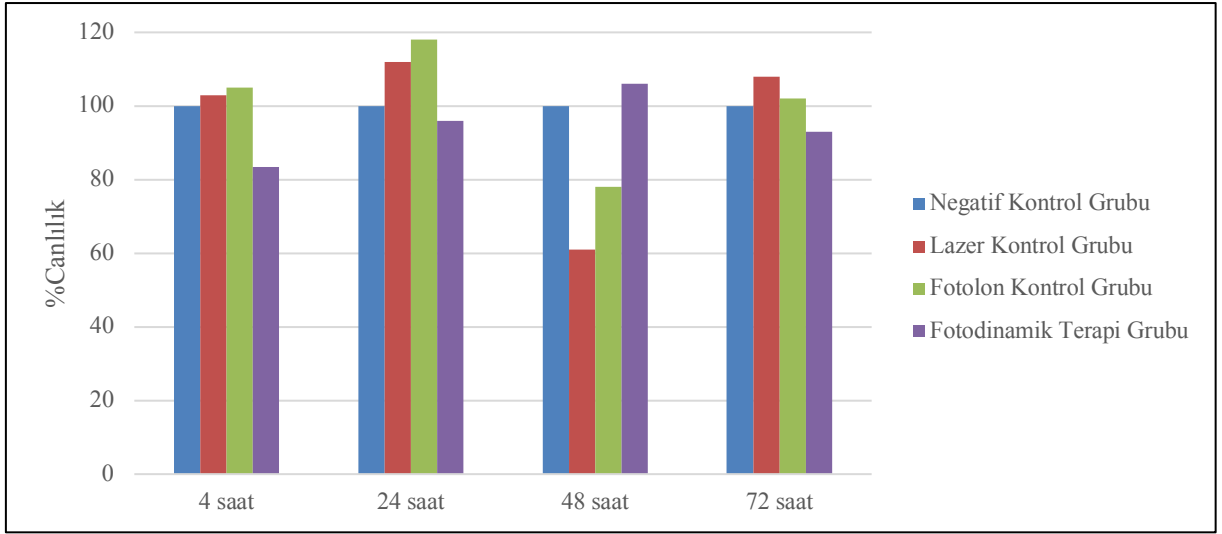
Şekil 4.10: Uygulama 9'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 10'a ait sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %123,5, lazer kontrol grubunda %100, Fotodinamik terapi grubunda ise %125 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %125, lazer kontrol grubunda %104, Fotodinamik terapi grubunda ise %120 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %138, lazer kontrol grubunda %107, Fotodinamik terapi grubunda ise %113 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %120, lazer kontrol grubunda %114, Fotodinamik terapi grubunda ise %106 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



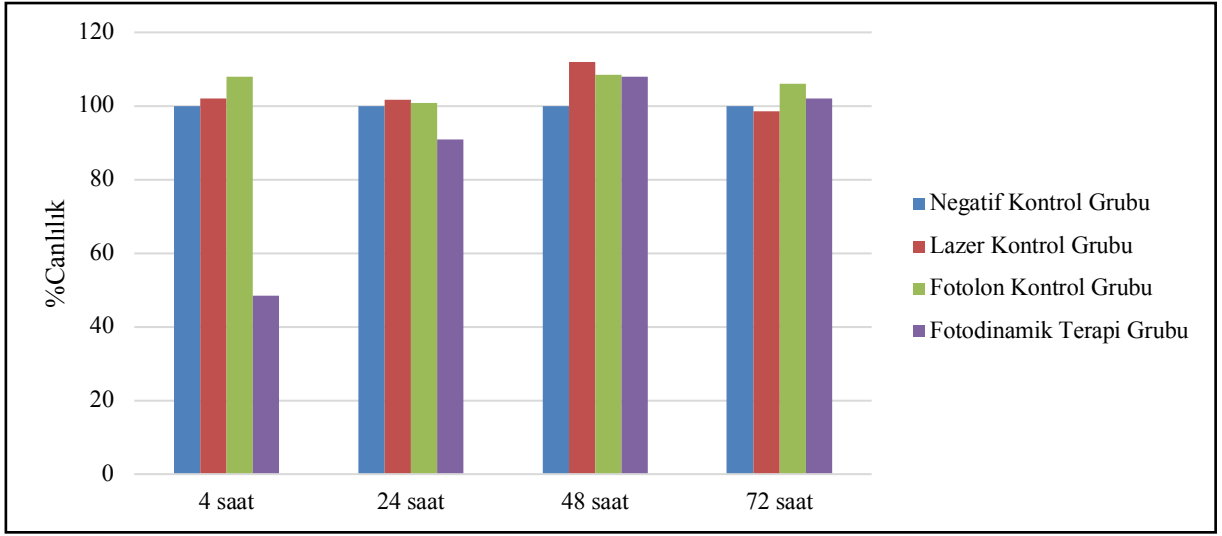
Şekil 4.11: Uygulama 10'a ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 11'e ait sonuçlar Şekil 4.13'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %105, lazer kontrol grubunda %103, Fotodinamik terapi grubunda ise %83,5 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %118, lazer kontrol grubunda %112, Fotodinamik terapi grubunda ise %96 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %78, lazer kontrol grubunda %61, Fotodinamik terapi grubunda ise %106 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %102, lazer kontrol grubunda %108, Fotodinamik terapi grubunda ise %93 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.12: Uygulama 11'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Uygulama 12'ye ait sonuçlar Şekil 4.14'de verilmiştir. Bu uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μ M Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. 4 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %108, lazer kontrol grubunda %102, Fotodinamik terapi grubunda ise %83,5 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 24 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %100, lazer kontrol grubunda %112, Fotodinamik terapi grubunda ise %95 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %108,5, lazer kontrol grubunda %61, Fotodinamik terapi grubunda ise %106 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$). 72 saatin sonundaki hücre canlılık yüzdeleri Fotolon kontrol grubunda %106, lazer kontrol grubunda %108,5, Fotodinamik terapi grubunda ise %93,5 olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.13: Uygulama 12'ye ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

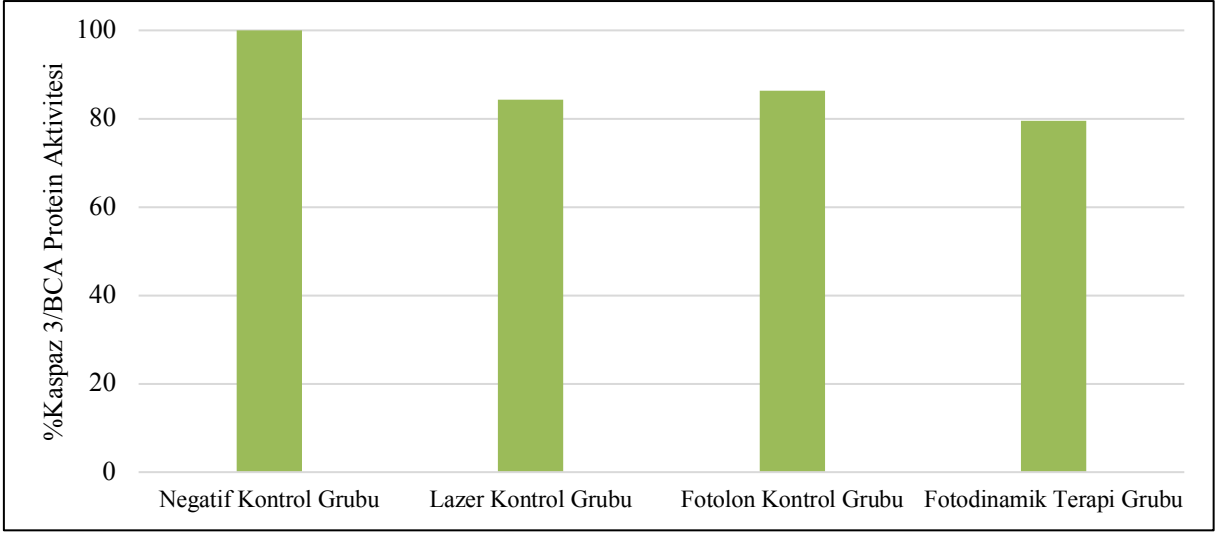
Optimizasyon çalışması sonunda optimum inkübasyon süresi ve lazer enerji yoğunluğu belirlenirken seçilen parametrelerde Fotodinamik terapi uygulama sonuçlarının MRC-5 normal hücre hattı üzerinde sitotoksitesinin düşük iken MIA PaCa-2 tümör hücre hattı üzerinde yüksek olmasına dikkat edilmiştir. Bu amaçla optimum uygulama parametreleri olarak 60 dakika Fotolon inkübasyonu ardından 5 J/cm^2 enerji uygulaması ve tedavi sonrası bekleme süresi olarak da 4 saat seçilmiştir.

4.3. ANA ÇALIŞMA BULGULARI

4.3.1. MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Ana Çalışma Bulguları

4.3.1.1. Kaspaz-3/BCA Protein Aktivitesi Testi Bulguları

Ana deney çalışmasında belirlenen uygulama parametreleri doğrultusunda Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi grupları hücrelerde fotoduyarlı ajanın akümüle edilmesi amacıyla 60 dakika boyunca $10 \mu\text{M}$ Fotolon ile inkübe edilmiştir. Ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Lazer uygulamalarının ardından sonuçları değerlendirmek için bütün gruplar 4 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analiz sonuçları Şekil 4.15'te verilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizine göre, MRC-5 hücre hattı üzerinde negatif kontrol grubunda Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi %100 kabul edilmiştir. Diğer grupların Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi sonuçları ise şu şekildedir; Fotolon kontrol grubunda %86,38, lazer kontrol grubunda %84,29 ve Fotodinamik terapi grubunda %79,49'dur ($p < 0,05$).

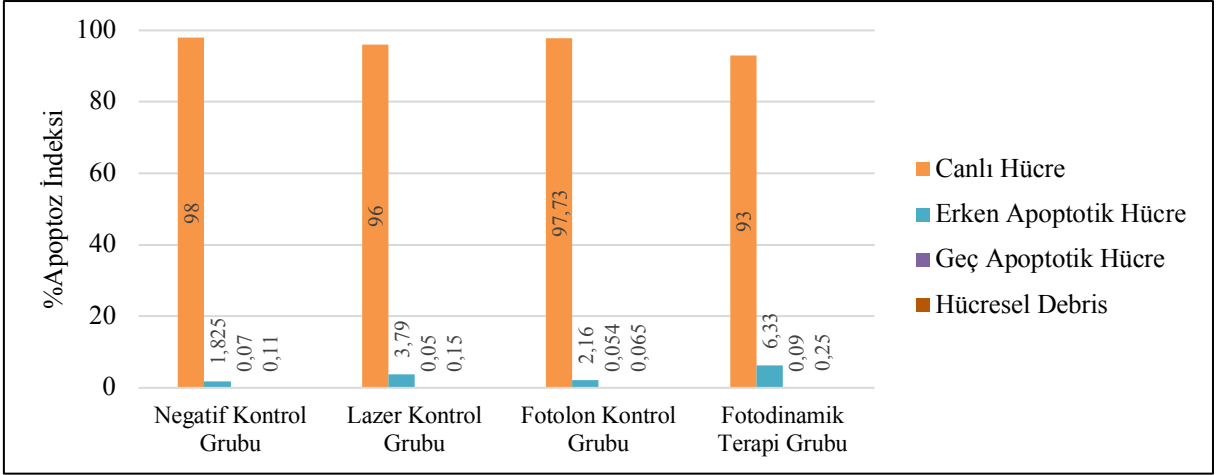


Şekil 4.14: MRC-5 hücre hattı Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi bulguları.

Şekil 4.15'e bakıldığında apoptotik bir protein olan Kaspaz-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi grubu ve Negatif kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p < 0,05$). Fotodinamik terapi uygulanan grupta bu protein ekspresyonunun negatif kontrol grubuna kıyasla %20,51 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir. Normalde Kaspas-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi uygulanan grupta daha fazla olması beklenmekteydi.

4.3.1.2. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi Bulguları

Ana deney çalışmasında belirlenen uygulama parametreleri doğrultusunda Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi grupları hücrelerde fotoduyarlı ajanın akümüle edilmesi amacıyla 60 dakika boyunca 10 μ M Fotolon ile inkübe edilmiştir. Ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Lazer uygulamalarının ardından sonuçları değerlendirmek için bütün gruplar 4 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın akış sitometri yöntemi ile belirlenen apoptotik hücre tayinine göre MRC-5 hücre hattındaki sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. Buna göre; negatif kontrol grubunda hücrelerin %97,67'si canlı, %1,99'u erken apoptotik, %0,23'ü geç apoptotik, %0,11'i hücresel debrisdir. Lazer kontrol grubunda hücrelerin %96'sı canlı, %3,79'u erken apoptotik, %0,05'i geç apoptotik, %0,16'sı hücresel debrisdir. Fotolon kontrol grubunda hücrelerin %97,7'si canlı, %2,2'si erken apoptotik, %0,03'ü geç apoptotik, %0,07'si hücresel debrisdir. Fotodinamik terapi grubunda hücrelerin %72,19'u canlı, %17,47'si erken apoptotik, %10,09'u geç apoptotik, %0,25'i hücresel debrisdir.

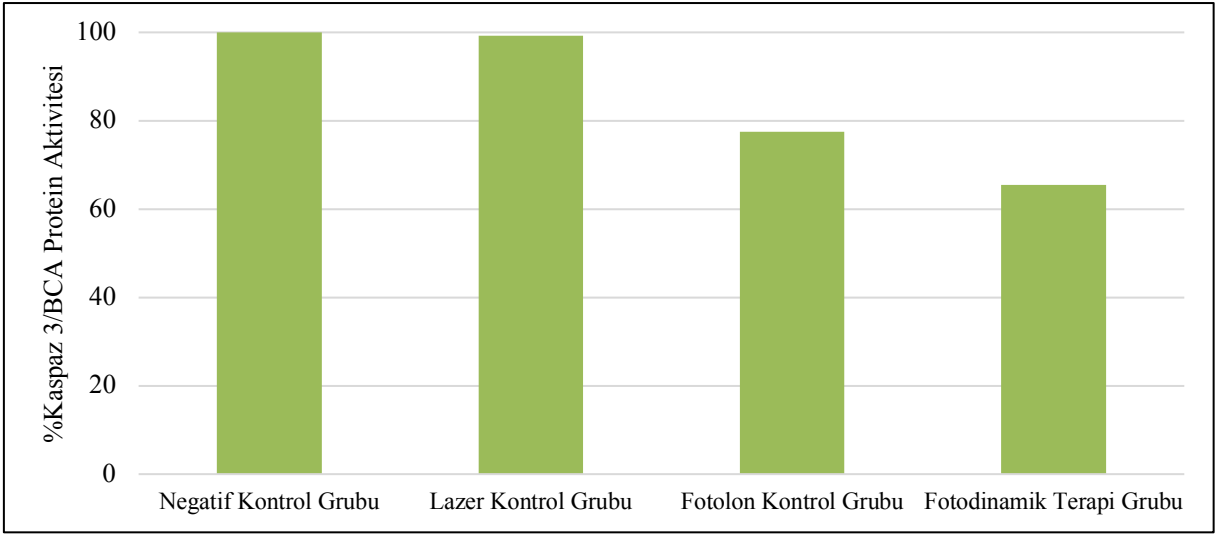


Şekil 4.15: MRC-5 hücre hattı Annexin-V Apoptoz/Nekroz testi sonuçları.

4.3.2. MIA PaCa-2 Hücre Hattı Üzerindeki Ana Çalışma Bulguları

4.3.2.1. Kaspaz 3/BCA Protein Aktivitesi Testi Bulguları

Ana deney çalışmasında belirlenen uygulama parametreleri doğrultusunda Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi grupları hücrelerde fotoduyarlı ajanın akümüle edilmesi amacıyla 60 dakika boyunca 10 μ M Fotolon ile inkübe edilmiştir. Ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Lazer uygulamalarının ardından sonuçları değerlendirmek için bütün gruplar 4 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analiz sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir. Uygulamanın Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi analizine göre, MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol grubunda Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi %100 kabul edilmiştir. Diğer grupların Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi sonuçları ise şu şekildedir; Fotolon kontrol grubunda %77,51, lazer kontrol grubunda %99,19 ve Fotodinamik terapi grubunda %65,45’tir (p<0,05).

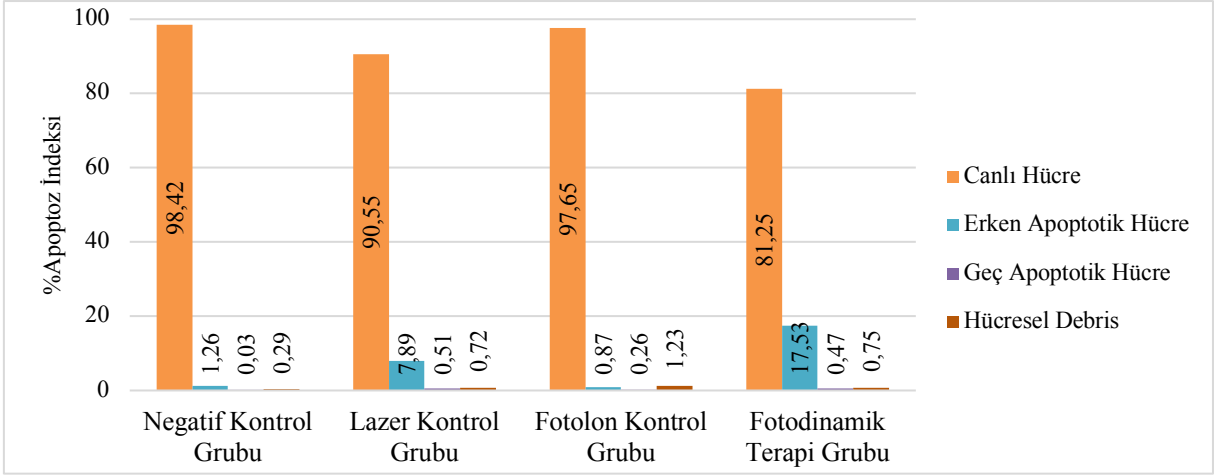


Şekil 4.16: MIA PaCa-2 hücre hattı Kaspaz 3/BCA protein aktivitesi bulguları.

Şekil 4.17'ye bakıldığında apoptotik bir protein olan Kaspaz-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi grubu ve Negatif kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p < 0,05$). Fotodinamik terapi uygulanan grupta bu protein ekspresyonunun negatif kontrol grubuna kıyasla %34,55 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir. Normalde Kaspas-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi uygulanan grupta daha fazla olması beklenmekteydi.

4.3.2.2. Annexin-V Apoptoz/Nekroz Testi Bulguları

Ana deney çalışmasında belirlenen uygulama parametreleri doğrultusunda Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi grupları hücrelerde fotoduyarlı ajanın akümüle edilmesi amacıyla 60 dakikaboyunca 10 μM Fotolon ile inkübe edilmiştir. Ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Lazer uygulamalarının ardından sonuçları değerlendirmek için bütün gruplar 4 saat inkübe edilmiştir. Uygulamanın akış sitometri yöntemi ile belirlenen apoptotik hücre tayinine göre MIA PaCa-2 hücre hattındaki sonuçları Şekil 4.18'd3 verilmiştir. Buna göre; negatif kontrol grubunda hücrelerin %98,42'si canlı, %1,26'sı erken apoptotik, %0,03'ü geç apoptotik, %0,29'u hücresel debrisdır. Lazer kontrol grubunda hücrelerin %90,55'i canlı, %7,89'u erken apoptotik, %0,51'i geç apoptotik, %0,72'si hücresel debrisdır. Fotolon kontrol grubunda hücrelerin %97,65'i canlı, %0,87'si erken apoptotik, %0,26'sı geç apoptotik, %1,23'ü hücresel debrisdır. Fotodinamik terapi grubunda hücrelerin %51,25'i canlı, %31,2'si erken apoptotik, %14,63'ü geç apoptotik, %2,92'si hücresel debrisdır.



Şekil 4.17: MIA PaCa-2 hücre hattı Annexin-V Apoptoz/Nekroz testi sonuçları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pankreas kanseri ölüm oranı görülme sıklığı ile paralellik gösteren ölümcül bir kanser türüdür. Hastalık bir aşamaya ulaşıncaya kadar pankreas kanseri asemptomatik kalır. Erken evrelerde spesifik bir semptomunun olmaması hastalığın ancak ileri evrelerdeyken teşhis edilmesine neden olmaktadır. Pankreas kanseri tanısı konan hastaların neredeyse tamamı metastaz geliştirir. Buna bağlı olarak da tanısı konulan ve cerrahi operasyon ile müdahale edilebilecek hastaların yüzdesi oldukça düşüktür. Tanısı konulan hastaların sadece %20'si hastalık evrelemesine bağlı olarak cerrahi operasyona uygundur. Cerrahi operasyon ile tedavi edilen hastaların ise %80'ninde hastalığın nüksettiği görülmüştür. Lokal ileri, unrezektabl ve metastatik evredeyken tanı konulan hastalarda palyatif tedavi amaçlı kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları yapılmaktadır. Pankreas kanserinin mevcut tedavilere karşı direncine rağmen yeni tedavi yöntemleri araştırılmakta ve geliştirilmektedir. Geleneksel tedavilerin başarısız sonuçları ve toksitiden kaynaklanan risklerden dolayı radyofrekans ablasyon (RFA), geri dönüşümsüz elektroporasyon (IRE), stereotaktik vücut radyasyon tedavisi (SBRT), yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU), mikrodalga ablasyon, fotodinamik terapi (PDT), kryoablasyon gibi yerel ablasyon gibi tedavi yöntemleri önem kazanmaya başlamıştır (Liao ve diğ., 2013; Singh ve diğ., 2015).

Fotodinamik terapi gelişen, minimal invaziv özellikle onkolojik, dermatolojik ve oftalmolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik terapi dokuda akümüle olan ışığa duyarlı ajanın absorpsiyon yaptığı dalga boyunda ışımaya yapan bir ışık kaynağı ile uyarılması sonucu aktif hale gelerek singlet oksijen ve reaktif oksijen türlerinin üretmesi ve hedef tümör dokuyu tahrip etmesi esasına dayanan bir kombinasyon tedavisidir. Fotodinamik terapinin bileşenlerinin hiçbiri tek başına toksik değildir. Fotodinamik terapi onkolojik hastalıkların tedavisinde tek başına toksik olmayan ışığa duyarlı ajanın tümör dokusunda seçici olarak akümle olması ve yalnız hedef tümör dokunun ışınlanmasıyla birden fazla lezyonu aynı anda tedavi edebilmesine ve prognoz sağlanana kadar tedavinin tekrarlanabilmesine imkân vermektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda rapor edilmiş herhangi bir kontrendikasyon olmaması sayesinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere diğer standart tedavilerle birlikte adjuvan ve/veya neoadjuvan olarak uygulanabilir. Fotodinamik terapi tedavi sırasında kolajen dokusuna zarar vermemesi sayesinde hedef dokuda tedavi sonrası iyileşme oranı diğer tedavilere kıyasla daha

iyidir. Tümör direnci indüklenmeden tedavinin tekrarlanmasına imkân vermektedir. Işığa duyarlı ajanın verilmesi ile ışık ile uyarılma arasında geçen sürenin uzun olduğu başka bir deyişle hedef dokuda akümüle olma süresi daha uzun olan ışığa duyarlı ajanların hastada meydana getirdiği cilt hassasiyeti dışında minimum yan etkileri vardır. Özellikle birinci nesil ışığa duyarlı ajanlarda daha sık karşılaşılan bu durum ikinci ve üçüncü nesil ışığa duyarlı ajanlarda büyük ölçüde azaltılmıştır (Wilson, 2002).

Günümüzde geleneksel kemoterapi halen uygulanmakta olan önemli bir tedavi yöntemi olmasına rağmen zamanla tümör hücrelerinde ilaçlara karşı zamanla direnç gelişimi görülebilir. Bu durumda tümörlü dokuda oluşan ilaç direnci apoptotik yanıt oranını düşürebilir. Bununla birlikte kemoterapi tümör hücrelerine yok ederken zararlı hücreleri de zarar vermektedir. Bu nedenle kanser tedavilerinde seçici tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Radyoterapide ise kullanılan X ışınları sebebiyle tümörlü doku çevresinde sağlıklı doku ve organ harabiyeti oluşmaktadır. Hastalığın nüks etmesi durumunda ise tedavi edilen doku ve organın maksimum tolerans dozuna ulaşmış olmasından dolayı tekrarlanması mümkün olmamaktadır.

Bown ve arkadaşlarının 2002 yılında klinikte 16 ameliyat edilemeyecek pankreas kanseri hastası üzerinde yapılan Foscan güdümlü fotodinamik terapi sonucunda tedavinin kabul edilebilir oranda nekroza yol açtığı belirtilmiştir (Bown ve diğ., 2002).

Fotolon güdümlü Fotodinamik terapinin MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücreleri üzerindeki etkilerini incelediğimiz bu çalışma optimizasyon ve ana deneyler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Çalışmada ilk olarak Fotolon'un MIA PaCa-2 pankreas epitelyal karsinoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağımlı etkisi araştırılarak terapi sırasında kullanılacak Fotolon'un konsantrasyonu optimize edilmiştir. Fotolon'un 100 µM, 50 µM, 25 µM, 20 µM, 12,5 µM, 10 µM, 6,5 µM, 5 µM ve 2,5 µM olmak üzere 9 farklı konsantrasyonun WST-1 testiyle hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Fotolon konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı yüzdeleri 100 µM için %9,31, 50 µM için %46,80, 25 µM için %81,45, 20 µM için %72,87, 12,5 µM için %65,24, 10 µM için %82,25, 6,5 µM için %92,16, 5 µM için %91,79, 2,5 µM için %106,03 olarak belirlenmiştir. Fotolon konsantrasyonu 10 µM'a sabitlenmiştir. Seçilen bu konsantrasyonun hücre canlılığını inhibe ve proliferasyonu etmediği gözlemlenmiştir.

Optimizasyon çalışmasında MIA PaCa-2 ve MRC-5 hücre hatlarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyonun ardından 1 J/cm², 2,5 J/cm² ve 5 J/cm²

enerji yoğunluğu ile lazer ile uyarılmıştır. Bu parametreler ile optimizasyon deneyi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar WST-1 canlılık testiyle değerlendirilmiştir.

Optimizasyon çalışmasının ilk aşamasında MRC-5 hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için 2 farklı parametre optimize edilmiştir. Optimize edilen ilk parametre, fotoduyarlı madde olan Fotolon'un inkübasyon süresidir. 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Optimize edilen ikinci parametre ise uygulanacak lazer yoğunluğudur. 1 J/cm², 2,5 J/cm² ve 5 J/cm² olmak üzere 3 farklı lazer yoğunluğu denenmiştir. Çalışmaya ait uygulamalara ait tedavi protokolleri 3.4.1'de izah edilmiştir.

1. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 µM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunun 24 saat sonra için hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %82 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 24 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %82 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

2. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 µM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunun 24 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %81 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 24 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %82 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

3. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 µM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunun 24 saat saat hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %75 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu

gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 24 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %85 oranında azalmış, anlamlı bir etki olduğu ve sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

4. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 μM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunun 4 saat süre için hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %28 oranında azalmıştır. 24 saat sonra ise hücrelerin proliferasyonuna geçmesi canlılığı %90'a getirdiği gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 4 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %18 oranında arttığı ve uygulanan tedavinin hücreleri de canlandırarak biyostimülasyona neden olduğu söylenebilir. Aynı etki 24 saat süre içinde gözlemlenmiştir. Ancak 48 ve 72 saat sonra fotodinamik terapi uygulamalarında kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılığın sırasıyla yaklaşık %37 ve %35 oranında düştüğü gözlemlenmiştir.

5. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 μM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunda 4, 24, 48 ve 72 saat sonraki sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık oranlarında anlamlı olmayan toksik bir etki gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 24 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %70 oranında düştüğü gözlemlenmiştir.

6. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 μM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunda 4, 24, 48 ve 72 saat sonraki sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılığın arttığı gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 72 saat sonra hücrelerdeki etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlılık yaklaşık %83 oranında düştüğü gözlemlenmiştir.

MRC-5 hücre hattına ait optimizasyon çalışmasının uygulamalarında lazer kontrol grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir toksik etki olmadığı ve hücreleri canlandırarak biyostimülasyona neden olduğu gözlemlenmiştir.

Prachi Sharma ve arkadaşlarının 2009 yılında MRC-5 hücre hattı ve NSCLC(küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) üzerinde Photofrin güdümlü fotodinamik terapi yapmışlardır. Çalışmada Photofrin 'in hücre içerisine tutulum oranı tüm hatlar üzerinde araştırılmış ve sonuç olarak hücre içerisine tutulum oranının hücre hatları üzerinde farklılık göstermediği belirtilmiştir.

MRC-5 hücre hattı üzerinde yaptığımız bu optimizasyon çalışması sonucunda 30 dakika inkübasyonun yapıldığı Fotolon kontrol gruplarında Fotolon'un hücre içine tutulum oranının yüksek olmasına bağlı olarak toksik bir etki gözlenmiştir. Bununla birlikte tutulum oranının yüksek olması fotodinamik terapinin de tetiklendiğini göstermektedir.

MRC-5 hücre hattı üzerinde yaptığımız bu optimizasyon çalışması sonucunda 60 dakika inkübasyonun yapıldığı Fotolon kontrol gruplarında Fotolon'un hücre içine tutulum oranının 30 dakika inkübasyon ile kıyaslandığında daha düşük olduğu gözlemlenmektedir. Ancak fotodinamik terapi gruplarının canlılık oranları kıyaslandığında 60 dakika inkübasyonun ardından uygulanan fotodinamik terapinin canlılığı daha çok düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu da chlorin e6 tabanlı olan Fotolon'un hücre içerisinde parçalanarak akümüle olduğunu göstermektedir.

Optimizasyon çalışmasının ikinci aşamasında MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde *in vitro* Fotolon güdümlü fotodinamik terapi uygulamaları için 2 farklı parametre optimize edilmiştir. Optimize edilen ilk parametre, fotoduyarlı madde olan Fotolon'un inkübasyon süresidir. 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Optimize edilen ikinci parametre ise uygulanacak lazer yoğunluğudur. 1 J/cm², 2,5 J/cm² ve 5 J/cm² olmak üzere 3 farklı lazer yoğunluğu denenmiştir. Çalışmaya ait uygulamalara ait tedavi protokolleri 3.4.2'de izah edilmiştir.

7. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 µM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 1 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 µM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunda 48 saat sonra canlılığın %14 oranında düştüğü ancak 72 saat sonunda proliferatif etkinin söz konusu olmasıyla birlikte %32 arttığı gözlemlenmiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 48 saat sonra Fotolon inkübasyonu bağlı olduğunu düşündüğümüz bir etki sonucu canlılığın

%25 düştüğü ancak 72 saat sonunda biyostimülatif etki oluşmasıyla %32 arttığı gözlemlenmiştir. Uygulanan lazer enerji yoğunluğunun yetersiz kaldığı söylenebilir.

8. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 2,5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde 10 μM Fotolon uygulanan Fotolon kontrol grubunda 4, 48 ve 72 saat sonra canlılığın arttığı proliferatif etkinin söz konusu olduğu söylenebilir. Fotodinamik terapi uygulanan grubun 4 ve 24 saat sonra sonuçları değerlendirildiğinde anlamlı olmayan bir etkinin söz konusudur. Çünkü 48 ve 72 saat sonunda canlılığın arttığı gözlemlenmiştir. Uygulanan lazer enerji yoğunluğunun yetersiz kaldığı söylenebilir.

9. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde akümülyasyon süresinin lazer enerji yoğunluğunun yetersiz kaldığı görülmüştür.

10. ve 11. uygulamalarda Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 60 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları sırasıyla 1 ve 2,5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde akümülyasyon süresinin lazer enerji yoğunluğunun yetersiz kaldığı görülmüştür.

12. uygulamada Fotolon kontrol ve Fotodinamik terapi gruplarına 10 μM Fotolon ile 30 dakika inkübasyonunun ardından lazer kontrol grubu ve Fotodinamik terapi grupları 5 J/cm^2 enerji ile uyarılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde grupların hepsinde 24, 48 ve 72 saat sonunda proliferatif bir etki görülmüştür. Ancak fotodinamik terapi grubuna ait uygulamanın 4 saat sonra canlılık oranının %52 oranında düşürdüğü görülmüştür.

MIA PaCa-2 hücre hattına ait optimizasyon çalışmasının uygulamalarında lazer kontrol grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir toksik etki olmadığı ve hücreleri canlandırarak biyostimülasyona neden olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada genel olarak fotodinamik terapi gruplarında oluşması beklenen etki görülmemiştir. Bunun nedeni kullanılan ışığa duyarlı ajanın hidrofilik yapıda olmasının hücre içine tutulumunu geciktirmiş olabilir. Bununla birlikte kullanılan lazerin enerji yoğunluğunun yetersiz kaldığı da söylenebilir.

Optimizasyon deneyine ait tüm sonuçlar değerlendirildiğinde en olması en iyi sonuçların 60 dakika Fotolon inkübasyonu ardından uygulanan 5 J/cm^2 lazer enerji yoğunluğu ile uyarıldığı uygulama olan 12. uygulamada olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu uygulamaya ait parametrelerin kullanıldığı MRC-5 hücre hattı üzerinde 4 saat sonraki etkisi ile kıyaslandığında daha başarılı olduğu görülmüştür.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında ana deneyler yapılmıştır. Bu kapsamda optimizasyon deneyleri ile belirlenen parametreler kullanılarak uygulamalar tekrarlanmıştır. Sonuçlar Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi ve Annexin-V testleri ile değerlendirilmiştir.

Ana çalışmanın ayrıntıları 3.4.2'de verilmiştir.

Ana çalışmasının ilk aşamasında MRC-5 hücre hattı üzerinde 60 dakika Fotolon inkübasyonu ardından 5 J/cm^2 lazer enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır. Uygulamalardan 4 saat sonra Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi ölçülmüştür.

MRC-5 hücre hattında Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde Kaspaz-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi grubu ve Negatif kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir. Fotodinamik terapi uygulanan grupta bu protein ekspresyonunun negatif kontrol grubuna kıyasla %20,51 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir. Normalde Kaspas-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi uygulanan grupta daha fazla olması beklenmekteydi.

MIA PaCa-2 hücre hattında Kaspaz-3/BCA protein aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde Kaspaz-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi grubu ve Negatif kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p < 0,05$). Fotodinamik terapi uygulanan grupta bu protein ekspresyonunun negatif kontrol grubuna kıyasla %34,55 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir. Normalde Kaspas-3 aktivitesinin Fotodinamik terapi uygulanan grupta daha fazla olması beklenmekteydi.

Bu sonuçlardan hareketle MRC-5 ve MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde yapılan uygulamaların Kaspaz-3 proteini üzerinde etki etmediğini apoptozu başlatacak olan mekanizmanın bu yolda olmadığı anlaşılmaktadır.

Annexin-V analizi uygulamalardan sonra hücrelerdeki apoptoz ve nekrozun kantitatif tayini yapılmıştır. Ana çalışmasının ilk aşamasında MRC-5 hücre hattı üzerinde 60 dakika Fotolon

inkübasyonu ardından 5 J/cm² lazer enerji yoğunluğu ile uyarılmıştır. Uygulamalardan 4 saat sonra Annexin-V testi yapılmıştır.

MRC-5 hücre hattında Annexin-V testi sonuçları değerlendirildiğinde lazer kontrol grubu, Fotolon kontrol grubu ve fotodinamik terapi gruplarında canlılığın büyük ölçüde korunmuştur.

MIA PaCa-2 hücre hattında Annexin-V testi sonuçları değerlendirildiğinde lazer kontrol grubu ve Fotolon kontrol gruplarında canlılığın büyük ölçüde korunmuştur. Fotodinamik terapi uygulanan grupta ise canlılığın %81'e düştüğü bununla birlikte tedavinin apoptotik hücre ölümünü tetiklediği görülmektedir.

Ana çalışmanın test sonuçları değerlendirildiğinde Fotolon güdümlü Fotodinamik terapinin kullandığımız parametreler ile hücreleri apoptoza sürüklediği söylenebilir. Ancak hücreleri apoptoza sürükleyen mekanizmanın Kaspaz-3 olmadığı görülmektedir.

Yapılan tez çalışmasında Fotolon güdümlü fotodinamik terapinin pankreatik adenokarsinom hücrelerini apoptoza sürüklediği görülmüştür. Ancak bu etkinin tedavi için yeterli olmadığı söylenebilir. Uygulanan tedavi hücreler üzerinde erken evrede apoptoza neden olmuştur. Ancak bu oranın %17'lerde olması bu parametrelerle uygulanan tedavinin tek başına küratif bir etki oluşturamayacağını göstermektedir. Bunun yerine özellikle klinikte adjuvan veya neoadjuvan olarak uygulanması tedavinin beklenen etkisinin gösterilmesini sağlayabilir.

Yaptığımız çalışmanın literatüre özgün katkı sağlayacağını ve yapılacak çalışmalar için veri kaynağı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aaron R. Sasson, R. Wesley Wetherington, John P. Hoffman, Eric A. Ross, Harry Cooper, Neal J. Meropol, Gary Freedman, James F. Pingpank, Burton L. Eisenberg. (2003). Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Adenocarcinoma of the Pancreas. *34*(2), s. 121-127.
- Abels, C. (2004). Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & Photobiological Sciences*(3), s. 765–771.
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*(473), 347–364.
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001, Kasım). The history of photodetection and photodynamic therapy. *74*(5), s. 656-669.
- Agostinis, P., Buytaert, E., Breysens, H., & Hendrickx, N. (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *3*, 721-729.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., . . . Nowis, D. (2011). Photodynamic Therapy Of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *4*(61), 250–281.
- Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*(46), s. 24-29.
- Allison, R., Downie, G., Cuenca, R., Hu, X.-H., Childs, C., & Sibata, C. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *1*, s. 27-42.
- Allyn, B. (1962, Aralık). Studies on phototoxicity in man and laboratory animals. *The American Academy of Dermatology*.
- Almeida, R., Manadas, B., Carvalho, A., & Duarte, C. (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* (1704), 59-86.
- Alteri, R., Barzi, A., & Bertaut, T. (2017). *Canser Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society.
- Bacellar, I., Tsubone, T., Pavani, C., & Baptista, M. (2015). Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *International Journal of Molecular Sciences*(15), 20523-20559.
- Baltazar, L., Ray, A., Santos, D., Cisalpino, P., Friedman, A., & Nosanchuk, J. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*(8).

- Baltazar, L., Werneck, S., H. C.Carneiro, Gouveia, L., De Paula, T., & Byrro, R. (2015). Photodynamic therapy efficiently controls dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a murine model. *British Journal of Dermatology*(172), 801-804.
- Başyazı. (2009). Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*(6), s. 94-96.
- Bhuvanewari, R., Gan, Y., Soo, K., & Malini, O. (2009). The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *14*(66), s. 2275-2283.
- Blake, E., Allen, J., & Curnow, A. (2013). The effects of protoporphyrin IX-induced photodynamic therapy with and without iron chelation on human squamous carcinoma cells cultured under normoxic, hypoxic and hyperoxic conditions. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 4(10), s. 575-582.
- Bown, S., Rogowska, A., Whitelaw, D., Lees, W., Lovat, L., & Ripley, P. (2002). Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut*, s. 549-557.
- Boz, G., Paoli, A., Innocente, R., Rossi, C., Tosolini, G., Bassi, C., Trovò, M. (2006). Radiotherapy and Chemotherapy in Pancreatic Cancer. Topical Issues and Future Perspectives. *Journal of the Pancreas (Online)*, 1(7), s. 122-130.
- Brancaleon, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in medical science*, 3(17), s. 173-186.
- Brown, E., Walker, I., & Brown, S. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*(5), 497-508.
- Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. (1776).
- Calzavara-Pinton, P., Venturini, M., & Sala, R. (2007, Mart). Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 3(21), s. 293-302.
- Cancer Facts & Figures 2017. (2017).
- Compton, C. C., Byrd, David R., & Garcia-Aguilar, J. (2013). *AJCC Kanser Evreleme Atlası*. (P. D. ERGÜNEY, Çev.) İstanbul, Hadımköy: Nobel Tıp Kitap Evleri.
- Castano, A., Demidova, T., & Hamblin, M. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*(1), 279—293.
- Castano, A., Mroz, P., & Hambling, M. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. (6).
- Chavalitdhamrong, D., DiMaio, C., Siersema, P., & Wagh, M. (2015, Ağustos). Technical advances in endoscopic ultrasound-guided fiducial placement for the treatment of pancreatic cancer.

- Conroy, T., Desseigne, F., & Ychou, M. (2011, May 11). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*(364), s. 1817-1825.
- Copley, L., Watt, P., Wirtz, K., Parker, M., & Leaner, V. (2008). Photolon™, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*(40), s. 227-235.
- Daniell, M., & Hill, J. (1991). A History of Photodynamic Therapy. (61), s. 340-348.
- De Rosa, F., & Bentley, M. (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharmaceutical Research* (17), 1447-1455.
- Delebe, T., Peng, S., & Tsai, H.-C. (2015). Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. (16).
- DeRosa, M., & Crutchley, R. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, s. 351-371.
- Dolmans, D., Fukumura, D., & Jain, R. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*(3), 380–387.
- Erkiert-Polguj, A., Halbina, A., Polak-Pacholczyk, I., & Rotsztein, H. (2016). Light-emitting diodes in photodynamic therapy in non-melanoma skin cancers-Own observations and literature review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*(18), s. 105-110.
- Fahmy, I., & Abushady, H. (1948). Ammi majus Linn: The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukoderma. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(21), 499-503.
- Fahmy, I., & Abushady, H. (1947, Ekim 4). A crystalline principle from Ammi majus Linn. *Nature*(160).
- Fingar, V., Wieman, T., Wiehle, S., & Cerrito, P. (tarih yok). The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Research*, 18(52), s. 4914-4921.
- Finger, V. (1996). Vascular effect of photodynamic therapy. (14).
- Fitzmaurice, Christina. (2017, nisan). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability- Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*, 3(4).
- Foote, C. (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*(162), 963-970.
- Foote, C. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemical & Photobiological Sciences*(54), 659.

- Fraumeni, J. F. (1975). Cancers of the Pancreas and Biliary Tract: Epidemiological Considerations.
- Geiger, P., Korytowski, W., & Girotti, A. (1995). Photodynamically generated 3- β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide: toxic reactivity in membranes and susceptibility to enzymatic detoxification. *3*(62).
- Gollnick, S., Owczarczak, B., & Maier, P. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Laser in Surgery and Medicine*, *5*(38), s. 509-511.
- Goode, J., & Matson, M. (2014, Haziran 15). Embolisation of cancer: what is the evidence? *Cancer Imaging*(4), s. 133-141.
- GÖRAL, V. (2014, Aralık). Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı. *Güncel Gastroenteroloji* *18/4*.
- Güneyi, D. A. (2005). Periapüler Bölge Tümörlerinde Pilor Koruyucu Penkreatikoduodenektominin Yeri. T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı.
- Gürsoy, H., Özçakır-Tomruk, C., Tanalp, J., & Yılmaz, S. (2012). Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigations*.
- Hakansson, N., Permert, J., Larsson, S., Naslund, I., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *British Journal of Cancer*(93), 1310 – 1315.
- Hamblin, M., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*(3), 436–450.
- Hausmann, W. (1911). Die sensibilisierende wirkung des hematoporphyrins. *Biochemistry*(30), 276-316.
- Henderson, B. (1992). How does photodynamic therapy work? (55).
- Henderson, B., Busch, T., & Snyder, J. (2006). Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in Surgery and Medicine*(38), s. 489-493.
- Henderson, B., Gollnick, S., Snyder, J., Busch, T., Kousis, P., Cheney, R., & Morgan, J. (2006). Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Research*(64), s. 2120-2126.
- Henry, S., Prizment, A., & Anderson, K. (2013). Duration of diabetes and pancreatic cancer in a case-control study in the Midwest and the Iowa Women's Health Study (IWHS) cohort. *Journal of Oncology Practice*, *14*(3), 243-249.
- Hönigsmann, H. (2013). History of phototherapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences*(12), s. 16-21.

- Hönigsmann, H. (2013). Phototherapy. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Hsieh, Y., Wu, C., & Chang, C. (2003). Subcellular localization of photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. (194).
- Igor Buzalewicz, I. H. J. (2017, Haziran). Towards dosimetry for photodynamic diagnosis with the low-level dose of photosensitizer. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 173, 333-343.
- İmamoğlu, Ş., & Özyardımcı Ersoy, C. (Ocak, 2009). *Diabetes Mellitus* (2. b.). Bursa: Deomed Medikal Yayıncılık.
- Inguscio, V., Panzarini, E., & Dini, L. (2012). Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy. (1).
- Istomin, Y., Lapzevich, T., Chalau, V., Shliakhtsin, S., & Trukhachova, T. (2010). Photodynamic therapy of cervical intraepithelial neoplasia grades II and III with Photolon®. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*(7), s. 144-151.
- Jain, R., Dolmans, D., & Fukumura, D. (2003). Photodynamic therapy for cancer. . *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380-387.
- Jennings, R., Berry, A., Strutt, J., Gerrard, D., & Hanley, N. (2015). Human pancreas development. *The Company of Biologists*(142), s. 3126-3137.
- Jones, J. (2015-2017). *Pancreas*. Radiopaedia Pty Ltd: <https://radiopaedia.org/articles/pancreas> adresinden alındı
- Juzeniene, A., & Moan, J. (2007). The history of PDT in Norway. Part one - identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*(4), 3-11.
- Kafes, N. (2013). Pankreas Kanseri Oluşumu, Tanı Yöntemleri ve Tedavisi. T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Erciyes: Erciyes Üniversitesi.
- Kamisawa, T., Wood, L., Itoi, T., & Takaori, K. (2016, Ocak 26). Pancreatic cancer. *The Lancet*.
- Karanikas, M., Esempidis, A., Chasan, Z., Deftereou, T., Antonopoulou, M., Bozali, F., Man, Y.-G. (2016). Pancreatic Cancer from Molecular Pathways to Treatment Opinion. *Journal of Cancer*, s. 1328-1339.
- Kessel, D. (1992). Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease. 6(4), 219-225.
- Kessel, D., & Woodburn, K. (1993). Biodistribution of Photosensitizing Agents. *International Journal of Biochemistry*(25), s. 1377-1383.
- Kessel, D., Vicente, M., & Jr, J. (2006). Initiation of Apoptosis and Autophagy by Photodynamic Therapy. 38(5).

- Konopka, K., & Goslinski, T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*, 8(86), 694-707.
- Korbelik, M., & Cecic, I. (2008). Complement activation cascade and its regulation: relevance for the response of solid tumors to photodynamic therapy,. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1(93), s. 53-59.
- Krammer, B. (2001). Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Research*, 21(6B), s. 4271-4277.
- Krejs, G. J. (2010). Pancreatic Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Digestive Diseases*, 28, 355-358.
- Kumar, S., Thakur, C., Li, L., Cui, H., & Chen, F. (2017, Temmuz). Pathological and prognostic role of mdig in pancreatic cancer. *Genes & Cancer*, 8.
- Lennon, S., Martin, S., & Cotter, T. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. (24).
- Levine, N., Don, S., Owens, C., Rogers, D., Kligman, A., & Forlot, P. (1989, Eylül). The Effects of Bergapten and Sunlight on Cutaneous Pigmentation. *125(9)*, s. 1225-1230.
- Liao, W.-C., Chien, K.-L., Lin, Y.-L., Wu, M.-S., Lin, J.-T., Wang, H.-P., & Tu, Y.-K. (2013). Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 14, s. 1095-1103.
- Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Arama Sonuçları Chemical Reviews (ACS Publications) - American Chemical Society*(115), s. 1990–2042.
- Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *MEDICINA*, 12(39), s. 1137-1150.
- Luo, Y., & Kessel, D. (1997). Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine (Review). *Photochemical & Photobiological Sciences*(66), s. 479-483.
- Maccormack, M. (2008). Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes,. (27).
- Masa Skelin, M. R. (2010, Mayıs 17). Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *2(10)*, s. 105-113.
- Meisel, P., & Kocher, T. (2005). Photodynamic therapy for peri- odontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (79), s. 150-170.
- Meyer-Betz , F. (1913). Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut – und Galenfarbstoffs. . *Deutsches Archiv Fur Klinische Medizin*, 112, 475–503.

- Moserova, I., & Kralova, J. (2012). Role of ER Stress Response in Photodynamic Therapy: ROS Generated in Different Subcellular Compartments Trigger Diverse Cell Death Pathways. *7*(3).
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G., & Hamblin, M. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. . (3).
- Muniraj, T., Jamidar, P., & Aslanian, H. (2013). Pancreatic cancer: A comprehensive review and update. *Disease a Month*(59), 368-402.
- Neoptolemos, J., Dunn, J., Stocken, D., Almond, J., Link, K., Beger, H., Büchler, M. (2001). Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*(358), s. 1576-1585.
- Neoptolemos, J., Moore, M., Cox, T., Valle, J., Palmer, D., McDonald, A., Smith, D. (2012, Temmuz 11). Effect of Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid or Gemcitabine vs Observation on Survival in Patients With Resected Periapillary Adenocarcinoma/The ESPAC-3 Periapillary Cancer Randomized Trial. *308*(2).
- Neoptolemos, J., Stocken, D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J., Hickey, H., Büchler, M. (2018, Mart 18). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *350*, 1200-1210.
- Nilanjana Tewari, Dileep N Lobo. (2013). Pancreatic cancer. *Surgery*, *31*(6), 286-294.
- Niu, L.-Z., Chen, J.-B., X, K.-C., & Luo, X.-M. (2016, Ocak 14). Advances in cryoablation for pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *12*(2), s. 790-800.
- Noodt, B., Berg, K., Stokke, T., Peng, Q., & Nesland, J. (1996). Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protopor- phyrin IX. (74).
- Nowis, D., Makowski, M., Stoklosa, T., Legat, M., Issat, T., & Golab, J. (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, *2*(52), s. 339-352.
- Nowis, D., Stoklosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakobisiak, M., & Golab, J. (2005). The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*(2), s. 283-298.
- O'Connor, A., Gallagher, W., & Byrne, A. (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*(85), s. 1053-1074.
- Oleinick, N., Morris, R., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*(1), 1-21.

- Ouyang, G., Li, X., Liu, Z., Lam, B., Bui, B., Ma, L., Wen, Y. (2018). Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells. (21), 396-403.
- Pai, M., Habib, N., Şentürk, H., Lakhtakia, S., Reddy, N., Cicinnati, V., Brugge, W. (2015, Nisan 27). Endoscopic ultrasound guided radiofrequency ablation, for pancreatic cystic neoplasms and neuroendocrine tumors. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 4(7).
- Pandol, S. J. (2015, Haziran 13). Normal Pancreatic Function. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowledge Base, American Pancreatic Association*.
- Panzarini, E., Inguscio, V., & Dini, L. (2011). Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy. (2011).
- Patrick Maisonneuve, Albert B. Lowenfels. (2015). Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *International Journal of Epidemiology*, 186-198.
- Pecorino, L. (2005). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics. Oxford University Press*.
- Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnqvist HJ, Larsson J. (1993). Pancreatic cancer is associated with impaired glucose metabolism. *159*, 101-107.
- Pinheiro, S., Schenka, A., Neto, A., DeSouza, C., Rodriguez, H., & Ribeiro, M. (2009). Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. (24), s. 521-526.
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2008). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*(1), 1-15.
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*(24), 259–268.
- Płonka, J., Latocha, M., Kuśmierz, D., & Zielińska, A. (2015). Expression of Proapoptotic BAX and TP53 Genes and Antiapoptotic BCL-2 Gene in MCF-7 and T-47D Tumour Cell Cultures of the Mammary Gland After a Photodynamic Therapy with Photolon. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 1(24), s. 37-46.
- Regine, W., Winter, K., & Abraham, R. (2011, Mart 10). Fluorouracil-based Chemoradiation with Either Gemcitabine or Fluorouracil Chemotherapy after Resection of Pancreatic Adenocarcinoma: 5-Year Analysis of the U.S. Intergroup/RTOG 9704 Phase III Trial. *18*(5), 1319-1326.
- Reiners Jr, J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N., & Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *1*(6), 7-18.

- Robertson , C., Evans, D., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (96), 1-8.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. (4).
- Schouwink, H., Ruevekamp, M., Oppelaar, H., Van Veen, R., Baas, P., & Stewart, F. (2001). Photodynamic Therapy for Malignant Mesothelioma: Preclinical Studies for Optimization of Treatment Protocols. *Photochemistry and photobiology*, 4 (73), s. 410-417.
- Shliakhtsin, S., Trukhachova, T., & Isakau, H. (2009). Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon® (Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (6), s. 97-104.
- Sigusch, B., Pfitzner, A., Albrecht, V., & Glockmann, E. (2005). Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *Journal of Periodontology* (76), s. 1100-1105.
- Simplicio , F., Maionchi , F., & Hioka , N. (2002). Photodynamic Therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development. *Química Nova* (25), 801-807.
- Singh, D., Upadhyay, G., Srivastava, R., & Shankar, S. (2015). Recent Advances in Pancreatic Cancer: Biology, Treatment, and Prevention. *BBA Reviews on Cancer*.
- Spikes, J. D. (1985). The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences. *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, s. 209-227.
- Stott, B., & Korbelik, M. (2007). Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy,. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 5(56), s. 649-658.
- Straten, D., Mashayekhi, V., Bruijn , H., Oliveira, S., & Robinson, D. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, 9(19).
- Şeftalioğlu, A. (1998). *Genel & Özel İnsan Embriyolojisi*. (Üçüncü Baskı. b.). Ankara, Hacettepe.
- The American Cancer Society. (2018). *Key Statistics for Pancreatic Cancer*. [www.cancer.org: https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html](https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html) adresinden alındı
- The American Gastroenterological Association Clinical Practice and Practice Economics Committee. (1999, Aralık). AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis,

- and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 117(6), 1464-1484.
- The Patient Education Resource Center . (2012). *A Patient's Guide to Pancreatic Cancer*. Michigan, ABD: University of Michigan Comprehensive Cancer Center.
- Tong, R., & Kohane, D. (2012). Shedding light on nanomedicine. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4(6), s. 638-662.
- Trachtenberg, J., Weersink, R., Davidson, S., Haider, M., Bogaards, A., Gertner, M., Elhilali, M. (2008). Vascular-targeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses. *BJU International*, 5(102), s. 556-562.
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J., & Stewart, F. (2006). Photodynamic Therapy in Oncology. 2006, 11(9), 1034-1044. *The Oncologist*, 9(11), s. 1034-1044.
- Tseng, W., Saxton, R., Deganutti, A., & Liu, C. (2003, Ekim). [OBJ]Infrared Laser Activation of Indocyanine Green Inhibits Growth in Human Pancreatic Cancer. 27(3), 42-45.
- Urbach, F., Forbes, P., Davies, R., & Berger, D. (1976). Cutaneous Photobiology: Past, Present And Future. *The Journal of Investigative Dermatology*, 67, s. 209-224.
- Usuda , J., Kato, H., Okunaka, T., Furukawa , K., Yamada, K., & Tsutsui, H. (2006). Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *Journal of Thoracic Oncology*(1), 489–493.
- Vree, W., Essers, M., 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*, 13(56), s. 2908-2911.
- Wagnieres, G., Star, W., & Wilson, B. (1998). In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photobiology*(68), 603-632.
- Walport, M. (2001). Advances in immunology: complement (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*, 14(344), s. 1058-1066.
- Wentworth, S. (2005). Neonatal phototherapy – today's lights, lamps and devices. *Phototherapy Devices*, 1(1).
- Wilson, B. (2002). Photodynamic therapy for cancer: Principles. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 6(16).
- Withers, H., & Peters, L. (1988). *Innovation in Radiation Oncology*. Amerika: Springer-Verlag.
- Woodhams, J., Macrobert, A., & Bown, S. (2007). The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 6(12), s. 1246-1256.

- Wörmann, S., & Algül, H. (2013, kasım 18). Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*.
- Yang, L., Wei, Y., Xing, D., & Chen, Q. (2010). Increasing the efficiency of photodynamic therapy by improved light delivery and oxygen supply using an anticoagulant in a solid tumor model. *Lasers in surgery and medicine*, 7(42), s. 671-679.
- Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., & Ogura, S. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*(12), 46-47. Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Leonardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. (28).
- Yuan, C., Morales-Oyarvide, V., Babic, A., Clish, C. B., Kraft, P., Bao, Y., Cochrane, B. (2017, Haziran 1). Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Survival. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 35(16).
- Zanolli, M. (2013, Ağustos). Phototherapy treatment of psoriasis today. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2).
- Zhang, J., Jiang, C., Figueiro Longo, J., Azevedo, R., Zhang, H., & Muehlmann, L. (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(8), s. 137-146.
- Zhao, B., & He, Y. (2010). Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*(10), 1797–1809.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Saadet Akbulut
Doğum Yeri	Beyoğlu
Doğum Tarihi	11.07.1989
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05456919394
E-Posta Adresi	akbulut_saadet@hotmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Sakarya Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	27.05.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	Fatih Üniversitesi
Enstitü Adı	Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Programı	Biyomedikal Mühendisliği Programı

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

Makale ve Bildiriler	
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., Akbulut S. ve diğerleri, 2016, <i>Biyomedikal Optik ve Lazerler</i> , Biyomedikal Mühendisliğinin Temelleri, Asyalı M. H. (ed), Nobel Akademik Yayıncılık.	
Akbulut S., Kiriş 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	
Akbulut S., 2014, Primer Meme Kanserinde Fotodinamik Terapi ve Kemoterapinin Etkisi, <i>Proceeding of 19. Ulusal Cerrahi Kongresi</i> .	

- Akbulut S., Kiriş T. ve diğerleri, 2014, Primer Meme Kanseri Hücresinde Kemoteröpatik İlaç-Doz Değişimlerinin Hücre Canlılığına Etkisi, *Proceeding 19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.
- Akbulut S. ve diğerleri 2014, ICG Tabanlı FDT'nin in vivo Etkisinin Araştırılması, *Proceeding of Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi'14*.
- Akbulut S., 2014, *In vitro investigation of FOSCAN mediated photodynamic therapy on primer breast cancer cell line*, Thesis (MSc.), Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü, Fatih University.
- Karatepe O., Akbulut S. ve diğerleri, 2013, Çift Toplayıcı Küre Sistemi ile Tümörlü ve Sağlıklı Pankreas Dokusunun Optik Özelliklerinin Karaktersizasyonu: Prospektif Klinik Çalışmanın Erken Dönem Sonuçları, Volume:1, *Proceeding of 11. Ulusal Hepatopankreatobiliyer Cerrahi Kongresi*.
- Akbulut S., Kiriş T. ve diğerleri 2013, Meme Kanseri Oluşturulmuş Nude Farelerde Fotodinamik Tedavinin Etkinliğinin Fourier Transform Infrared Spektroskopi ile Araştırılması, *Proceeding of 13. Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi*.
- Akbulut S., 2011, Sapanca Gölü'nün Toplam Koliform ve Fekal Koliform Bakteri Yönünden İncelenmesi, Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi