

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENMİŞ IŞIĞA DUYARLI
MADDELER (FOTOSENSİTAYZIRLAR)
KULLANARAK UYGULANAN FOTODİNAMİK
TERAPİNİN SERVİKS EPİTELYAL
KARSİNOMA VE MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Sinem TUNÇER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2007

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENMİŞ IŞIĞA DUYARLI
MADDELER (FOTOSENSİTAYZIRLAR)
KULLANARAK UYGULANAN FOTODİNAMİK
TERAPİNİN SERVİKS EPİTELYAL
KARSİNOMA VE MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Sinem TUNÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN

GEBZE

2007

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Yeni Sentezlenmiş Işığa Duyarlı Maddeler (Fotosensitayzırlar) Kullanarak Uygulanan Fotodinamik Terapinin Serviks Epitelyal Karsinoma ve Mezotelyoma Hücrelerine Etkisi

YAZAR ADI : Sinem TUNÇER

Fotodinamik terapi (Photodynamic Therapy-PDT), seçici olarak hedef dokuda biriken ışığa duyarlı maddenin (Photosensitizer-PS), PS'nin emilim spektrumu ile uyuşan, uygun dalga boyundaki görünür ışığa maruz bırakılması prensibine dayanır. Moleküler oksijen varlığında, PS'nin ışık ile aktive olması sonucunda oluşan serbest radikaller ve singlet oksijen, lipid, protein ve nükleik asitler gibi bir çok biyolojik moleküle etkileşerek, kanser hücrelerini tahrip eder.

PDT'de kullanılan ilk PS'ler, hematoporfirin türevleri (Hematoporphyrin Derivative-HPD)'rinin bazı dezavantajları, aralarında fitalosiyanın (Phthalocyanine-Pc)'lerin de bulunduğu ikinci nesil PS'lerin sentezlenmesine neden olmuştur. Fotokimyasal ve fotofiziksel özellikleri nedeni ile Pc'ler, PDT'de kullanılma potansiyeli olan moleküllerdir.

Tez çalışmasında, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde sentezlenen beş farklı Pc molekülünün (PcA, PcB, PcC, PcD ve PcE) kullanıldığı PDT'nin, serviks epitelyal karsinoma hücreleri (HeLa hücreleri) ve mezotelyoma hücreleri (SPC111, SPC212 hücreleri) üzerindeki fototoksik etkisi incelenmiştir. Farklı ışık enerjilerinin ve farklı Pc konsantrasyonlarının kullanıldığı PDT uygulamaları ardından yapılan hücre canlılığı deneyleri sonucunda, kullanılan Pc'lerin karanlıkta sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. PcA, PcB ve PcC'nin kullanıldığı PDT uygulamaları sonucunda HeLa hücrelerinin % 90'ının canlılığını kaybettiği tespit edilmiş iken, PcD ve PcE'nin fototoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Mezotelyoma hücreleri üzerindeki hücre canlılığı analizleri sonucunda ise, SPC212 hücrelerinin PDT'ye duyarlılığının HeLa hücrelerinden az, SPC111 hücrelerinden ise fazla olduğunu ortaya çıkmıştır.

PDT ardından apoptozis tayininde ise flow sitometri kullanılmıştır. Hücre içi aktif kaspazın tespitinin amaçlandığı yöntemde, yüksek fotodinamik aktivite gösterdiği tespit edilen PcB'nin kullanıldığı PDT'nin, HeLa hücrelerinde apoptozisi tetiklediği görülmüştür.

SUMMARY

THESIS TITLE : Photodynamic Therapy Efficiency of Novel Photosensitizers on Cervix Epithelial Carcinoma and Mesothelioma Cells

AUTHOR NAME : Sinem TUNÇER

Photodynamic therapy (PDT) based on the activation of photosensitizer (Pc), that have been localized in target tissues. For PDT, a combination of a photosensitizing drug and light in the presence of molecular oxygen generate free radicals and singlet oxygen which react with biologic molecules such as lipids, proteins and nucleic acids and cause tissue destruction.

The first Pcs for PDT were hematoporphyrin derivatives (HPDs). Some disadvantages of HPD photosensitizers caused to synthesis of second generation PSs such as phthalocyanines (Pcs). Due to their photochemical and photophysical properties, Pcs are useful molecules for PDT applications.

In this study, phototoxic effects of five different novel Pc molecules (PcA, PcB, PcC, PcD, PcE) on cervix epithelial carcinoma cells (HeLa cells) and mesothelioma cells (SPC111, SPC212 cells) were investigated. The Pcs were synthesized in Chemistry Department of Gebze Institute of Technology. Cell viability studies demonstrated that the Pcs are not cytotoxic in dark. Furthermore, PDT applications which were carried using different concentrations of Pcs and different energies of light showed that PcD and PcE do not display phototoxic ability while PcA, PcB and PcC can kill even 90 % of the HeLa cell population. In addition, experiments shown that SPC111 mesothelioma cell lines are more resistant to PDT applications from SPC212 cells. Between the cell lines used in this study, HeLa cells were found more sensitive to destruction by PDT.

For apoptosis detection studies, PcB was used as photosensitizing agent depending on its excellent photodynamic activity which were arised in *in vitro* cell viability studies. Flow cytometry was used in detection of intracellular caspases which are indicators of apoptosis. The analysis shown that apoptosis is a death mode for HeLa cells, which have been incubated with PcB and irradiated.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sũresince bilgi ve gũrũőleriyle beni yũnlemdiren, desteğini esirgemeyen GYTE Biyoloji Bũlũmũ Őęretim Ŭyesi Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN'a,

Fotodinamik terapi uygulamalarında kullandığım bileşikleri sentezleyen ve karakterize eden Gebze Yũksek Teknoloji Enstitũsũ, İnorganik Kimya Bũlũmũ grubuna, Prof. Dr. Vefa AHSEN'e, özellikle de sonuçların değerlendirilmesinde bilgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Devrim ATILLA, Yrd. Doç. Dr. Mahmut DURMUŞ, Yrd. Doç. Dr. Hatice CAN ile Prof. Dr. Ayőe Gũl GũREK'e,

Çalıőmamda yararlandığım flow sitometri cihazının kullanımında bana yardımcı olan Dr. Gũlderen D. YANIKKAYA'ya ve İstanbul CENTRO çalıőanlarına,

Çalıőmalarım sırasında dostluk ve dayanıőmalarını esirgemeyen çalışma arkadaőlarıma ve desteklelerinden dolayı sevgili anneciğime ve babacığıma teőekkũrlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	İV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	3
1.1.1. Kanser Oluşum Süreci	4
1.1.2. Kanser Oluşumda Etkili Gen Grupları	7
1.1.2.1. Onkogenler	8
1.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler	8
1.2. Hücre Döngüsü ve Kontrolü	9
1.2.1. Hücre Döngüsü Fazları	10
1.2.2. Hücre Döngüsünde Kontrol Noktaları	11
1.2.2.1. G1 Kontrol Noktası	13
1.2.2.2. G2 Kontrol Noktası	15
1.2.2.3. Mitoz Fazı Kontrolü	16
1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser	16
1.3. Apoptozis	18
1.3.1. Apoptozisin Düzenlenmesi	22
1.3.1.1. Apoptozisi Tetikleyen Ölüm Faktörleri ve Reseptörleri	24
1.3.1.2. Kaspazların Aktivasyonu	26
1.3.1.3. Bcl-2 Protein Ailesi	27
1.3.1.4. p53 Tümör Baskılayıcısı	30
1.3.2. Kanser ve Apoptozis İlişkisi	30
1.3.3. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler	31

1.3.3.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	31
1.3.3.2. Histokimyasal Yöntemler	32
1.3.3.3. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	32
1.3.3.4. Flow Sitometri	33
1.4. Fotodinamik Terapi	37
1.4.1. Fotodinamik Terapide Fotokimyasal Olaylar	39
1.4.2. Fotodinamik Terapide Işık	41
1.4.2.1. Dalga Boyu	42
1.4.2.2. Işık Kaynakları	44
1.4.3. Fotosensitayzır	45
1.4.3.1. Birinci Nesil Fotosensitayzırlar	45
1.4.3.2. Ftalosiyeninler	46
1.4.4. Fotodinamik Terapide Oksijen	47
1.4.5. Fotodinamik Terapinin Tümör Seçiciliği	48
1.4.5.1. Fotosensitayzırın Tümör Hücrelerine Alımı ve Hücre İçi Lokalizasyonu	49
1.4.5.2. Taşıyıcı Sistemler	50
1.4.5.3. Işık	51
1.5. Fotodinamik Terapi ve Hücre Ölümü	52
1.5.1. Fotodinamik Terapide Nekrozis Yolu ile Hücre Ölümü	53
1.5.2. Fotodinamik Terapide Apoptozis	54
1.5.2.1. Mitokondri Aracılığı ile Apoptozis	54
1.5.2.2. Fotodinamik Terapi ve Endoplazmik Retikulum Hasarı	56
1.5.2.3. Fotodinamik Terapi ve Lizozom Hasarı	56
1.5.2.4. Fotodinamik Terapi ve Hücre Ölüm Reseptörleri Aracılığı ile Apoptozis	57
1.6. Servikal Adenokarsinoma ve Mezotelyoma	58
1.6.1. Servikal Adenokarsinomada Karsinogenez Nedenleri ve Tedavi Yöntemleri	58
1.6.1.1. İnsan Papilloma Virüs	60
1.6.1.2. Servikal Karsinogenezde Diğer Etkenler ve Genetik Değişimler	64
1.6.1.3. Servikal Kanser Tedavisi	65
1.6.2. Malignant Plevral Mezotelyomada Karsinogenez Nedenleri ve	

Tedavi Yöntemleri	66
1.6.2.1. Malignant Plevral Mezotelyoma Karsinogenezinde Etkili Genetik Değişimler	68
1.6.2.2. Malignant Plevral Mezotelyomada Tedavi	70
1.7. Konu ile İlgili Çalışmalar	71
1.7.1. HeLa Hücre Serisinde <i>in vitro</i> Fotodinamik Terapi Uygulamaları	71
1.7.2. Malignant Plevral Mezotelyomada <i>in vivo</i> PDT Uygulamaları	73
2. MATERYAL ve YÖNTEM	76
2.1. Materyal	76
2.1.1. Kimyasal Maddeler	76
2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	76
2.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	77
2.2. Yöntem	78
2.2.1. Hücre Kültürleri	79
2.2.1.1. Alt Kültürleme	80
2.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	81
2.2.1.3. Hücre Sayımı	81
2.2.1.3. Hücre Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi	82
2.2.2. <i>İn vitro</i> Fotodinamik Terapi Uygulamaları	82
2.2.2.1. Ftalosiyanın ile İnkübasyon	83
2.2.2.3. Işık ile Muamele	85
2.2.3. Fotodinamik Terapi Ardından Hücre Canlılığının Belirlenmesi	87
2.2.3. Ftalosiyanınların Hücre İçine Alınma Potansiyellerinin Belirlenmesi	88
2.2.4. Fotodinamik Terapi Ardından Apoptozis Tayini	88
3. BULGULAR	90
3.1. Hücre Büyüme Eğrileri	90
3.2. Fotodinamik Terapinin Hücre Canlılığına Etkisi	91
3.2.1. PcD ve PcE'nin Fototoksik Etkileri	93
3.2.2. PcA'nın Fototoksik Etkisi	95
3.2.3. PcB'nin Fototoksik Etkisi	98
3.2.4. PcC'nin Fototoksik Etkisi	104
3.3. Ftalosiyanın Bileşiklerinin Hücre İçine Alınma Potansiyelleri	109

3.4. Fotodinamik Terapi Ardından Apotozis Tayini	110
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	114
5. KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	126

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APC: Anafaza İlerletici Faktör

Bkz.: Bakınız

Ca⁺²: Kalsiyum

CO₂: Karbondioksit

CDI: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

cm: Santimetre

cm²: Santimetre kare

cyt_c: sitokrom_c

dH₂O: Distile su

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

E.R.: Endoplazmik Retikulum

FL: Floresan

FasL: Fas Ligand

g: Gram

HPD: Hematoporfirin Türevi

HPV: İnsan Papilloma Virüs

J: Joule

LDL: Düşük yoğunluklu Yağ

LD: Öldürücü Doz

ml: Mili litre

MM: Malign Mezotelyoma

MPM: Malign Plevral Mezotelyoma

mW: Mili Watt

Mab: Monoklonal antikor

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium

nm: Nanometre

O₂: Oksijen

¹O₂: Singlet oksijen

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

Pc: Fitalosiyanin

PDT: Fotodinamik Terapi

PF: Fotofrin

PS: Işığa Duyarlı Madde

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SV40: Simian Virüs 40.

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TNFR: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü

v/v: Hacim/hacim

W: Watt

λ : Dalga boyu

μ l: Mikro litre

μ M: Mikro Molar

<: Küçüktür

>: Büyüktür

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Tümör oluşumunda aşamalar	5
1.2: Hücre döngüsü fazları	11
1.3: Siklin-bağımlı protein kinaz sistemi	12
1.4: Rb ve G1 fazı kontrolü	14
1.5: p53 ve G1 kontrol noktası	15
1.6: Nekrozis ve apoptozis ile ölmüş hücrelerin elektron mikroskopunda görünümü	19
1.7: Apoptotizide morfolojik değişim süreci	19
1.8: Apoptotik süreç	22
1.9: <i>C.elegans</i> ve insanda apoptozis kontrolü	24
1.10: Ölüm reseptörleri ile apoptozisin düzenlenmesi	26
1.11: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri	28
1.12: Mitokondriyal yol ile apoptozis aktivasyonu	29
1.13: Flow sitometri	34
1.14: Flow sitometride ışığın saçılımı	35
1.15: Flow sitometride floresan saçılımı	36
1.16: Flow sitometri verilerinin gösterim biçimleri	36
1.17: Işık ile tedavi uygulamaları	37
1.18: 1900'den günümüze PDT'nin tarihi	38
1.19: PDT'de meydana gelen olayların şematik gösterimi	41
1.20: PDT'de Tip I ve Tip II reaksiyonları	41
1.21: PDT'de kullanılan bazı PS'lerin absorpsiyon spektrumları	42
1.22: Işık dokuya nüfuz etme derinliğinin dalga boyu ile ilişkisi	43
1.23: Fitalosiyanın molekülü	47
1.24: PDT tarafından tetiklenen hücre ölümü için öngörülen model	53
1.25: PDT tarafından tetiklendiği öngörülen apoptozis mekanizması	56
1.26: Hücre yüzey ölüm reseptörleri, mitokondri, lizozomlar ve ER, kaspazlar ve Bcl-2 ailesi proteinlerini içeren PDT'ye bağlı apoptotik yolak	58
1.27: İnsan papilloma virüs genomu	61
1.28: İnsan papilloma virüs enfeksiyonu	62

1.29: İnsan papilloma virüsünün patogenezi	64
1.30: Plevral mezotelyoma	67
2.1: Çalışmada kullanılan Pc bileşiklerinin kimyasal yapısı	84
2.2: LumaCare Model LC-122	86
3.1: HeLa büyüme eğrisi	90
3.2: SPC111 büyüme eğrisi	90
3.3: SPC212 büyüme eğrisi	91
3.4: HeLa hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi	92
3.5: SPC111 hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi	92
3.6 : SPC212 hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi	93
3.7: PcD kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi	94
3.8: PcE kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi	95
3.9: PcA kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi	97
3.10: Artan PcA konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi	98
3.11: PcB kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi	99
3.12: Artan PcB konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi	101
3.13: PcB'nin SPC111 hücrelerinde fototoksik etkisi	102
3.14: PcB'nin SPC212 hücrelerinde fototoksik etkisi	103
3.15: Artan PcB konsantrasyonlarına ve 2.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış SPC111 hücrelerine ait sağ kalım eğrisi	103
3.16: Artan PcB konsantrasyonlarına ve 2.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış SPC212 hücrelerine ait sağ kalım eğrisi	104
3.17: PcC kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi	105
3.18: Artan PcC konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi	108
3.19: Pc'lerin HeLa hücrelerine alınma potansiyalleri	109
3.20: PDT ardından hücre içi aktif kaspazın flow sitometride analizi	111
3.21: PDT uygulaması ardından HeLa hücreleri	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1: Bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genler	9
1.2: Apoptozis ve nekrozisin karşılaştırılması	20
1.3: Apoptozisi tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar	22
1.4: Kabul görmüş PS'ler ve onkolojide kullanım alanları	39
1.5: İnsan papilloma virüslerinin servikal kanserdeki risk derecelerine göre sınıflandırılması	60
2.1: Pç moleküllerinin çözügen maddeleri ve en yüksek absorpsiyonu verdikleri dalga boyları	83
2.2: PDT uygulamalarında kullanılan güç yoğunlukları	87

1. GİRİŞ

Yunanca'da yeni büyüme anlamına gelen neoplazi (neoplasia), bir doku ya da organdaki anormal ve kontrolsüz hücre çoğalmasını ifade eder. Neoplazi sonucunda tümör olarak da adlandırılan neoplazm ortaya çıkar. Tümörleri üç ana grupta incelemek mümkündür. Herhangibir dokuda ortaya çıkıp bölgesel olarak büyüyen, basınç ya da tıkama yoluyla tahribata neden olan, buldukları bölgeden başka bir bölgeye sıçramayan tümörler, benign tümörlerdir. Genellikle epitelde ortaya çıkan, mezenşim tabakasına yayılma göstermeyen, sıklıkla küçük tümörler *in situ* tümörler olarak adlandırılır. Kanserler ise mezenşimi istila eden (local invasion) ve burada hasar meydana getiren, gelişimini tamamlamış (habis-malign) tümörlerdir [1]. Malign tümörleri oluşturan hücreler, salgıladıkları kollajen dokuyu parçalayıcı özelliği bulunan matriks metalloproteinazları sayesinde hücre dışı matriksi yıkarak, kan ya da lenf yoluyla başka organlara taşınabilirler. Tümör hücrelerinin başka organlarda ikincil tümörler oluşturması metastaz olarak adlandırılır [2].

Her yaşta ortaya çıkabilecek olan, ancak riskin yaşla birlikte arttığı kanser [3], Dünya'da ve Türkiye'de kalp krizi, kalp yetmezliği, hipertansiyon gibi kalp ve damar hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Dünya'da her yıl 11 milyon, Türkiye'de 150 bin kişinin yüzleştiği [4] kanserin tedavisinde cerrahi yöntemler, ilaç tedavisi (kemoterapi) ve radyasyon tedavisi uzun yıllardır kullanılan yöntemlerdir. Kanser tedavisinde istenen, tedavinin sağlıklı dokuda tahribat oluşturmamasıdır. Bazen cerrahi yöntemlerle bunu başarmak mümkün olsa da kanserin komşu dokulara ve hatta vücudun uzak bölgelerine metastazı, tedavinin başarısını düşürür. Bazen de tümör derinde olduğundan cerrahi operasyon bir travma ile sonuçlanabilir [5]. Kemoterapide ise doğrudan DNA'da hasar oluşturan ya da hücre döngüsünü durdurarak mitozu önleyen ilaçların, sağlıklı dokularda da toksik etki oluşturması söz konusudur. Bölünen hücrelerin radyasyona hassas olması prensibine dayanan radyasyon tedavisi de kemoterapiye benzer şekilde sağlıklı dokularda da tahribata neden olur [6]. Bununla birlikte kemoterapi ve radyasyon tedavisi, bağışıklık sistemi hücrelerini tahrip eder ve kanser metastazına karşı bir savunma duvarı görevi üstlenen bağ dokuda hasara neden olduklarından, yeni tümörlerin ortaya çıkmasını da tetikleyebilirler [2].

Geleneksel tedavi yöntemlerinin bahsedilen dezavantajları, yeni kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur [12]. Bu tedavi yöntemlerinden biri olan fotodinamik terapi (Photodynamic Therapy-PDT), cerrahi, kemoterapi ya da radyasyon tedavisi ile birlikte veya bu tedavilerle uzlaşma gerektirmeksizin tek başına uygulanabilir [8]. PDT’de prensip, tek başına toksik etki göstermeyen fotosensitayzır (photosensitizer-PS) denen ışığa duyarlı maddenin görünür ışığa maruz bırakılmasıyla oluşan serbest radikaller ve singlet oksijenin (1O_2), yağ, protein ve nükleik asitler gibi birçok biyolojik molekülle etkileşip apoptozis ya da nekrozis yoluyla kanser hücrelerinde ölüme neden olmasıdır [9]. Kullanılan ışığa duyarlı maddenin toksisite oluşturmada seçici olarak tümör dokusunda birikmesi, ışığın sadece tümör bölgesine uygulanması ile normal doku hasarının engellenmesi, istenilen sonuç elde edilene kadar tekrarlanabilir olması ve ucuz maliyeti, PDT’ye geleneksel onkoterapi yöntemlerine göreceli bir avantaj sağlamaktadır [10, 11, 12].

PDT’de kullanılan ilk ışığa duyarlı maddeler hematoporfirin türevleridir. Kanser tedavisinde onaylanan ilk PS ise, Hematoporfirin türevi (Hematoporphyrin Derivative-HPD)’nden kısmen saflaştırılarak elde edilmiş olan fotofrin (Photofrin[®]-PF)’dir. PF, porfirin karışımı olduğundan kimyasal anlamda kısmen karakterize edilebilmektedir, aktif bileşenlerinin belirlenmesi ve aynı özellikteki tekrarlarının sentezlenmesi güçtür. PF’in ışık emiliminin zayıf olması, seçici olarak tümörde konsantre olma eğilimlerinin düşük olması, 4-6 hafta süreyle vücuttan uzaklaşmaması nedeni ile bu zaman içinde fototoksik etki oluşturması, ftalosiyanın (Phthalocyanine-Pc)’lerin de aralarında bulunduğu ikinci nesil PS’lerin sentezlenmesine neden olmuştur [8]. Kimyasal kararlılıkları, yüksek fotodinamik aktiviteleri ve uygun ışık emilim bölgeleri sayesinde hücreye etkili şekilde nüfuz etme özellikleri bulunan Pc’ler, PDT’de kullanılmaya oldukça elverişli bileşiklerdir [13, 14].

Tez çalışmasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü’nde sentezlenen yeni Pc bileşiklerinin PDT etkinliklerinin *in vitro*’da tespiti hedeflenmiştir. Bu amaçla serviks ve mezotelyoma kanser hücrelerinde PDT’nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi *in vitro* olarak incelenmiş, kullanılan PS’lerin hücre içine alınma potansiyelleri belirlenmiş ve PDT ardından gerçekleşen hücre ölüm modeli tanımlanmaya çalışılmıştır.

1.1. Kanser

Yunanca olan *carcinus* kelimesini Latince'ye yengeç anlamına gelen *cancer* olarak çeviren Celsus'dur. Bugünkü onkoloji kelimesinin kökeni olan *oncos* kelimesi ise ilk kez Galen tarafından, bütün tümörleri ifade edecek şekilde kullanılmıştır. Hipokrat (M.Ö. 460-370) ise benign tümörler için Yunanca şişme anlamına gelen *oncos* kelimesini, malign tümörler için de şekilde yengece benzeyen katı tümör dokusundan esinlenerek Yunanca yengeç anlamına gelen *carcinus* kelimesini kullanmıştır [15]. Sonraları Hipokrat, *carcinus* kelimesine şişme anlamına gelen *-oma* son ekini eklemiştir [16]. Günümüzde epitelyal hücrelerden köken alan malign tümörleri ifade etmek için karsinoma terimi kullanılırken, bağ dokuda ortaya çıkan kanserler sarkoma, hemopoetik hücrelerden köken alan kanserler lösemi, lenfoid dokuda ortaya çıkan kanserler ise lenfoma olarak adlandırılmaktadır [17].

Kanserin nedenleri üzerine sorulan sorular pek çok teorinin ortaya atılmasına neden olmuştur. 1838 yılında Alman patalog Johannes Müller, kanserin hücrelerden oluştuğunu ancak kanser hücrelerinin normal hücrelerden köken almadığını, normal dokulardan tomurcuklanan hücrelerden (blastema) oluştuğunu belirtmiştir. Müller'in öğrencisi Rudolph Virchow (1821-1902) ise kanser hücreleri de dahil tüm hücrelerin diğer hücrelerden tüvelendiğini öne sürmüştür. Müller ve Virchow'dan sonra çalışmalar, normal bir hücreyi kanser hücresi yapan değişimler üzerine odaklanmıştır. 1914 yılında Boveri kanserin, normal hücresel işlevler için gerekli olan kromozomal dengenin bozulmasıyla ortaya çıkabileceğini belirtmiştir [14, 15, 16]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise kanserin ortaya çıkması için molekül düzeyinde ya da mikroskopik olarak kromozom düzeyinde gözlenebilen genetik sapmaların gerektiği anlaşılmıştır [18]. Somatik mutasyon teorisine göre kanser, mutasyona uğramış tek bir hücreden köken alır. Bu hücre, mutasyonların sağladığı avantajlar ile hücre döngüsü kontrollerinden kaçarak sürekli olarak bölünebilir ve bu süreç içinde kendine benzeyen bir klon oluşturur. Genetik olarak homojen olan klonda, klonun büyüme potansiyelini daha da arttıran yeni mutasyonlar oluşur. Mutasyonlar, tümör içinde birbirinden farklı olan alt klonlar meydana getirir. DNA molekülü ile etkileşime giren karsinojenler

(kimyasal karsinogenler, iyonize radyasyon ve viral ajanlar)'e maruz kalınması, mutasyon oluşumunu ve neoplazi insidansını arttırır [19, 20].

Somatik mutasyon teorisi çoğu kanser türünün sıklığındaki artışın yaşla olan ilişkisini de açıklamaktadır. Somatik mutasyon taşıyan hücreler zamana bağlı olarak birikmekte ve bu hücrelerden ortaya çıkan klonlar zaman içinde klinik bir tablo oluşturmaktadır [19].

1.1.1. Kanser Oluşum Süreci

Aşırı büyüme, bulunduğu dokuyu istila etme ve metastaz oluşturma yetenekleriyle karakterize edilen malign bir neoplazmın oluşum süreci karsinogenez olarak adlandırılır. Karsinogenez, başlangıç (initiation), yükselme (tumor promotion) ve ilerleme (progression) olmak üzere üç aşamada incelenebilir [1].

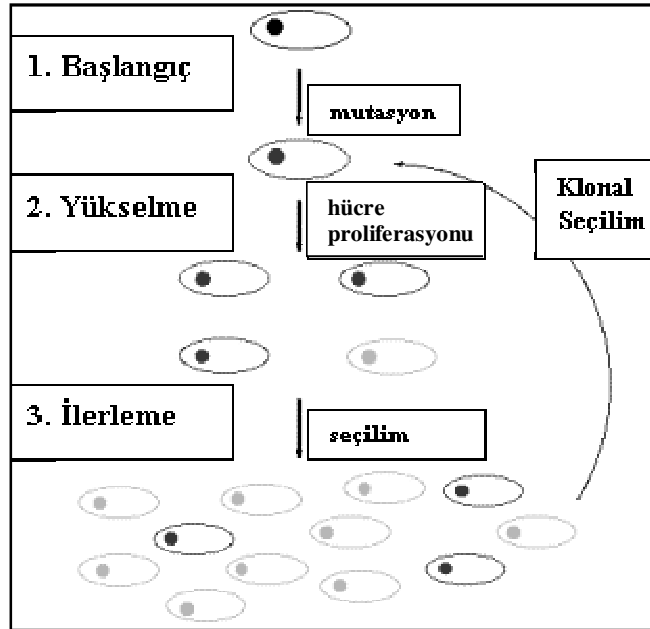
Tümör gelişiminin başlangıç aşamasında hücre, genotoksik bir ajana maruz kalır. Kimyasal karsinogenler, virüsler, radyasyon, UV ışığı gibi başlatıcı ajanlar ya da replikasyon hataları sonunda DNA'da ölümcül olmayan bir mutasyon oluşur ve tamir edilmeyen hasar, DNA'nın tekrarlanan sentezleri ile kalıcı hale gelir. Kanser gelişiminin başlangıç aşamasındaki bir hücrede DNA düzeyinde artış olurken, hücrenin fenotipinde bir değişiklik söz konusu değildir [18].

Karsinogene maruz kalınmasıyla tek bir hücrede mutasyon oluşumu, kanserin hemen ortaya çıkacağı anlamına gelmez. Mutasyona uğramış hücre bağışıklık sistemi tarafından yok edilebilir ya da hücre programlı hücre ölümüne (apoptozis) uğrayabilir. Kanser ortaya çıkabilmesi için, karsinogen tarafından tetiklenen başlangıç aşamasını takiben bir seri değişimin olması gereklidir.

Tümörün yükselme aşaması, bir karsinogen ya da tek başına tümör oluşturamayacak olan başka bir yükseltici ajan (cinsiyet hormonları, büyüme hormonları, büyüme faktörleri gibi)

tarafından tetiklenebilir. Yükseltici ajan, başlangıç evresine bulunan hücreyi büyüme ve bölünmeye teşvik eder. Bu aşamada büyümeyi inhibe edici ve büyümeyi teşvik edici faktörler arasındaki denge önem kazanır [18, 5].

İlerleme aşamasında ise, büyümede etkili genleri de içine alacak şekilde bir dizi mutasyon geçiren hücre klonlar oluşturur. Bu basamak kanserin ilerleme aşamasıdır. Bu aşamada, bulunduğu dokuyu istila etme ve metastaz yapma yeteneğinin ortaya çıkmasıyla karakterize fenotipik değişiklikler ortaya çıkar [1].



Şekil 1.1: Tümör oluşumunda aşamalar [21].

Karsinogenez süreci içinde, normal bir hücrenin tümörojenik bir hücre haline gelmesi için ölümsüzleşme (immortalization), transformasyon ve metastaz olmak üzere üç tip değişim geçirmesi gerekir. Ölümsüzleşme, belirsiz büyüme ve bölünmeyi ifade eder. İmmortal bir hücrenin fenotipik olarak da değişiklik göstermesi şart değildir. İkinci değişim ise ölümsüz hücrenin transformasyonudur. Metastaz aşamasında ise kanser hücreleri normal dokuya sızar ve orada yeni bir koloni meydana getirirler [22].

Tümör hücrelerinde kaybedilmiş büyüme ve bölünme kontrolüne neden olan değişimlerin belirlenmesi için, normal ve transforme hücrelerin büyüme karakteristiklerinin *in vitro*'da

karşılaştırılması gerekir. Hayvan tümörleri için model teşkil eden *in vitro* çalışmalar, transforme hücre hatlarının normal hücrelerle karşılaştırılması, tümör oluşumunun genetik temellerinin belirlenmesi ve dönüşümdeki fenotipik süreçlerin anlaşılması açısından önem taşır [22].

Omurgalı bir organizmadan alınan ve kültür ortamına konan hücreler, telomer kısalmasına bağlı olarak birkaç bölünmeden sonra bölünmeyi sürdürmez. Bu durumu takip eden krizde hücrelerin büyük kısmı ölürken, bölünme kabiliyeti yüksek olan hücreler yaşar. Krizi aşabilen hücreler tümorojenik olmayan, ölümsüz hücrelerdir ve bir hücre hattı meydana getirirler [23].

Ölümsüz hücrelerden oluşmuş bir hücre hattına ait hücreler, primer kültür hücreleri ile bazı ortak özellikler gösterir: 1) Yüzeye tutunarak büyürler, 2) Büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar, 3) Kontakt inhibisyondan dolayı belli bir hücresel yoğunluğa ulaştıklarında büyümeleri durur, 4) Morfolojik anlamda büyüdükleri yüzey üzerinde uzamış halde görülürler ve aktin filamentlerinden oluşan stress fiberlerine sahiptirler. Bu özelliklerin sonucu olarak ölümsüz hücreler, buldukları yüzeyde monolayer (bir hücre kalınlığında tabaka) halinde büyürler.

In vivo'daki kontrolüne benzerlik gösterse de tümorojenik olmayan ölümsüz hücrelerden kurulmuş hücre hattının, neredeyse her zaman kromozomal anomaliler taşıdığı, çoğunlukla da anöploidi taşıdığı görülmüştür.

Transforme hücreler ise tümorojenik olmayan, ölümsüz hücrelerle ve normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında bazı farklılıklar gösterirler:

- 1) Transforme hücrelerin seruma ihtiyaçları azdır, çünkü büyüme faktörlerini kendileri sentezlerler ve kendi kendilerine büyüme ve bölünme sinyali verebilirler.
- 2) Transforme hücreler kontakt inhibisyon özelliğini kaybetmişlerdir. Normal hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında hücre zarı üzerinde bulunan reseptörler DNA'ya büyümeyi durdurması yönünde sinyal verir. Kontakt inhibisyonu denen bu mekanizma ile dokunun kontrolsüz olarak büyümesi engellenmiş olur. Kontakt inhibisyon özelliğini kaybetmiş transforme hücreler kültür ortamında monolayer değil de, fokus denen, üst üste

hücrelerden oluşan çoklu hücre tabakaları şeklinde büyürler. *In vivo*'da kontakt inhibisyonun kaybedilmiş olması ise, transforme hücelere ortaya çıktıkları dokuyu istila etme kabiliyetini kazandırır.

3) Transforme hüceler katı bir yüzeye tutunmadan büyüeyebilirler. Kan hüceleri hariç pek çok vücut hücresi büyüek ve farklılaşmak için hücre dışı matrikse tutunma ihtiyacı duyarken, kanser hüceleri böyle bir gereksinim içinde olmadıklarından kültür ortamında yayılarak büyüek yerine yuvarlak bir hal alırlar.

4) Ölümsüz hücelerin aksine, transforme hüceler deney hayvanına enjekte edildiğinde tümör meydana getirir [22, 23, 24, 25].

Normal bir hücrenin transforme olması için çoklu genetik değışiklikler gereklidir.

İnsanda kanser sıklığı ve yaş parametrelerine dayanarak yapılan çalışmalar, 6-7 genetik değışimin 20-40 yıl içinde kanser oluşturabileceğini düşündürmektedir. Kanser nadir olarak, ek başka genetik değışimlerin oluşmasını gerektirebildiği gibi Mendelien kalıtım kurallarına göre de kalıtılabilir [18]

1.1.2. Kanser Oluşumda Etkili Gen Grupları

Normal hücreden neoplastik hücreye transforme olma süreçlerinin analiz edilmesi sonucunda, bu süreçte genetik etki mekanizması bakımından iki farklı gen grubunun rol aldığı görülmüştür: proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler [26]. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değışimlerin dışında, DNA onarım mekanizmasından sorumlu enzimleri kodlayan, apoptozisi düzenleyen, proteinazlar gibi dokuya hasar veren enzimleri ve damarsal geçirgenlik faktörlerini kodlayan genlerdeki hasarların da karsinogeneizde önemli olduğu bilinmektedir. Tümör hücelerinde, DNA metilasyonunda artış gibi bazı epigenetik durumlar ile allel ekspresyonlarının metilasyon değışimleri ile kontrolü de yaygın olarak görülmektedir [18].

1.1.2.1. Onkogenler

Onkogenler ilk olarak virüslerce taşınan ve hedef hücrelerde transformasyona neden olan genler olarak tanımlanmıştır. 1969'da Huebner ve Tadora kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Viral onkogenlerin büyük bir kısmının hücrel karşılığı vardır. Bu genler proto-onkogenler olarak adlandırılır ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre döngüsü ve apoptozis kontrolünde rol oynayan bazı proteinleri kodlar. Aktive olan proto-onkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Onkogen oluşumu, hücrel bir proto-onkogenin uygunsuz bir şekilde aktive olmasına neden olan bir fonksiyon kazanma durumudur. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık *ras* onkogen ailesinde görülür. Bir başka mekanizma da, genin ekspresyon (hücrede ifade olması)'nunu düzenleyen bölgede oluşan bir değişiklik sonucu gen ürününün fazla miktarda üretilmesidir. *ABL* onkogeninde olduğu gibi kromozom translokasyonları da onkogen oluşumuna neden olabilir. *Myc* genleri ise gen amplifikasyonu (genin fazladan kopyasının oluşması) ya da transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının bozulması ile onkogen halini alırlar [19, 28, 27].

Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar baskın karakter taşır. Onkogenlerin aktive olan mutant formlarının ekspresyonları, hücrel çoğalma mekanizmasının proliferasyon yönünde bozulmasına neden olur [19].

1.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler normal koşullarda hücre proliferasyonunun kontrol edilmesinden sorumlu olup, inaktive olduklarında tümör oluşumuna neden olabilmektedir. Çekinik genler olan tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı, nonsens, missens mutasyonları, kromozomal delesyonlar, genin promotoruna yakın bölgesinin metilasyonu sonucu transkripsiyonun gerçekleşmemesi gibi nedenlerle meydana gelebilir ve hücrenin kontrolsüz olarak büyüme ve bölünmesine sebebiyet verir [22].

Retinoblastoma geni (*Rb*), tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir. *Rb*'nin normal fonksiyonu retina ana hücrelerinin çoğalmasını engellemektir. Bu genin yalnızca bir kopyası bölünme kontrolünü gerçekleştirebilmek için yeterli olmaktadır. *Rb*'nin her iki kopyasının kaybı ise hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkmasına neden olarak tümör oluşumunu tetiklemektedir. DNA tamiri, hücre döngüsünün duraklatılması ve apoptozisin uyarılması gibi birçok işlevi üstlenmiş çok yönlü bir protein olan p53'ü kodlayan *p53* tümör baskılayıcı geninin de kanser vakalarının % 50'sinde mutant olduğu görülmüştür [29].

Onkogenler	Tümör Baskılayıcı Genler
Büyüme faktörleri ve Reseptörleri EGF EGF reseptörü PDGF PDGF reseptörü IGF-1 ve IGF-2 IGF-1 ve 2 reseptörleri Heregulin erbB2 (HER-2/neu)	Çekirdek dışı faktörler Hücre zar faktörleri (TGF- β ve reseptörleri) Hücre adezyon faktörleri (Kaderinler, APC) Fosfotazlar (PTEN)
Stoplazmik faktörler Reseptör olmayan Tirozin kinazlar (abl,src) G proteinleri (K-ras,H-ras ve N-ras)	Çekirdek faktörleri Hücre döngüsü inhibitörleri (Rb, p53, INK4)
Çekirdek Faktörleri Transkripsiyon faktörleri (myc, jun, fos) Hücre döngüsü proteinleri (siklinler, E2F)	

Çizelge 1.1: Bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genler [30].

1.2. Hücre Döngüsü ve Kontrolü

Bir hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması ile sonuçlanan süreç hücre döngüsü olarak adlandırılır. Hücre döngüsü, dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazdan oluşur. Bu fazlar hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı

onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleşir ve ardından inaktifleşirler [31].

Hücre döngüsü iki ana kısımda incelenebilir: mitoz ve interfaz. Mitoz, kardeş kromozomların birbirinden ayrıldığı, sitokinez (hücre bölünmesi) ile sonuçlanan evredir. Hücre döngüsünün büyük bir kısmını oluşturan interfaz aşamasında, kromozomlar yoğunlaşmış özelliklerini kaybeder ve çekirdek görünür hale gelir. İnterfaz evresi, moleküler anlamda hücrenin bölünmeye hazırlık yaptığı (büyüdüğü) ve DNA'sını replike ettiği evredir [32].

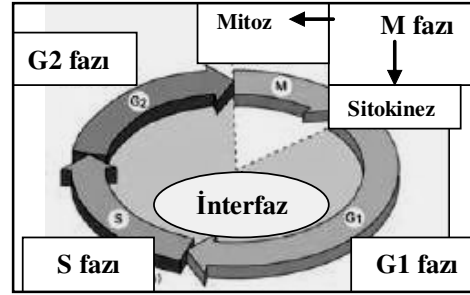
1.2.1. Hücre Döngüsü Fazları

Hücrelerin ikiye bölünmesi mitoz (veya eşey hücrelerinde mayoz) ile gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (büyüme faktörleri, sitokinler, mitojenler gibi) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti mekanizmaları (MAP kinaz, Protein Kinaz C, JAK/STAT yolları gibi) devreye girer. Bu ileti mekanizması transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substrat fosforlayabilir ya da çekirdeğe ulaşıp (STAT'da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu etkiler. Böylece hücre döngüye sokularak mitoz sevk edilmiş olur [34].

İnterfaz olarak isimlendirilen mitoz öncesi hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (siklinler gibi) ve makromoleküller (deoksiribonükleik asitler gibi) sentezlenir. İnterfaz G1, S, ve G2 alt fazlarından oluşur. G, büyüme (Growth) ya da boşluğu (Gap) ifade etmek üzere G1 fazı, mitoz ve DNA replikasyonu arasında gözlenir. G1 sırasında metabolik olarak aktif olan hücre büyür ancak DNA'sını replike etmez. G1'i takiben gerçekleşen S fazı (sentez fazı), DNA replikasyonunun olduğu fazdır. S fazının ardından gelen G2 fazında ise hücre büyümesi devam ederken, mitoz için gerekli proteinlerin sentezi de yapılır [33].

Bölünmenin geçici, geri dönüşümlü olarak durduğu hücreler G1 fazından çıkmış, istirahat fazı denilen G0 fazındaki hücrelerdir. Hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu bu fazda DNA replikasyonu ve protein sentezinin azaldığı görülür. G0 fazındaki hücre, uygun hücre dışı

sinyal gelince (örneğin bir büyüme faktörü) G1 fazından itibaren döngüye devam eder. Yaşlı hücreler ile DNA hasarının birikmiş olduğu hücrelerde bölünme, geri dönüşümsüz olarak durdurulmuştur. Bölünmeye devam etmeyip G1 fazından ayrılan hücreler ise farklılaşma sürecine girer [33, 34].



Şekil 1.2: Hücre döngüsü fazları. Hücre döngüsü interfaz olarak isimlendirilen G1, S, G2 fazları ve mitoz ile sitokinezden oluşan M fazından meydana gelir [20].

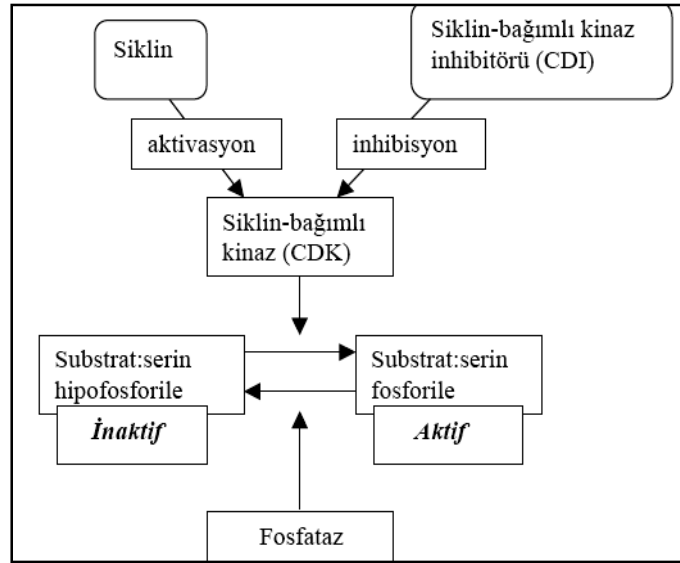
1.2.2. Hücre Döngüsünde Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü sırasında bir genetik hasar tespit edilmiş ise, hata tamir edilmeden döngüye devam edilmez. Bu nedenle döngü G1'den S fazına, G2'den M fazına ve mitoz sırasında metafazdan anafaza geçişte kontrol edilir. Radyasyon veya bir toksine maruz kalınmasıyla oluşan DNA hasarı, hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive eder [35].

Hücre döngüsü kontrol noktalarında üç protein ailesi fonksiyoneldir: siklinler, siklin bağımlı kinazlar (Cyclin Dependent Kinases-CDKs) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors-CKIs) [36].

Siklinler, CDK ve CDI'ların düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karmaşık bir düzen içinde hücre döngüsünün ilerlemesini düzenlerler. Kendi içlerinde enzimatik aktivite göstermeyen siklinler, siklin yokluğunda inaktif olan CDK'larla birleşerek hücre döngüsünü kontrol ederler. Siklinler bu komplekslerin düzenleyici alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir. Regülatör bir siklinin bağlanmasıyla aktif hale geçen CDK'lar, hedef proteindeki serin/trionin aminoasitlerini ATP kullanarak fosforlar

ve bu sayede proteini aktive ya da inaktive ederler. Farklı siklinler (A, B1, D ve E) hücre döngüsünün çeşitli fazlarında bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde düzenlenirken, yıkımları ubiquitin metabolik yoluyla sağlanır. Aktif enzim kompleksi, siklin üzerindeki özel aminoasit zincirini farkederek ve ubiquitin birinden fazla kopyasını buraya bağlar. Siklinlerin yıkımında iki ubiquitin ligaz önemlidir: Birincisi G1/S siklinlerin ubiquitinasyonu ve yıkımından sorumlu olan “SCF” adı verilen enzim kompleksi, ikincisi ise M fazı siklinlerinin ubiquitinasyon ve proteolizinden sorumlu olan anafaz ilerletici kompleks (Anaphase-Promoting Complex-APC)’dir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)’ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CKI’lar ise CDK’lara ters aktivite gösteren proteinlerdir. CDI’lar (p15, p18, p19, p21 ve p27) CDK’ların aktivitesini siklinlere, CDK’ların kendisine ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak inhibe ederler. [34, 37].



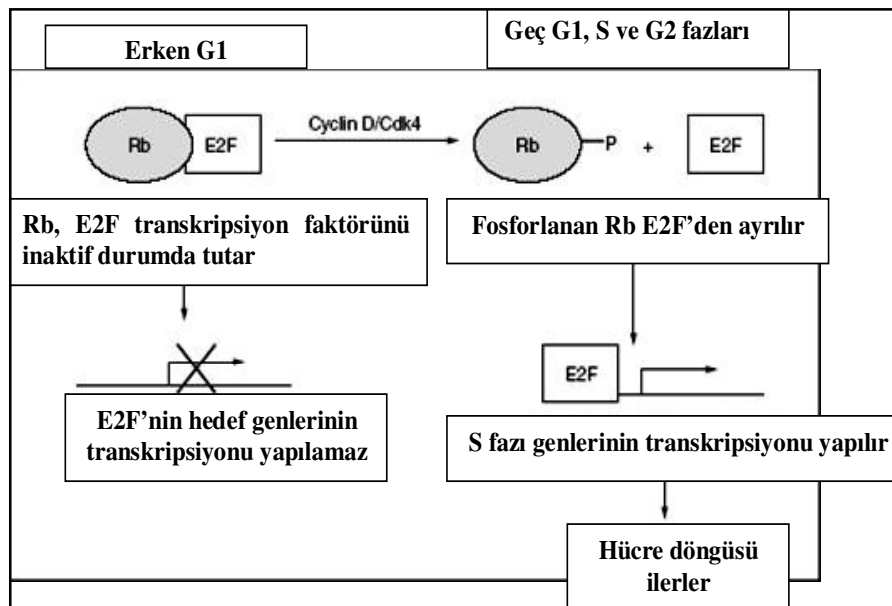
Şekil 1.3: Siklin-bağımlı protein kinaz sistemi. CDK’lar siklinler ile aktive olurlarken, CDI’lar ile inhibe olurlar. CDK’ların aktif formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirir. Böylece substrat aktivasyon durumuna göre hücre siklusu ya durur ya da bir sonraki aşamaya geçer [34].

1.2.2.1. G1 Kontrol Noktası

Yüksek organizmalarda hücre döngüsü kontrolü, büyük oranda G1 CDK'larının sentezi ve aktivasyonuna bağlıdır. CDK'ların sentezi mitojen denilen hücre dışı büyüme faktörleri tarafından başlatılır. G1 CDK'ları bir kez aktive olduktan sonra mitojenler ortamda olmasa dahi hücre döngüsü mitozu kadar devam eder. Mitojenlerden bağımsız olan bu geç G1 fazı dönemine restriksiyon noktası (R point) denir [36].

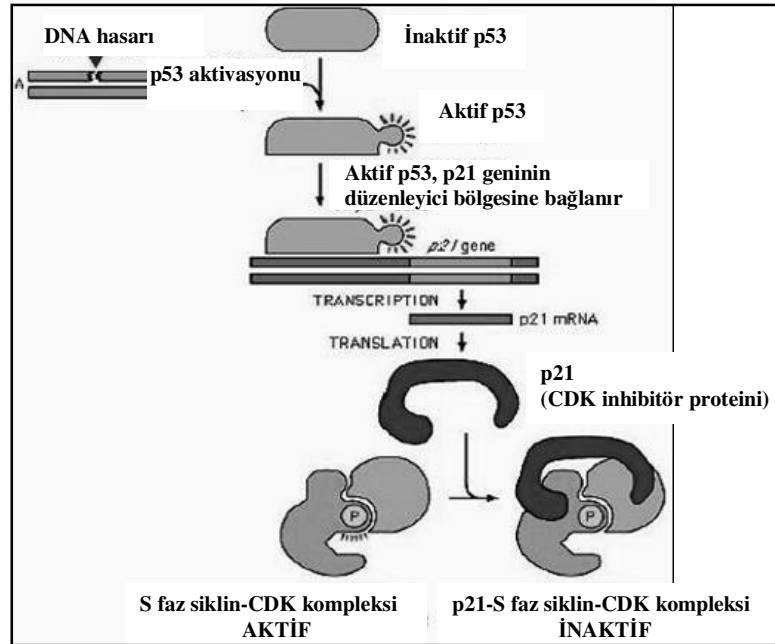
G1 fazı kontrol noktasında siklin bağımlı kinazları inaktive eden iki ana CKI ailesi vardır: p15, p16 ve p18'den oluşan INK4 (Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4) ailesi ile p21, p27 ve p57 proteinlerinden oluşan CKI ailesi. INK4 proteinleri CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak bu kinazların siklinlere bağlanmasını engellerken, ikinci grup CKI, CDK-siklin kompleksine bağlanarak kompleksi inhibe eder [36, 38].

Rb (Retinoblastoma) tümör baskılayıcı proteininin CDK'larca inaktivasyonu, G1 fazı düzenlenmesine örnek teşkil eder. CDK substratlarından biri olan Rb, fosforlanmamış halde E2F transkripsiyon faktörüne bağlı bulunur. Bu durumda E2F inaktif haldedir. Rb fosforlandığında E2F'den ayrılır ve E2F transkripsiyon faktörü olarak iş görmeye başlar. Rb, bir CKI olan p16'nın transkripsiyonu negatif yönde düzenlemesi nedeniyle de hücre döngüsü kontrolünde önemlidir. Rb'nin olmadığı hücrelerde p16'nın yüksek düzeyde eksprese edildiği görülür. Rb'nin siklin D tarafından inaktivasyonu p16'nın aktivasyonuna neden olur. Aktive olan p16 ise CDK4 ve CDK6 ile spesifik olarak etkileşerek bu CDK'ların siklin D ile etkileşimini engeller [36, 38].



Şekil 1.4: Rb ve G1 fazı kontrolü. Büyüme faktörlerinin yokluğunda fosforlanmamış halde bulunan Rb, hücre bölünmesinde gerekli proteinlere ait genler için gerekli E2F transkripsiyon faktörünü inaktif durumda tutar. Intraselüler bir sinyal ileti yolu oluşturan büyüme faktörleri ,G1 fazı siklin-CDK kompleksini aktive eder. Oluşan kompleksin Rb'yi fosforlayarak inaktive etmesiyle serbest kalan E2F, S faz genlerine bağlanarak transkripsiyonlarını sağlar [38].

p53, G1 fazı düzenleme mekanizmasında yer alan bir diğer tümör baskılayıcı genidir. DNA hasarı varlığında aktif hale geçen *p53* proteini, bir CIK olan *p21* sentezini başlatarak siklin D-CDK4 kompleksini inaktive eder. Kompleksin inaktive olmasıyla Rb fosforlanamaz ve E2F aktif hale geçemez. Böylelikle büyüme faktörlerinin aktivasyonu engellenir, hücre döngüsü G1'de durur ve DNA hasarı tamir edilir [36].



Şekil 1.5: *p53* ve G1 kontrol noktası: DNA hasarı varlığında aktif hale geçen *p53*, bir CDK inhibitör proteini olan *p21* transkripsiyonunu başlatır. *p21* proteini S faz siklin-CDK kompleksine bağlanır ve kompleksi inaktive eder, böylelikle hücre bölünmesi G1 fazında durur [38].

1.2.2.2. G2 Kontrol Noktası

Hücre döngüsünde DNA replikasyonunu takiben G2 fazı başlar. Siklin B1, S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi üst düzeye erişir. Siklin B, CDK1 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (M-phase maturation Promoting Factor) olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G1'e geri döner. Siklin B/CDK1 (MPF), çekirdek laminlerini ve nükleoporinleri fosforlayarak çekirdek membranının bütünlüğünün bozulmasına neden olur [39].

MPF aktivasyonu fosforilasyon ile gerçekleşir. MPF'nin CDK1 alt ünitesinin ikinci kez fosforilasyonu ise MPF kompleksini inaktive edecektir. Nükleer bir protein kinaz olan Wee1, CDK1'in ATP bağlanan bölgesini fosforlayarak MPF'yi inaktive ederek erken mitozu önler. Katalitik alt ünitesinden fosforlanan MPF'nin bu hali pre-MPF olarak adlandırılır. Cdc25 (cell division cycle 25)'in CDK1 alt ünitesini defosforlamasıyla pre-MPF aktif hale geçer ve G2 fazından M fazına geçiş sağlanır [40].

1.2.2.3. Mitoz Fazı Kontrolü

M fazı kontrol noktasında, kromozomların iğ ipliklerine tutunup tutunmadığı, sentrozom duplikasyonunun sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilir. Hücre siklusunun her aşamasında olduğu gibi M fazında da kontrol, CDK'larla sağlanır. G2 ve S fazında sentezlenen mitotik CDK kompleksi, aktive olduktan sonra kromozom yoğunlaşması, çekirdek zarı yıkımı, mitotik iğ iplikleri oluşumu, ve kromozomların uzaması gibi olayları tetikler. Mitotik CDK kompleksi, anafaz başlatıcı kompleksi (APC-Anaphase Promoting Factor) aktive eder. APC multi-protein kompleksi, anafaz inhibitörlerinin ubikuitin aracılı proteolizine neden olur. Anafaz inhibitörlerinin inaktivasyonu, metafaz sırasında kardeş kromatidleri bir arada tutan protein komplekslerinin inaktive olmasına yol açarken, kardeş kromatidlerin zıt kutuplara çekilmesinin gerçekleştiği anafaz evresine geçişe olanak tanır. Anafazın sonlarına doğru ise APC, mitotik siklinlerin proteolitik degradasyonunu tetikler. Mitotik CDK aktivitesindeki düşüşe bağlı olarak zıt kutuplardaki kromozomlar dekonpanse olur, nükleer zar tekrar oluşur ve sitokinez meydana gelir. Mitotik CDK'ların inaktivasyonu ile de hücre döngüsü sona erer [36].

1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser

Hücre döngüsü düzenleme mekanizmalarında ortaya çıkan bozukluklar hücrenin büyüme düzenleyici sinyallerden bağımsız olarak hareket etmesine neden olabilir. Pek çok kanserde artmış siklin ekspresyonu ve CKI'lerinde fonksiyon kaybı görülmüştür [42].

Kanserle bağlantısı en çok çalışılmış olan siklin, siklin D1'dir. Paratroid adenoma, mantel hücre lenfoması ve bazı skuamöz hücre karsinomasında, siklin D1 geninde yeniden düzenlenmeye (rearrangement) ve genin normalden fazla ekspresyonuna rastlanmıştır. % 50'ye varan meme kanseri vakasında ise siklin D1'i kodlayan kromozomal bölgede artış (amplification) olduğu görülmüştür [42]. Bazı tümör ve tümör hücre serilerinde siklin D2 ile D3'ün ve D tip siklinlerin katalitik partnerleri olan CDK4 ve CDK6'nın artmış ekspresyonlarına rastlanmıştır. Mutant CDK6 ve CDK4 proteinlerinin INK4'ün negatif regülasyonuna dirençli olduğu da belirlenmiştir. Bazı melanomalarda ise CDK4'ün p16 tarafından inhibe edilmemesine bağlı olarak G1 fazından S fazına geçişin gerçekleşmediği saptanmıştır [42].

G1 fazından S fazına geçişte CDK2 ile kompleks oluşturduğu bilinen, ancak ne zaman ve nasıl inaktive edildiği henüz aydınlatılmamış olan siklin E'nin, bazı meme karsinomlarında yüksek düzeyde eksprese olduğu, bu durumun tümör agresifliğini arttırdığı görülmüştür. Prostat, kolon, pankreas ve mide karsinomlarında da artmış siklin E ekspresyonuna rastlanmıştır [22].

Hepatosit kanseri vakalarında yapılan incelemelerde ise CDK2 ile kompleks oluşturarak hücrenin G1'den S fazına, cdc2 (cell division cycle 2) ile birleşerek ise mitoz fazına girmesini sağlayan siklin A proteini kodlayan gene katılan hepatit B virüs genomunun, siklin A proteinin yıkımında azalmaya, füzyon genin ekspresyonunda ise artışa neden olduğu görülmüştür [41].

İnsan tümörlerinde INK4 inhibitör ailesi üyelerinin mutasyon, delesyon ya da metilasyon yoluyla inaktive olduğu gösterilmiştir. Ailesel melanoma sendromunda *p16* geninde inaktive

edici mutasyon ve pek çok sporadik tümörde de *p15* delesyonları görülmüştür. Meme kanserinde de mutant *p18*'in CDK6'ya bağlanmadığı belirlenmiştir [41, 42].

DNA hasarının tespit edilmesiyle G1 ve G2 fazında blok oluşturarak hasarın tamirine olanak tanıyan *p53* tümör baskılayıcı geni pek çok insan kanserinde mutanttır. *p53*'ün fonksiyon göstermediği hücrelerde mutasyon, gen amplifikasyonu ve kromozom anomalilerinin arttığı görülmüştür [41, 42].

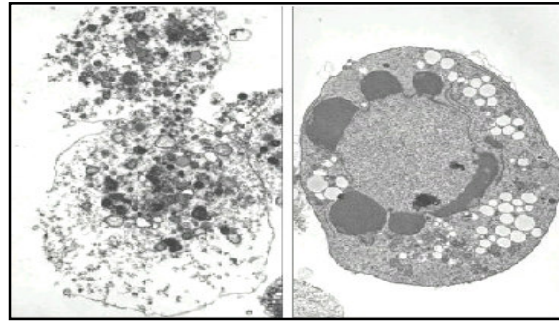
Mitoz sırasında kardeş kromatidlerin ayrılmasını kontrol eden mekanizmada yer alan moleküllerde ortaya çıkan mutasyonların ise, çoğunlukla anöploidi olmak üzere kromozomal değişimler oluşturduğu ve bu sayede transforme genotipi desteklediği görülmüştür. Son dönemde CDK2'nin Wee1 bağımlı fosforilasyonunu arttıran Cables adı verilen yeni bir hücre döngüsü inhibitörü bulunmuştur. Cables'in birincil kolon ve baş-boyun kanserlerinde % 50-60 dolaylarında inaktif olduğu görülmüştür [43].

1.3. Apoptozis

Hücre ölümü apoptozis ve nekrozis olmak üzere iki şekilde gerçekleşir [44]. Nekrotik hücre ölümü çoğunlukla anoksi, mekanik travma ve kimyasal hasar sonucu ortaya çıkar. Hasara uğrayan hücre önce şişer, sonra parçalanır. Hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan prostoglandinler, lökotrienler, serotonin, histamin gibi ürünler, hasara en yakın damar endotelini uyarırlar. Damar endoteli ise selektin yapımını uyarır. Selektin, hücre membranının dış yüzeyine yapışır ve lökositlerin damara yapışmasına neden olur. Sonrasında integrin ligandları aynı hücre parçalanma ligandları ile uyarılır ve lökositler hücre hasarının olduğu bölgeye doğru çekilmeye başlar. Bu sürecin ardından iltihaplanma denilen, kızarıklık, ödem ve ağrı ile tanımlanan enflamatuvar reaksiyonlar başlar [45].

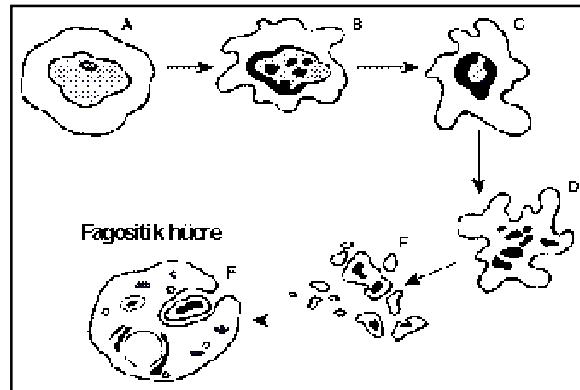
Programlanmış hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da adlandırılan apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan apoptozis terimi ilk defa 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu, yapısal olarak

özgün bir hücre ölüm tipini tanımlamak amacıyla kullanılmıştır [45, 46]. Apoptozis, morfolojik olarak hücrenin büzülmesi, kromatinin çekirdek çevresinde toplanması, membran bütünlüğü bozulmamakla birlikte üzerinde tomurcukların oluşması ve geç aşamada da hücrenin stoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanması ile karakterizedir. Parçalara ayrılmış çekirdek ve parçalanmış hücreye ait tüm yapılar hücre zarı ile kaplanmıştır. Apoptotik cisimcikler yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile fagositik hücreler tarafından sindirilirler [47, 48]. Fagositik hücreler enflamasyonu inhibe eden IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri salgıladıklarından, bağışıklık sistemi enflamasyon yönünde yönlendirilmez [145]. Apoptozisin bir diğer özgün yönü, hücre DNA'sının endonükleozomlar tarafından yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda parçalanmasıdır. Apoptotik hücrede, normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfolipidlerin apoptozisin erken evresinde membranın dış yüzüne yerleştiği ve böylece apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağladığı da bilinmektedir [47, 48].



(a) (b)

Şekil 1.6: Nekrozis ve apoptozis ile ölmüş hücrelerin elektron mikroskopunda görünümü. (a) Kültür ortamında nekrozisle ölmüş, parçalanmış hücre. (b) Kültür ortamında apoptozisle ölmüş bir hücre [20].



Şekil 1.7: Apoptotizisde morfolojik değişim süreci. (A) Hücresel yapıların büzülmesi, (B ve C) Çekirdek kromatinin kondensasyonu ve fragmentasyonu, (D ve E) Apoptotik cisimciklerin oluşumu, (F) Apoptotik cisimciklerin fagositik hücreler tarafından ortadan kaldırılması [140].

Özellik	Nekrozis	Apoptozis
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması (senescence) HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur Kromatin “flocculation”u Hücre şişer Organeller bütünlüklerini kaybederler Büyük vakuoller oluşur Hücre patlar	Hücre membran bütünlüğü bozulmaz, ancak membranda tomurcuklar oluşur Kromatinin çekirdek çevresinde toplanır ve yoğunlaşır Hücre küçülür Organellerin bütünlüğü bozulmaz Hücre mitokondri, ribozom, çekirdek parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanır
Biyokimyasal özellikler	İyon dengesi bozulur ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C’de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde smear görüntüsü)	Kontrollü bir süreçtir Bazı aktivasyonlar ve enzimatik reaksiyonlar için ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C’ta gerçekleşmez DNA 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven görünümü)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır Enflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler Enflamasyon görülmez

Çizelge 1.2: Apoptozis ve nekrozisin karşılaştırılması [34].

Apoptozis, embriyolojik gelişimde ve oluşan dokuların devamlılığında anahtar rol oynar [14, 15]. Erişkinlerde apoptozis, hücre proliferasyonunu dengeleyici olarak görev alarak sabit hücre sayısının korunmasını sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Ek olarak apoptozis, hasara uğramış ya da organizma için tehlike arz eden hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağladığından, bir savunma mekanizması olarak da iş görür. Virüsle enfekte olmuş hücreler sıklıkla apoptozise uğrar; böylelikle yeni virüslerin oluşumu ve virüsün konak organizmaya yayılması engellenmiş olur. DNA hasarı da apoptozisi tetikler. Kanser oluşturabilecek mutasyonlar gibi zararlı mutasyonları taşıyan hücreler, apoptozis yoluyla ortadan kaldırılır. Doku gelişimi esnasında istenmeyen hücreler de apoptozis ile yok edilir. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesi, el ve ayak parmaklarının ayrılması apoptozis ile olur. Apoptozis, memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasında, fazla sayıda üretilen sinir hücrelerinin % 50'den fazlasının ortadan kaldırılmasından da sorumludur [49].

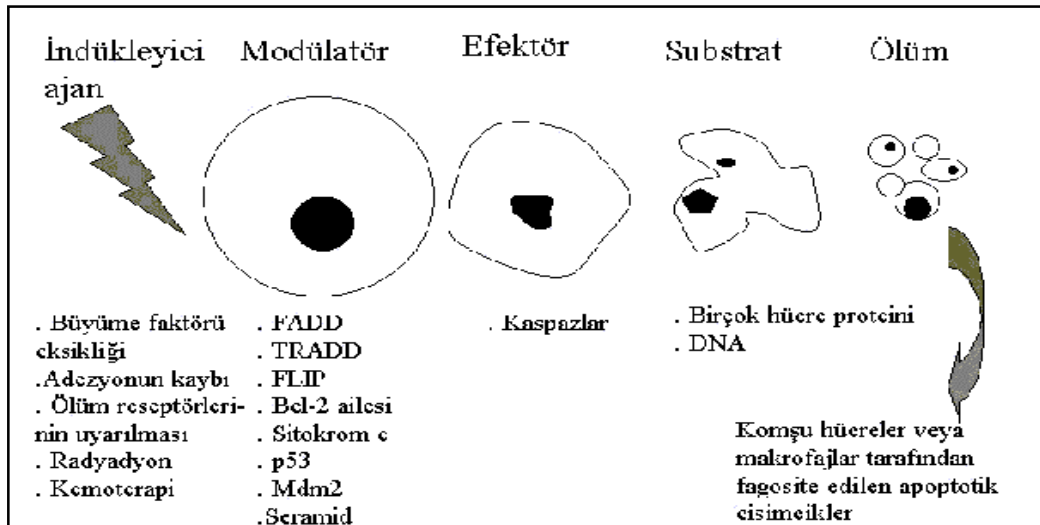
Apoptozis, hücre dışı ve hücre içi çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir. Hücresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, ölüm faktörü olarak da adlandırılan Fas Ligant (FasL) ve Tümör Nekrozis Faktör (Tumor Necrosis Factor-TNF) isimli proteinlerin ilgili reseptörlerine bağlanmasıdır. Bunun dışında viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon, glukokortikoid artışı, büyüme faktörlerinde azalma gibi bazı faktörler de apoptozisi başlatabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan *p53* geni ve hücresel yapılarda tahribat oluşturan reaktif oksijen radikalleri de apoptozisi tetikleyebilmektedir. Apoptozis, sitotoksik T lenfositlerinin hedef hücreyle etkileşimi sonunda da gerçekleşebilir [22]. Apoptozisi tetikleyen diğer hücresel düzeyde ve hücre dışı ajanlar çizelge 1.3'de gösterilmiştir [50]. Apoptozisin düzenlenmesi ise bazıları hücre ölümünü, bazıları hücrenin canlılığının devamlılığını destekleyen sinyal ileti yolları sayesinde olur [49].

Fizyolojik Aktivatörler	Hasara Bağlı Tetiklenme	Tedavi Ajanları	Toksinler
-TNF ailesi; -Transforming Growth Factor β (TGF- β); -Nörotransmitterler; -Büyüme faktörü seviyesinde düşüş; -Kalsiyum; -Glukokortikoidler.	-Isı şoku; -Viral enfeksiyonlar; -Bakteriyal toksinler; -Onkogenler; -Tümör baskılayıcı genler; -Sitotoksik T hücreleri; -Oksidanlar; -Serbest radikaller; -Besin eksikliği; -Antimetabolitler.	-Kemoterapötikler; -Elektromanyetik radyasyon; -Ultra viyole (UV)	-Etanol; -Beta-amiloid peptid.

Çizelge 1.3: Apoptozisi tetikleyen hücre içi ve dışı ajanlar [50].

1.3.1. Apoptozisin Düzenlenmesi

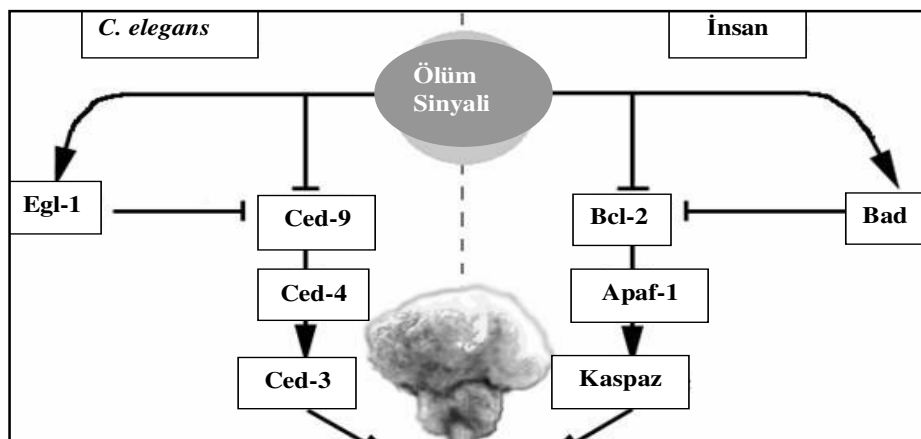
Apoptozis birbirini takip eden üç aşamada ortaya çıkar: apoptozisin tetiklenmesi, tetikleyici sinyallerin düzenlenmesi ve sinyallerin ilgili moleküllere aktarılarak apoptozun oluşması. Apoptozisi tetikleyici sinyaller patolojik ya da fizyolojik olabilir (DNA hasarı, sitokin azalması, hipoksi, sıcaklık değişiklikleri, ölüm reseptörlerinin uyarılması gibi). Düzenleyici faktörler ise gelen ölüm sinyallerinin etkisinin anti-apoptotik uyarılara karşı artırılmasından sorumludur. Efektörlerin düzenleyici faktörlerle aktive edilmesiyle ise apoptozis kaçınılmaz hal alır [51].



Şekil 1.8: Apoptotik süreç [34]

Apoptozisi kontrol eden genler hakkında ilk bilgiler *C.elegans* adlı solucanla yapılan çalışmalar neticesinde elde edilmiştir. *C.elegans*'da normal gelişimin bir parçası olarak 1090 civarındaki somatik hücrenin 131'inin apoptozis yoluyla ortadan kaldırıldığı görülmüştür. *C.elegans*'ın gelişimi sırasında görülen programlı hücre ölümü üzerinde yapılan çalışmalarla, apoptozisin düzenlenmesinde ve gerçekleşmesinde anahtar roller üstlenen üç gen tanımlanmıştır. Bu genlerden *ced-3* ve *ced-4* apoptozisin gerçekleşmesi için gerekli genlerdir ve biri inaktive olduğunda apoptozis gerçekleşemez. *C.elegans*'da tanımlanan üçüncü gen olan *ced-9* ise apoptozisin negatif düzenleyicisi olarak görev alır. *ced-9* mutasyonla inaktive olduğunda, hücre yaşamaya devam edemez. *ced-9*'un yüksek düzeyde ekspresyonu durumunda ise apoptozis oluşmaz [49].

ced-3, *ced-4* ve *ced-9* ile ilgili genler memelilerde de bulunmuş ve bu genlerin korunmuş olduğu görülmüştür. Ced-3, kaspaz denen bir dizi proteazın ilk örneğini teşkil eder. Kaspazlar, aktif bölgelerinde sistein (C) taşıyan ve substrat proteinlerini aspartik asit (Asp)'ten sonra kesen sistein proteazlardır [49]. Stoplazmada prokaspaz olarak adlandırılan, inaktif (zimojen), formda bulunan kaspazlar, birbirlerini aktive ederek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi) oluştururlar. Kaspaz-2, -8, -9, -10 başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, kaspaz-3, -6, -7 efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler [34]. Efektör kaspazların substratları arasında DNase inhibitörü ve nükleer laminler de bulunur. DNase inhibitörünün kaspazlar tarafından inaktive edilmesiyle aktif hale geçen DNase, çekirdek DNA'sının parçalanmasına neden olurken, nükleer laminlerin kaspazlarca kesilmesi ise öncelikle çekirdeğin ve hücre iskeleti proteinlerinin parçalanmasına, sonrasında hücre iskeletinin dağılmasına, membranda tomurcuk oluşumuna ve hücrenin parçalanmasına neden olur. *ced-4*'ün memelilerdeki homoloğu ise Apaf-1'dir. *ced-4* ve Apaf-1 kaspazlara bağlanarak kaspaz aktivasyonuna neden olur. *ced-9*'un ise kaspaz aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Memelilerde Bcl-2 protein ailesi, *ced-9* benzeri işlev görür. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri kaspaz aktivasyonu ve dolayısıyla apoptozisi inhibe ederken, bazı üyeleri apoptozisi destekler [49].



Şekil 1.9: *C.elegans* ve insanda apoptozisin kontrolü [52].

1.3.1.1. Apoptozisi Tetikleyen Ölüm Faktörleri ve Reseptörleri

Sitokinler, protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. TNF, hedef hücredeki TNFR (Tumor Nekrozis Factor Receptor) adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozu aktive eder. Bu ölüm reseptörleri hücre içinde bulunan bir ölüm bölgesi (Death Domain-DD) taşırlar ve ligandlarına bağlandıklarında üçlü yapı (trimerizasyon) oluşturarak aktif hale geçerler [52, 53].

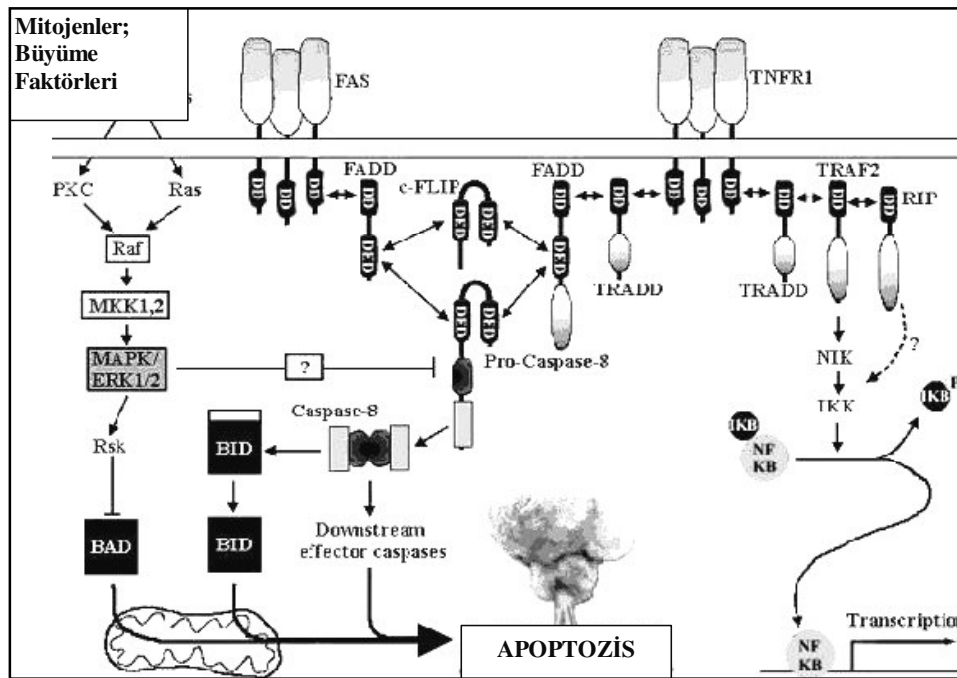
Tip-II membran proteini gibi sentezlenen, N ucu sitoplazmada, C ucu ise hücre dışı alana doğru uzanan FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve doğal katil hücrelerinde (Natural Killer cells-NK cells) bulunan TNF ailesinin bir üyesidir. FasL, hedef hücrede bulunan, TNFR ailesi üyesi olan Fas reseptörü (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ile bağlandığında apoptozisi aktive eder [34].

Fas ve bir başka TNFR üyesi olan TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar ve bir seri protein-protein ilişkisini başlatırlar [34]. TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitlik homolog bölgeler, apoptotik sinyalinin iletimini sağladıklarından ölüm bölgeleri olarak adlandırılmışlardır. TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain), TNFR-1 ve TNFR-2'nin, FADD (Fas Associated

Death Domain) veya MORT1 ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir. Aktive olan apoptotik sinyal, ölüm bölgelerine bağlanan kaspaz-8'e iletilir. Kaspaz-8'in aktive olması ile birlikte diğer kaspazlar sırasıyla aktive olarak ölüm sinyalini çekirdeğe kadar iletirler ve sonuçta kromozomal DNA'nın yıkımına neden olurlar [53, 54].

TNF, TNFR-1 ile bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iki ayrı yol üzerinden iletilir. Birinci yolda, TRADD, ölüm sinyalini kaspaz-8'e FADD üzerinden, ikinci yolda ise TRADD, RIP (Reseptör Interacting Protein) denilen ayrı bir protein üzerinden iletir. RIP, bir serin/treonin kinaz olup, ölüm sinyalinin iletilmesinden sorumlu olan ölüm bölgeleri içermektedir. RIP, TRADD'ye ölüm bölgeleri ile yaptığı etkileşim ile bağlanır ve yüksek düzeyde eksprese edilmesi durumunda apoptozisi indükler. Her iki apoptotik yolun sonunda da kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir. Bu sonuçlar Fas ve TNFR1'in ölüm sinyalini iletmede FADD'yi ortak bir yol olarak kullandığını gösterir. [53]

TNFR-1'in, TNF ile ilişkili apoptozu tetiklemesinden ayrı olarak, bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'yi de aktive ettiği bilinmektedir. NF κ B, TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF- TNF receptor-associated factor) ailesindedir. NF κ B ise aktive olduğunda aralarında TP53, RB1, TNF, TRAF1 ve TRAF2'nin de bulunduğu apoptozis düzenleyici genlerin ekspresyonunu başlatır [52].



Şekil 1.10: Ölüm reseptörleri ile apoptozisin düzenlenmesi [52].

1.3.1.2. Kaspazların Aktivasyonu

İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1)'in oligomerize olmak üzere tetiklenmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in tetiklenmesi ise mitokondriden sitozole sitokrom c (cyt-c) salımı ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD-inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD-caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonuna neden olur [34].

Kaspaz-bağımsız apoptozis ise mitokondriden salınan AIF (Apoptosis Inducing Factor)'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Mitokondriden salınan AIF, bazı nükleazları aktifleştirerek DNA'nın parçalanmasına yol açar [34]. *C.elegans* ile yapılan çalışmalarda, AIF'nin endonükleaz G ile birlikte iş görerek DNA degradasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [142].

Grenzimler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin kaspaz bağımlı apoptozis ile ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve grenzimler normal olarak CTL'lerin ve NK hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL'lerinin hedef hücreye bağlanmasıyla salgılanan perforinler, hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirir. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz-8 aktive olur, dolayısıyla hedef hücreyi apoptozise götürecektir kaspaz yolağını başlatılır [34].

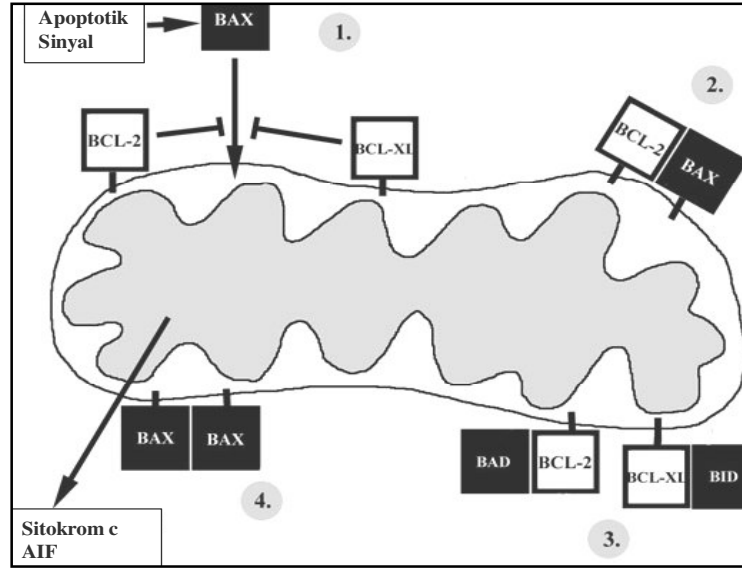
IAP (inhibitor of apoptosis) proteinleri ya prokaspazlara bağlanarak aktive olmalarını ya da kaspazlara bağlanarak aktivite göstermelerini engellerler. IAP'ler, mitokondride üretilen ve sitozole salınan proteinler tarafından inaktive edilirler [20].

1.3.1.3. Bcl-2 Protein Ailesi

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozisi indükleyici (pro-apoptotik) etkiye sahipken diğeri ise apoptozisi baskılayıcı (anti-apoptotik) etkiye sahiptir. İnsanda *Bcl-2* ailesine ait olan 26 gen bulunmuştur. Bunlar arasında Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W ve Bcl-B anti-apoptotik, Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-X_S, APR, PUMA, p193, Bcl-G_S, Bcl-rambo, Nip3 ve Nix (BNIP) ise pro-apoptotik proteinlerdir. Pro-apoptotik olanlar, cyt-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salımını indüklerken, anti-apoptotikler cyt-c salımını baskılar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinden oluşan hidrofobik cep ve BH3 bölgesinde yer alan amfipatik α -heliks bölgeleri ile ilişkilidir. Bcl-2 proteinleri, hidrofobik cep sayesinde bir diğeri Bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar.

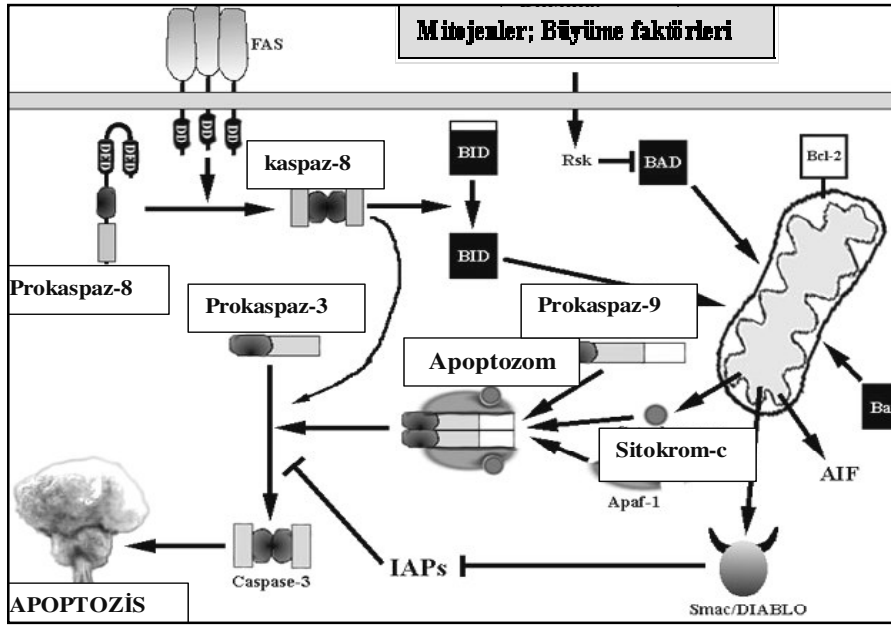
Bcl-2 ailesinde yer alan proteinler, BH1, BH2, BH3 ve bazen de BH4 domainlerinde yer alan aminoasitlerin gösterdiği homolojiye göre iki gruba ayrılır. Bir grup Bcl-2 proteini BH domainlerinde yüksek homoloji gösterirler. Bu grup içerisinde hem anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W ve Bcl-B) hem de pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bok, Bid) yer alır ve aralarında homo ya da heterodimer meydana getirebilirler. Örneğin, apoptotik sinyaller, Bax'ın sitozolden mitokondrinin dış membranına hareketine neden olur iken, Bcl-2 ailesinin Bcl-2 ve Bcl-X_L gibi antiapoptotik üyeleri Bax ile heterodimer meydana getirerek Bax'ın pro-apoptotik etkisini engeller. Diğer taraftan, Bad ve Bid gibi başka pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri, Bcl-2 ve Bcl-X_L ile bağlanarak onların anti-apoptotik fonksiyonlarını engelleyebilir. Sadece BH3 domainlerinde homolojinin söz konusu olduğu ikinci grup Bcl-2 proteinleri (Bad, Bik, Bim, Hrk, Bcl-G_S, p193, APR, PUMA) ise pro-apoptotiktir ve "BH3 only proteins" olarak adlandırılırlar. Bu proteinlerin bir kısmı apoptotik özelliklerini bir anti-apoptotik proteinle dimerize olarak gösterirken bazıları ise pro-apoptotik proteinlerle dimerize olarak antagonist fonksiyon gösterirler. Örneğin Bid'in Bax'a ya da Bak'a bağlanmasıyla,

Bax ya da Bak mitokondriyal membranda oligomerize olur ve membranda büyük porlar oluşur. Oluşan bu porlardan cyt-c, SMAC, ve Omi gibi moleküller sitozole çıkar [5, 52].



Şekil 1.11: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri. Apoptozisi engelleyen (beyaz) ve tetikleyen (siyah) Bcl-2 proteinleri arasındaki olası ilişkiler [52].

Sadece BH3 domainlerinde homoloji taşıyan apoptotik Bcl-2 proteinleri, apoptozisi tetiklemek üzere dışarıdan pek çok sinyal alır. Örneğin p53, APR (Apoptosis Related Protein) ve PUMA (p53-up-regulated modulator of apoptosis)'nın ekspres olmasına neden olur. Diğer bir örnek de başka bir BH3 only protein olan BFM'dir. Hücre iskeletinin tehdit edildiği durumlarda BFM, mitokondri yüzeyinde yer alan anti-apoptotik proteinlerle dimerize olur ve apoptozu tetikler. Bu nedenle BFM'nin metafazı engellediği düşünülmektedir. Bir diğer BH3 only protein ailesi üyesi olan Bid'in N ucunda yer alan 52 aminoasitlik parça, TNF ailesinden reseptörlerin uyarılmasıyla aktifleşen kaspaz-8 tarafından kesilir ve Bid bu sayede mitokondriyal membrana yerleşir. Bim ise mikrotübüllere bağlı olarak bulunmaktadır ve DLC (Dynein Light Chain) arasındaki ilişki koptuğunda serbest kalarak, mitokondri yüzeyinde yer alan bir anti-apoptotik protein ile BH3 domaini sayesinde dimerize olur. Bad'nin hücredeki yerleşimi ise fosforilasyona bağlıdır. Normal koşullarda Bad, yaşam (survival) faktörlerinin etkisiyle serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştirmez; diğer bir deyişle cyt-c tutucu etkilerini antagonize edemez. Yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle defosforile olduğunda ise anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturarak anti-apoptotik etkilerini ortadan kaldırır. Böylece cyt-c salınması gerçekleşir [5, 52].



Şekil 1.12: Mitokondriyal yol ile apoptozis aktivasyonu [52].

1.3.1.4. p53 Tümör Baskılayıcısı

Bir tümör baskılayıcı protein olan p53, DNA hasarının tespiti, DNA tamiri, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve genetik hasarın ardından apoptozisin tetiklenmesinden sorumludur. Pek çok tümör tipinde p53'ün mutant olduğu görülmüştür.

Mdm2 adlı protein, p53'e bağlanarak p53'ü yıkım için hedef molekül haline getirir. p53 ise Mdm2 ekspresyonunu tetikleyerek negatif bir geri besleme döngüsü (feedback loop) oluşturur. Proliferasyonu tetikleyici sinyaller ile p14^{ARF} aracılığı ile p53 kararlılığını destekleyen onkogenler, p53'ün Mdm2 tarafından yıkımını önler.

Sitokinler, sitokin miktarında azalma, hipoksi, ısı şoku ve DNA hasarı da p53'ün kararlılığının sağlanmasında ve aktivasyonunda önemlidir. Aktive olan p53, CDK fonksiyonunu inhibe ederek hücre döngüsünde duraklama yaratan p21WAF-1 ekspresyonunu başlatır. Hücre döngüsünün kesintiye uğramasıyla mitoz öncesi genetik hasarın tamiri için

gerekli süre kazanılmış olur. p53, aralarında Fas ve Bax'ın da bulunduğu bir dizi pro-apoptotik genin transkripsiyonunu da tetikler.

p53'ün transkripsiyonel aktivitesi, transkripsiyon sonrası değişimler (post transcriptional modifications) ile düzenlenir. Bu değişimler p53 hedef genlerini belirler ve p53'ün farklı hücrel görevler (hücre döngüsünün kesintiye uğraması, apoptozis gibi) üstlenmesine yol açar [29, 34].

1.3.2. Kanser ve Apoptozis İlişkisi

Kanser ile apoptozis ilişkisi 1973 yılında apoptozis ile ilgili ilk çalışmalarda belirtilse de, konuya olan ilgi 1992 yılından başlayarak artmıştır [45].

Kanser yapıcı bazı virüslerin hücrenin apoptozise uğramasını engellediği gösterilmiştir. Örneğin serviks kanseri ile ilintili olan insan papilloma virüsü (Human Papilloma Viruse-HPV) ürettiği E6 proteini ile p53'ü inaktive eder. Bazı lenfomalarda görülen Epstein-Barr virus (EBV), Bcl-2'ye benzer bir protein ile Bcl-2 ekspresyonunu arttırıcı bir protein eksprese ederek bulunduğu hücreyi apoptozise dayanıklı hale getirir; böylelikle hücre prolifer olmaya devam eder [55].

Virüsle enfekte olmamış kanser hücreleri de apoptozise dayanıklı olabilir. Örneğin bazı B-hücre lösemilerinde ve lenfomalarda, *Bcl-2* translokasyonuna bağlı olarak Bcl-2 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Melanomada ise Apaf-1'i kodlayan genin ekspresyonunun inhibe edildiği bilinmektedir. Akciğer ve kolon kanseri hücreleri ise yüksek düzeyde Fas sentezlediklerinden, CTL tarafından gerçekleştirilecek ölüm reseptörüne bağlı apoptozisten kaçabilirler. Bazı kanser hücrelerinde ise yüksek düzeyde FasL eksprese edilir. FasL, CTL yüzeyinde bulunan Fas'a bağlanarak CTL hücrelerinin ölümüne neden olur [55].

1.3.3. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için morfolojik görüntüleme yöntemleri, biyokimyasal yöntemler, immunolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır [34].

1.3.3.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Morfolojik anlamda apoptozis tespitinde ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu ya da faz kontrast mikroskobu kullanılabilir. Apoptotik hücreler ışık mikroskobu ile tespit edilecek ise, kromatini boyayarak apoptotik hücrelerin çekirdek morfolojilerine göre ayırt edilmesini sağlayan hematoksilen ya da giemsa gibi boyalar kullanılır. Floresan mikroskobu ile apoptozis tayininde ise floresan boyalara ihtiyaç vardır. Hoechst boyası, DAPI, propidyum iyodür gibi floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden, hücrenin kromatini, dolayısı ile çekirdeği görünür hale gelebilir. Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde faz kontrast mikroskobu da kullanılabilir. Ölen hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar ve faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler; ancak çoğu kez apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri mitozaya giden hücreler ile karıştırılır. Apoptoziste morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlenebildiği mikroskop ise elektron mikroskobudur [34].

1.3.3.2. Histokimyasal Yöntemler

Anneksin V Yöntemi, TUNEL Yöntemi, M30 Yöntemi ve kaspaz-3 yöntemi en çok kullanılan histokimyasal yöntemlerdir.

Anneksin V yöntemi, apoptozise giden hücrelerde hücre zarının dış yüzüne taşınan fosfoditil serin moleküllerinin, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilmesi prensibine dayanır. TUNEL yöntemi ise DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Bu yöntemde terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak, kırılmış DNA'nın 3' hidroksil uçları biyotinlenmiş dUTP tarafından doldurulur ve bu şekilde işaretlenmiş DNA floresan mikroskobunda tespit

edilebilir [138]. Sadece epitelyal kaynaklı olan, sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılabilen M30 yönteminde de apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan antijenik bölgesinin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Kaspaz-3 eksprese ettiği ya da apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıdığı bilinen hücre tiplerinde ise apoptotik hücre tayini, aktif kaspaz-3'ün İHC yöntemi ile boyanması ile yapılabilir [34].

1.3.3.3. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Agaroz jel elektroforezi, Western blot ve mikroarray, apoptozis tespitinde kullanılan moleküler biyoloji yöntemleri arasındadır [34].

Apoptozisde DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan kırıdığı için agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü oluşur. Merdiven görüntüsü apoptozis varlığı için bir belirteç olsa da, agaroz jel elektroforezi ile çalışılan hücre popülasyonu içerisinde apoptozise uğrayan hücrelerin kantitatif analizinin yapılması mümkün değildir.

Western blot yardımı ile apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının saptanması mümkündür. Özellikle pek çok kaspaz için mevcut olan antikolar aktif ve aktif olmayan kaspazların tayininde kullanılır. Hücre içi protein substratları üzerinden de kaspaz aktivitelerinin belirlenmesi mümkündür. Örneğin, Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)'ın kırılması kaspaz-3, lamin B'nin kırılması ise kaspaz-7 aktivitesine işaret eder [56].

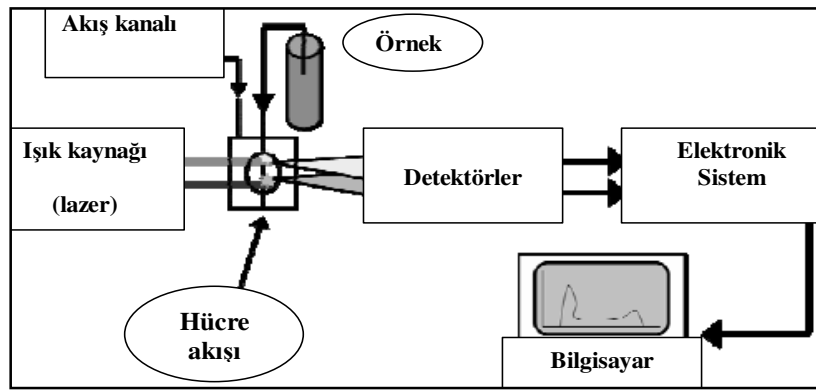
Mikroarray teknolojisi kullanılarak da aynı anda ve kısa bir süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin tespiti mümkün olmaktadır. Böylelikle, apoptozisde etkili genlerin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğmaktadır [34].

1.3.3.4. Flow Sitometri

Flow sitometri apoptozisin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler anlamda tayininde sıklıkla kullanılan bir diğer yöntemdir [57].

Flow sitometri cihazı, bir akış kanalından geçen süspansiyon haldeki parçacıkların, genellikle hücrelerin, tek tek tespitini ve/veya ayrışımını sağlar. Flow sitometri sistemi, heterojen hücre popülasyonlarının tanımlanması, immunfenotipleme, DNA, RNA, hücre proteini ve enzim aktivitesi analizleri, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünün incelenmesi, membran geçirgenliği ve potansiyellerinin değerlendirilmesi, ilaçların hücre içine alınma oranlarının belirlenmesi, mikroorganizma tayini, hücre içi kalsiyum iyon analizleri, pH ölçümleri, glutasyon analizi, virüs ile viral ürün tayinleri, reaktif oksijen türlerinin oluşum oranlarının tespiti gibi birçok alanda kullanılmaktadır [58, 59, 62].

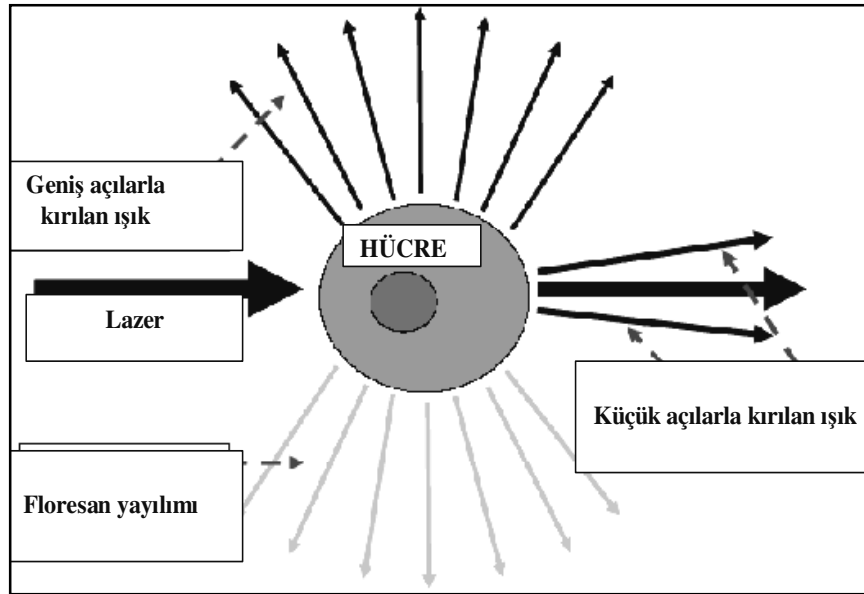
Bir flow sitometri genel olarak, süspansiyon halindeki hücrelerin cihazdan geçişini ve ışık ile kesişimini sağlayan bir akış kanalı, ışık kaynağı ile ışık sinyallerinin toplanmasını sağlayan bölümleri içeren optik sistem ve ışık sinyallerinin ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştüren, elektrik sinyallerini arttıran ve sayısal veriler haline getirerek bilgisayar sistemine ileten elektronik sistemden oluşur [60]. Süspansiyon şeklindeki, 0.2-150 µm boyutundaki herhangi bir parçacık ya da hücre flow sitometri analizi için uygundur [61].



Şekil 1.13: Flow sitometri. Genel olarak bir flow sitometri akış kanalı, optik sistem ve elektronik sistem olmak üzere üç bölümden oluşur [60].

Flow sitometride ışık kaynağı olarak genellikle lazer kullanılır. Belirli bir dalga boyundaki lazer ışını akış kanalına yöneltilmiştir. Süspansiyondaki hücreler lazer ışığıyla

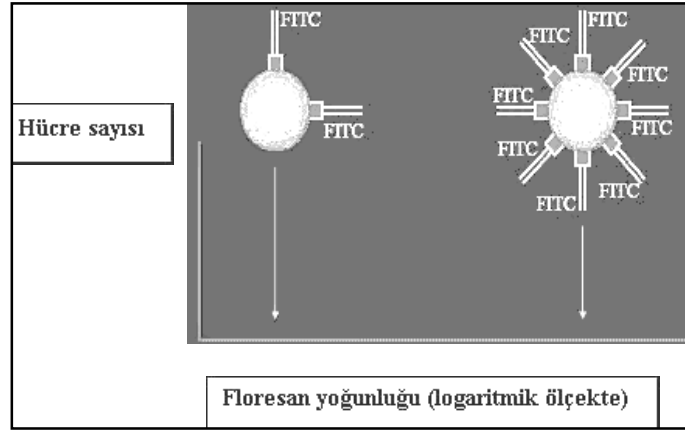
karşılaştığında, ışık hücreler tarafından kırılır ya da hücreler flokrom ile işaretlenmiş ise floresan yayar. Kırılan ışık ya da yayılan floresan hücrenin özellikleri konusunda bilgi verir. Lazer ışınının akışkandan geçtiği noktada detektörler bulunur. Detektörlerden biri hücreden ileri doğru saçılan ışığı (FSC-Forward Scatter) ölçer. Hücreden daha geniş açılarla kırılan ışık ise yandan saçılım (SSC-Side Scatter) olarak adlandırılır ve bir başka detektör tarafından toplanır. FSC, hücre hacmi konusunda bilgi verirken SSC hücre içi yapı (çekirdeğin şekli, sitoplazmik granüllerin tipi, sitoplazmik vakuoller vb.) konusunda bilgi verir. FSC/SSC histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir [62].



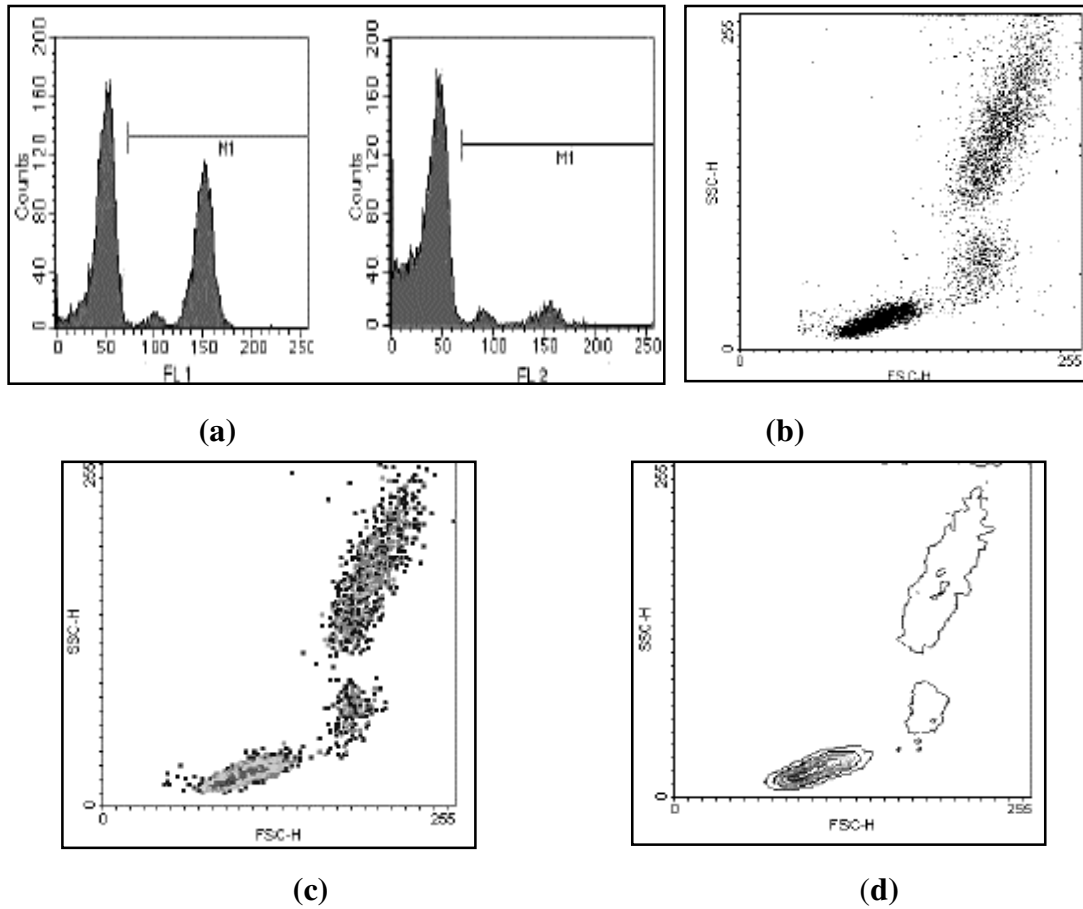
Şekil 1.14: Flow sitometride ışığın saçılımı [60].

Hücre yüzey reseptörleri ya da hücre içi yapılar, hücrelerin izolasyonundan ve saf eldesinden sonra hücre yüzey reseptörleri ya da hücre içi yapılar, bir veya daha fazla floresan bağlı monoklonal antikor veya diğer kromoforlar ile konjuge edilebilir. Bu floresan bağlı

monoklonal antikorlar veya kromoforlar prob olarak adlandırılır. Prob, ışıkla uyarıldığında ışığı daha yüksek dalga boyunda yayar ve yayılan floresan farklı floresan kanallarında (FL-) toplanır, foton sayısını çoğaltan tüpler (Photo Multiply Tubes) ile elektrik sinyaline çevrilerek arttırılır (amplification) ve sonuçlar bilgisayara iletilir [62].



Şekil 1.15: Flow sitometride floresan saçılımı. Flow sitometride saçılan floresan, probun bağlandığı bölge sayısına göre değişir [60].



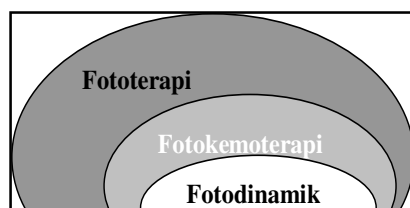
Şekil 1.16: Flow sitometri verilerinin gösterim biçimleri. (a) Histogram: Rölatif floresan ya da saçılan ışık, hücre sayısı (counts-number of events) ile ilişkili olarak gösterilir (b) Dot plot: Her bir nokta bir hücreyi göstermek üzere noktanın konumu X ve Y parametreleri ile ilişkilidir (c) Density plot: Dot blot'ın hücre sayısı parametresini de içeren üç boyutlu gösterimidir (d) Contour plot: Çizgilerin, X ve Y parametrelerine bağlı olarak hücre sayısındaki değişimi ifade ettiği iki boyutlu gösterimdir [141].

Flow sitometride hücrelerin işaretlenmesi, doğrudan veya dolaylı yapılabilir. Doğrudan işaretlemede antikorla konjuge edilmiş, FITC (Fluorescein Isothiocyanate), Rhodamin, PE gibi flokrom maddeler kullanılır. Doğrudan işaretleme yönteminin spesifikliğı yüksektir ancak tespit edilmek istenen yüzey antijeni yoğunluğu az ise başarı elde edilemez. Dolaylı yoldan immunofloresan teknikte ise süspansiyon halindeki hücrelere ilk olarak işaretsiz monoklonal antikor bağlanır. Floresan işaretli ikinci antikorun ilk antikora bağlanmasıyla flow sitometri analizi yapılabilir. Yöntem, düşük yoğunluktaki yüzey antijenlerinin tespit edilebilmesine olanak tanır. Sıklıkla spesifik olmayan bağlanmaların meydana gelmesi ise dolaylı olarak işaretleme yönteminin dezavantajıdır. Çok parametrelili analizlerde iki veya daha fazla renkli immünfloresan kullanılır. Farklı floresan işaretli antikorların kullanılması iki farklı parametrenin tayinine olanak sağlar [62].

Flow sitometri, kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından apoptozis tayininde kullanışlı bir yöntemdir [63]. Tez çalışmasında apoptozis tayini hücre içine girerek aktif kaspaz enzimlerine bağlanan, FITC ile konjuge halde bulunan pan-kaspaz inhibitörü, RD Systems, kullanılarak yapılmıştır. PDT uygulamalarında kullanılan PS'lerin hücre içine alınma potansiyellerinin belirlenmesinde de flow sitometriden faydalanılmıştır.

1.4. Fotodinamik Terapi

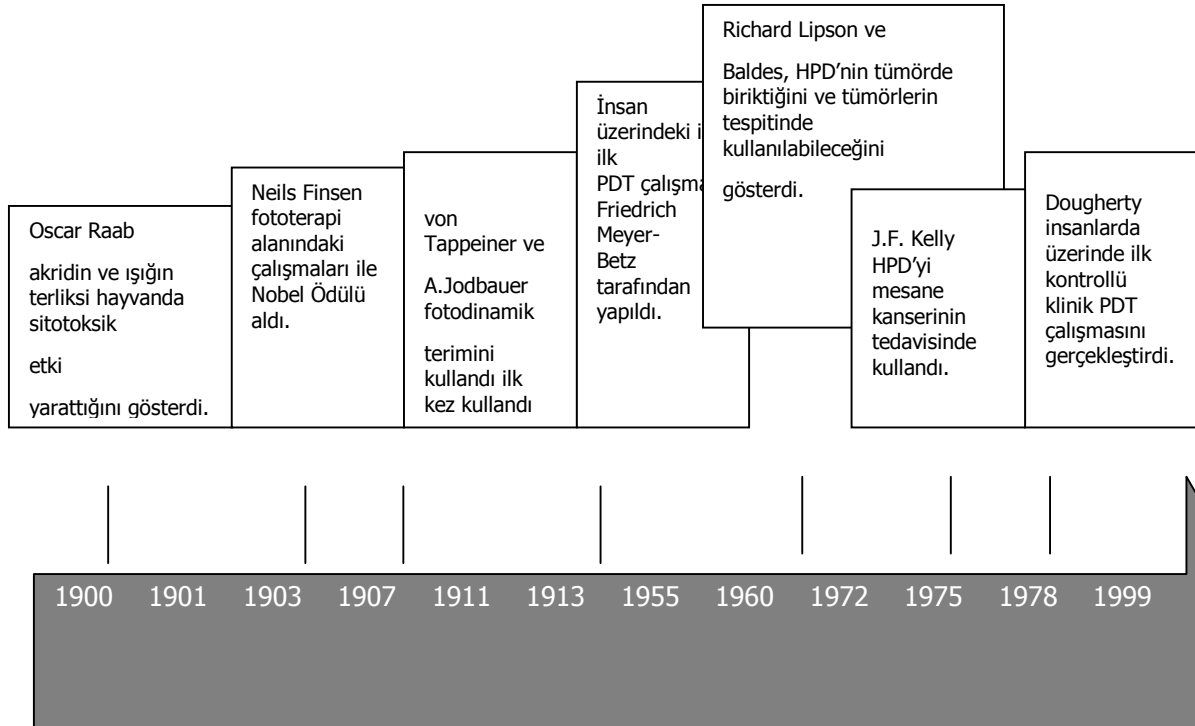
Ultraviyole (UV), görünür ya da görünüre yakın bölgedeki ışığın tedavi edici olarak kullanıldığı tüm uygulamalar fototerapi olarak adlandırılır. Işığa duyarlı bir fotokemoterapötik ajanın kullanıldığı fototerapi uygulamaları için fotokemoterapi terimi kullanılmaktadır. PDT ise fotokemoterapinin bir alt dalıdır [64].



Şekil 1.17: Işık ile tedavi uygulamaları [64].

Güneş ışığının sağlık üzerindeki etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Herodotus (M.Ö. 6. yy.) güneş ışığının kemik gelişimi üzerindeki etkisinden bahsederken, Hippocrates (M.Ö. 460-370) güneş ışığının kronik hastalıklar üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu savunmuştur. Fototerapiyi bilimsel bir yöntem olarak ilk kez kullanan ise Niels Finsen olmuştur. 19. yüzyılın sonlarında Finsen, kırmızı ışık kullanılarak çiçek hasatlığını tedavi etmeyi başarmış, ayrıca kırmızı ışığın sivilcelerin cerahat toplamasını engellediğini göstermiştir. Güneşten elde ettiği UV ışığı kullanarak lupus vulgaris (deri tüberkülozu)'i tedavi etmeyi başaran Finsen, bu çalışmasıyla Nobel Ödülü almıştır.

Günümüzden 100 yıl önce ışık ile bazı kimyasalın birlikte kullanımının hücre ölümünü tetiklediği görülmüştür. 1900 yılında Oscar Raab, akridinin uygun dalga boyunda ışığın maruz bırakılmış terliksi hayvanlarda lethal etki yarattığını görmüştür. 1903 yılında ise Herman von Tappeiner ve A. Jesionek cilt tümörlerini topikal olarak uygulanmış eosin ve beyaz ışık kullanarak tedavi etmeyi başarmışlardır. Işık, ışığa duyarlı bir madde ve oksijen varlığında gerçekleşen kimyasal reaksiyonları ifade etmek üzere fotodinamik etki (photodynamic action) terimini ilk defa kullanan da von Tappeiner olmuştur [65].



Şekil 1.18: 1900'den günümüze PDT'nin tarihi [66].

Günümüzde neoplastik ve neoplastik olmayan hastalıkların tedavisinde kullanılan PDT, genel bir tanımlamayla seçici olarak hedef hücrede biriken ışığa duyarlı maddenin (fotosensitayzır-PS) görünür ışığa maruz bırakılmasıyla, oksijen varlığında hedeflenen dokunun tahribatı prensibine dayanır. PDT yaşa bağlı makular dejenerasyondan, pre-malign dermatolojik bir hastalık olan aktinik keratozisin tedavisine kadar farklı hastalıklar için kabul görmüş bir tedavi şekli olmakla birlikte deneysel çalışmalar, PDT'nin kanser tedavisinde kullanımı üzerine odaklanmıştır [67, 68].

<i>PS'in Kimyasal Adı</i>	<i>PS'in Ürün Adı</i>	<i>PS'in Kabul Edilme Tarihi ve Kabul Gördüğü Ülkeler</i>	<i>Kullanıldığı Hastalıklar</i>
<i>Hematoporfirin türevi, polihematoporfirin</i>	<i>Porfimer sodyum</i>	<i>1995; 40'dan fazla ülke</i>	<i>İlerlemiş ve başlangıç aşamasındaki akciğer kanseri, yüzeysel mide kanseri, özofagal adenokarsinoma, servikal kanser, mesane kanseri</i>
<i>Metil-tetrahidroksifenilklorin</i>	<i>Temoporfin</i>	<i>2001; A.B., Norveç, İzlanda</i>	<i>Baş ve boyun kanserleri</i>
<i>5-Aminolevulinik asit</i>	<i>Aminolevulinik asit</i>	<i>1999; USA</i>	<i>Aktinik keratozis</i>
<i>Metil 5-aminolevulinat</i>	<i>Metil aminolevulinat</i>	<i>2001; Avrupa ülkeleri</i>	<i>Aktinik keratozis, bazal hücre karsinoması</i>

Çizelge 1.4: Kabul görmüş PS'lar ve onkolojide kullanım alanları [69].

1.4.1. Fotodinamik Terapide Fotokimyasal Olaylar

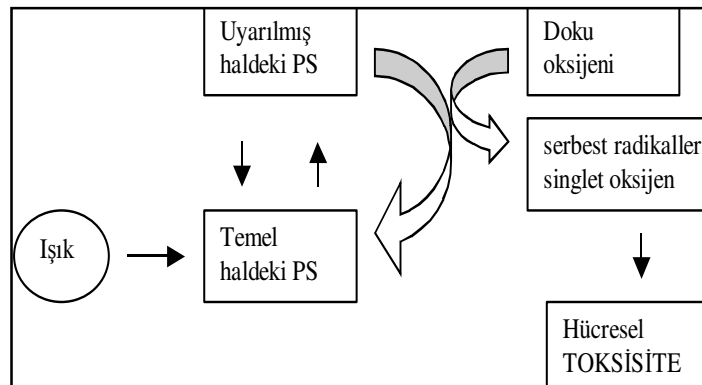
PDT, toksik olmayan üç ajanın kombine etkisine dayanır: PS, ışık ve oksijen. PDT'nin temeli uygun dalga boyundaki ışıkla uyarılan PS tarafından başlatılan bazı fotokimyasal reaksiyonlardır. PDT sonucunda etkili bir biyolojik cevabın oluşabilmesi için serbest radikaller ve $\cdot\text{O}_2$ 'ye, dolayısıyla da oksijen (O_2)'e ihtiyaç duyulur [67].

Bir molekül elektronlar tarafından uyarıldığında (uygun dalga boyundaki bir fotonu soğurduğunda), farklı yollarla temel hal (ground state)'e geri dönebilir. Bu yollardan biri, fotonun geri verilmesidir (emission). Floresan denen bu olay sırasında molekül, yüksek enerjili pozisyondan düşük enerjili pozisyona geçer [70].

Molekülün ısı veya floresan oluşumu ile temel hale dönmesi, nanosaniyeler ile ifade edilebilecek kısa zamanlı bir olaydır. Potansiyel bir PS ise absorbe ettiği enerjiyi daha uzun bir süre (mikro ya da milisaniye düzeyinde) korumalıdır. Böyle bir molekülde uyarılmış elektron, dönüş yönünü (spin) değiştirir. Elektronun dönüş yönünü değiştirmesi sistemler arası geçiş (intersystem crossing) olarak adlandırılır. Uyarılmış haldeki PS için ise üçlü durum

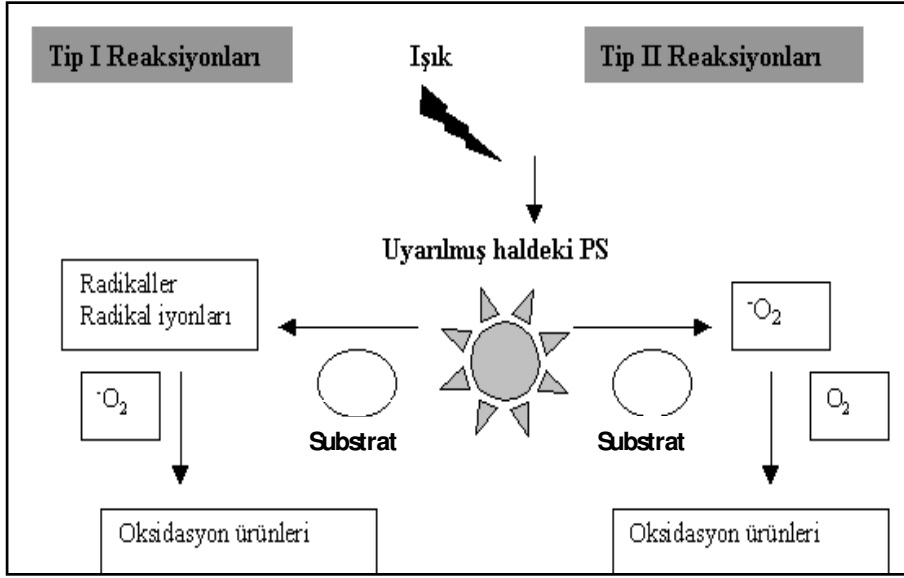
(triplet state) halindedir denir. Üçlü durumdaki PS, enerjisini bir substrat moleküle transfer edebilir ve böylelikle temel hale dönebilir. Kuantum mekaniğine göre, doğrudan ışık enerjisiyle uyarılamayacak olan substrat molekül (genellikle oksijen), PS tarafından aktarılan enerji ile elektronik olarak uyarılmış hale gelir. Başka bir deyişle PS, ışık enerjisini oksijene transfer eder ve sonunda yağ ve protein gibi hücre içi yapılara hasar veren ROS oluşumuna neden olan bir katalizör gibi çalışır. Bu olaylar sonunda temel hale dönen PS, yeni bir fotonu absorbe etmeye hazırdır ancak çoğunlukla ROS tarafından değişime ya da yıkıma uğrar. PS ve ROS etkileşimi sonucu bazı fotokimyasal ürünler oluşabileceği gibi PS'ın ışığa karşı hassaslığını kaybetmesi ya da floresansta azalma (photobleaching) mümkündür [70].

ROS oluşumu elektron transferi reaksiyonları (Tip I reaksiyonları) ya da enerji transfer reaksiyonları (Tip II reaksiyonları) ile gerçekleşebilir. Tip I reaksiyonlarında, uyarılmış haldeki PS'nin sahip olduğu hidrojen atomunu, hücrel bir moleküle aktarmasıyla ortaya çıkan yüksek reaktif özelliği olan radikaller, özellikle hidroksi ve hidrojen peroksit radikalleri, moleküler oksijenle reaksiyona girerek oksijenlenmiş ürünler oluşturur. PDT'de kullanılan pek çok PS ise etkisini çoğunlukla bir ROS olan 1O_2 üzerinden, Tip II reaksiyonları ile gösterir. Tip II reaksiyonlarında uyarılmış haldeki PS enerjisini doğrudan moleküler oksijene (O_2) verir ve 1O_2 oluşmasına neden olur. O_2 'nin elektronik olarak uyarılmış hali olan 1O_2 , biyomolekülleri oksitleyerek hücrel hasara neden olur [70].



Şekil 1.19: PDT'de meydana gelen olayların şematik gösterimi. PS uygun dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında, temel halden uyarılmış hale geçer. Uyarılmış haldeki PS'ın temel hale

dönerken sahip olduğu enerjiyi moleküler oksijene vermesiyle, 1O_2 ve serbest radikaller gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Bu reaktif oksijen türleri ise hücrel toksisiteye neden olur [66].



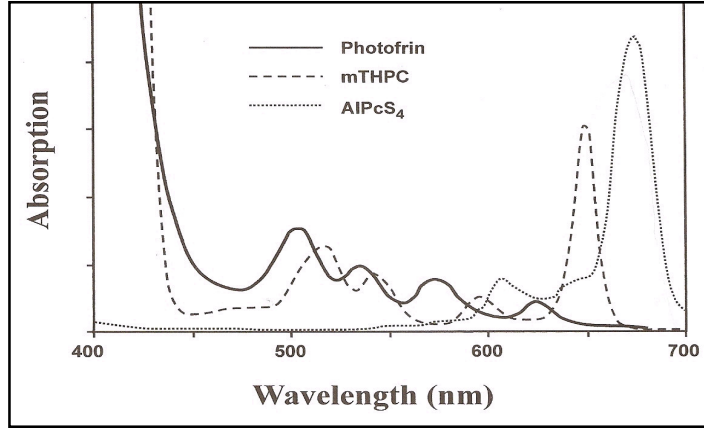
Şekil 1.20: PDT’de Tip I ve Tip II reaksiyonları [66].

1.4.2. Fotodinamik Terapide Işık

PDT’de kırmızı ya da kızılötesi denen, gözle görünmeyen, uzun dalga boyundaki ışık kullanılır. Fotobiyolojik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ışığın PS tarafından absorbe edilmesi, başka bir deyiş ile kullanılan ışığın dalga boyunun PS’in absorpsiyon spektrumu ile uygunluk göstermesi gereklidir [71].

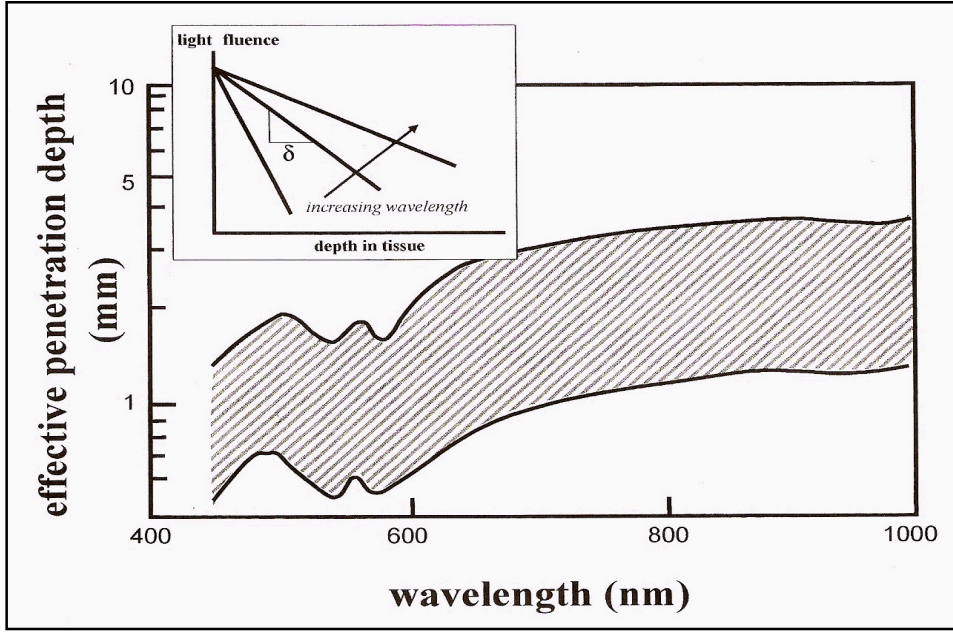
1.4.2.1. Dalga Boyu

PDT’de ışık kaynağı, kullanılan PS’nin *in vivo*’daki aktivasyon spektrumuna uygunluk gösteren dalga boyundaki ışığı sağlamalıdır. Şekil 1.21’de klinikte kullanılan çeşitli PS’lere ait absorpsiyon spektrumları görülmektedir. Pek çok PS geniş bir dalga boyu aralığında aktive olabilir ancak PS’nin maksimum absorpsiyonu veren dalga boyu ile aktive edilmesi, 1O_2 gibi toksik fotoürünlerin daha yüksek miktarda üretilmesine olanak tanır.



Şekil 1.21: PDT’de kullanılan bazı PS’lerin absorpsiyon spektrumları. İkinci nesil PS’ler olan meta-Tetra hidrosifenil klorin (m-THPC) ve sülfürlü aliminyum Pc (ALPcS₄)’nin maksimum absorpsiyon (Y eksenini)’u verdikleri dalga boyu (X eksenini) 650 nm’nin üzerinde iken, birinci nesil PS’lerden olan PF, 630 nm civarında, ancak küçük bir absorpsiyon değeri oluşturmaktadır [72].

Kullanılan ışığın dalga boyu ile ışığın doku içinde ulaşabildiği derinlik (penetrasyon) ilişkilidir ancak dalga boyuyla birlikte, ışığın hücreler ve diğer mikroyapılar tarafından kırılması ve bazı moleküller tarafından (özellikle hemoglobin, melanin ve su) absorbe edilmesi de penetrasyonu etkiler. 630 nm civarında ışığın etkili olabildiği derinlik (penetrasyon) 2-3 mm iken, 600 nm üzerindeki dalga boyları söz konusu olduğunda hemoglobinin absorpsiyonu düştüğünden, ışığın dokuya penetrasyonu 5-6 mm’ye ulaşır. 800 nm’nin üzerinde ise, ışık fotonlarının enerjisi dalga boyuyla ters ilişkili olduğundan, ¹O₂ oluşumuna yetecek foton enerjisi ortaya çıkmaz. Bu nedenle derinde yer alan, geniş çaplı kanser dokularında çalışırken, PS’nin maksimum absorpsiyon değeri ile uygunluk göstermese de uzun dalga boyundaki ışık uygulandığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir [72].



Şekil 1.22: Işığın dokuya nüfuz etme derinliğinin dalga boyu ile ilişkisi. Beyin ya da kas gibi pigmentasyonun düşük olduğu dokularda ışığın nüfuz etme derinliği yüksek iken, karaciğer gibi dokularda ışığın penetrasyonu derinliği düşüktür [72].

PS'nin etkili absorpsiyon spektrumu solüsyon içindeki absorpsiyon spektrumu ile aynı olmak zorunda değildir. PS'nin biyomoleküllere bağlanması ile ilişkili olarak, en üst düzey absorpsiyonu veren dalga boyu değerinde (absorption peak) birkaç nm'lik sapma olasıdır. Eğer lazer gibi tek bir dalga boyunda ışık veren ya da dalga boyu aralığının dar olduğu ışık kaynakları kullanılıyorsa, kullanılan ışığın dalga boyu ile *in vivo* aktivasyon doruğunun (peak) birbiriyle uyumlu olması şarttır. Bu anlamda ışığı geniş bir dalga boyu aralığında veren (broad-band sources) LED ve filtreli lambaların kullanımı avantajlıdır.

Broad-band ışık kaynakları kullanıldığında kaynak ve PS arasında % 100 olmayan bir çakışma vardır. Işık kaynağının etkili gücü (effective power, $P(\lambda)$), $A(\lambda)$ PS'nin absorpsiyon spektrumu olmak üzere λ 'ya bağlı integral ($d\lambda$);

$$P_{\text{eff}} = \int P(\lambda) A(\lambda) d\lambda \quad (1.1)$$

olarak formüle edilir. Burada ifade edilen, efektif gücün, kaynağın güç spektrumu ve PS'nin absorpsiyon spektrumunun kesiştiği bölgede, enerjinin her dalga boyu için hesaplanması ve sonuçların toplanmasıyla elde edilmiştir. Lazerler için güç spektrumu tek bir dalga boyu olduğundan efektif güç, kaynağın gücü (actual power) ile aynıdır. LED'ler ve filtreli lambalar için ise efektif güç, kaynağın gücünden düşük olacaktır. Başka deyişle, PDT etkisi ve O_2 oluşumu yönünden değerlendirildiğinde, LED ya da filtreli lambalar kullanıldığında uygulanması gereken güç, lazer kullanıldığında uygulanacak güçten fazla olmalıdır [72].

1.4.2.2. Işık Kaynakları

PDT'de kullanılan ışık kaynaklarını lazerler, ışık yayan diodlar (Light Emitting Diodes-LEDs) ve filtreli lambalar olmak üzere üç sınıfta incelemek mümkündür:

Lazerler (Laser-Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), ışık ışınlarını fokusu kolaylaştıran az bir sapma ile, tek bir renkte (monochromaticity) ve senkronize ışık dalgaları (coherent light waves) halinde verirler. Sabit bir dalga boyunda ve doğrusal ışık veren lazerler, ışığın fokuslanmasını sağladığından fiber temelli uygulamalar için avantajlıdır.

Kullanılan PS'nin absorpsiyon bandına uygun dalga boyundaki ışığı bir filtre vasıtasıyla veren lamba sistemleri ise özellikle endoskopik olmayan PDT uygulamalarında tercih edilir. Lazer sistemlerine göre daha ucuzdurlar ve kullanımları daha kolaydır.

Geniş bir dalga boyu aralığında (broad-band) kullanılabilen LED'ler (Light emitting diodes) yarı iletkenlerdir. Yüksek ışık gücüne sahip olmaları da ucuz ve küçüktürler [70].

Lazer ışık kaynaklarında ışık, düşük bir sapma ile ve fokuslanarak ilerlediğinden (coherence) doğrudan retinada konsantre olabilir ve gözde kalıcı hasarlar bırakabilir. Lazer olmayan ışık kaynakları (lamba sistemleri ve LED'ler) kullanırken böyle bir risk söz konusu değildir [73].

1.4.3. Fotosensitayzır

PS'nin fiziko-kimyasal nitelikleri, PDT'nin etkinliği konusunda belirleyicidir. İdeal bir PS, kimyasal anlamda saf olmalıdır, seçici olarak neoplastik dokuda yoğunlaşmalıdır, kısa süre içinde dokudaki en yüksek konsantrasyonuna ulaşabilmelidir, normal dokudan kısa sürede uzaklaşabilmelidir, optimal doku geçirgenliği sağlayan dalga boyunda aktive olmalıdır, O_2 oluşumu için yüksek kuantum verimine sahip olmalıdır ve karanlıkta toksik etki göstermemelidir [68].

1.4.3.1. Birinci Nesil Fotosensitayzırlar

Kanser tedavisinde onaylanan ilk PS, özofagal, akciğer, mesane, mide ve servikal kanserlerin tedavisinde kullanılmış olan PF'dir. HPD'den kısmen saflaştırılarak elde edilmiş olan PF, bir porfirin karışımı olduğundan kimyasal anlamda kısmen karakterize edilebilmektedir, aktif bileşenlerinin belirlenmesi güçtür ve aynı özellikteki tekrarlarının sentezlenmesi konusu şüphelidir. Absorbsiyonun en yüksek olduğu 630 nm için molar absorpsiyon kat sayısının düşük olması, PF'nin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasını gerektirir. Bununla birlikte, 630 nm'lik dalga boyundaki ışık, doku içinde ancak birkaç mm derinliğe kadar etki edebilir. En az 4-6 hafta kadar vücuttan uzaklaşmaz, başka bir deyişle bu zaman içinde fototoksiktir. Seçici olarak tümörde konsantre olma eğilimi de düşük olan PF, bahsedilen nedenlerden dolayı PDT uygulamaları için kullanışsızdır [64, 74].

PF'in bahsedilen dezavantajları, ikinci nesil PS'ların sentezlenmesine neden olmuştur. İkinci ve üçüncü nesil PS'lar ile hedeflenen (a) hedeflenen dokuya (tümör dokusu vb) karşı seçici olması (b) yüksek dalga boyunda absorpsiyona sahip olması; böylelikle daha derinlere ulaşabilmesi (c) yüksek dalga boyunda molar absorpsiyonunun yüksek olmasıdır [75].

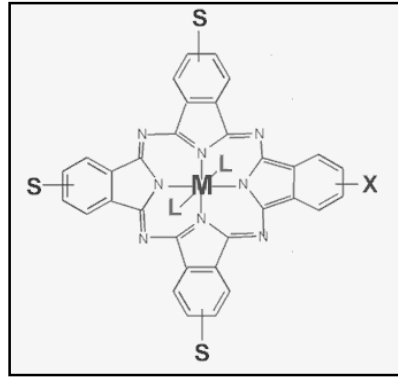
1.4.3.2. Ftalosiyaninler

Sentetik, porfirin yapıda boyalar olan, ticari anlamda pek çok alanda kullanılan Pc'lerin, ikinci nesil PS'ler olarak PDT'de kullanılmak üzere geliştirilmesi oldukça yenidir. Pc'lerde

benzen halkaları ile konjuge haldeki pirol grupları, aza nitrojenlerle birbirine bağlanmıştır. Bu kimyasal yapı, absorpsiyon spektrumunun daha uzun dalga boylarına kaymasına (genellikle 680 nm civarı) neden olur. Bu nedenle Pc'leri uyarmak için dokuda derinlere nüfuz edebilen uzun dalga boyları kullanılır. Pc'ler, uzun dalga boylarında (660-700 nm) yüksek molar absorpsiyon katsayısına ($>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sahiptirler, kararlıdırlar, karanlıkta toksik özellik göstermezler ve tümör dokusunda seçici olarak birikirler [76].

Potansiyel bir PS'nin üçlü fazdaki ömrü uzun olmalıdır. Bu koşul Pc'lerde, Zn ya da Al gibi bir diamagnetik atomun Pc makromolekülüne dahil edilmesiyle sağlanır. Metalsiz bileşikler ve paramagnetik Pc'ler yapılarına katılan pek çok metalle oldukça kararlı yapılar meydana getirebilirler. Katılan bir merkezi metal iyonu ayrıca Pc'nin fotofiziksel özelliklerini de değiştirir. Metal içermeyen Pc'ler ile Cu, Co ve Fe gibi paramagnetik metaller içeren Pc'lerin üçlü haldeki ömürleri çok kısadır ve düşük düzeyde fototoksisite oluştururlar.

Pc'ler genellikle hidrofobik yapıdadırlar ancak suda çözünebilenleri de sentezlenmiştir. Suda çözünebilen Pc'ler yapıya sülfonik asit, karboksilik asit ve amino grubu gibi yapıların eklenmesiyle mümkün olabilir [77].



Şekil 1.23: Ftalosiyanın molekülü. M: Metalin eklenebileceği bölge, L: Farklı aksiyal ligandların bağlanabileceği bölge, S ve X: Farklı yan grupların (yağda çözünen, suda çözünen gibi) bağlanabileceği bölgedir [8].

1.4.4. Fotodinamik Terapide Oksijen

Pek çok çalışma PDT etkisinin oksijenle ilgili olduğunu göstermiştir. Oksijene bağımlılık, oksijenin PDT ile $\cdot\text{O}_2$ oluşturmaktan dolayıdır. $\cdot\text{O}_2$ 'den başka diğer ROS'ler (hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi) de hücre hasar için önemlidir. Oluşan yeni damarların yeterli olmadığı hipoksik tümör bölgelerinde, yetersiz oksijenden dolayı PDT etkinliğinin düştüğü bilinmektedir [65].

In vivo'da, oksijen miktarındaki azalma, PDT ardından hipoksik hücre fraksiyonunun kantitatif olarak analiz edilmesiyle ya da doğrudan doku oksijen basıncını belirleyen oksijen elektrodlarının kullanılmasıyla belirlenebilir [65].

PDT etkisinin oksijen bağımlılığının düzeyi kullanılan PS'ye bağlıdır. Örneğin, PF'nin kullanıldığı PDT'de 5 kPa'lık oksijen basıncında PDT etkisi üst düzeyde iken, basınç 1 kPa'a düşürüldüğünde etkinin % 50 azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan kloroalüminyum Pc (CASPC) ile uygulanan PDT'de, PDT etkinliğini % 50 azaltmak için oksijen basıncını 0,33 kPa'a düşürmek gerektiği gösterilmiş; buradan yola çıkılarak CASPC'in etkisini göstermesi için oksijene olan bağımlılığın düşük olduğu sonucuna varılmıştır. *In vivo*'da anoksik koşullarda ise PF'in kullanıldığı PDT'nin başarısız olduğu görülmüştür [65].

Radyasyon terapisine benzer şekilde PDT'de de uygulanan ışığın cm^2 'ye düşen gücü arttıkça, oksijene bağımlılığın azaldığı gösterilmiştir. Klinik PDT'de kullanılan dozun (100-200 mW/cm^2), düşük dozlarla karşılaştırıldığında, daha az tümör yıkımı oluşturduğu belirlenmiş; nedeninin ise ışığın uygulanması sırasında yüksek miktarda oksijen tüketimi ve yetersiz reperfüzyon olabileceği düşünülmüştür. Yüksek ışık gücünde, PDT etkinliğinin arttırmak için ışık, belirli zaman aralıklarıyla gönderilmiştir. Ortotopik sıçan mesanesi tümör modelinde, PS olarak BPD-MA'nın kullanıldığı çalışmada, 690 nm dalga boyundaki, 100 mW/cm^2 gücündeki ışığın 60 saniyelik aralıklarla verildiği PDT'nin, sürekli ışığa maruz bırakılan PDT uygulamasından 1000 kat daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Işığın gücü 30 mW/cm^2 'ye düşürüldüğünde ise tümör hücre sitotoksitesinin daha da arttığı ortaya

çıkıştır. cm^2 'ye düşen ışık gücü ile oksijen basıncı arasındaki ilişkinin *in vivo*'da incelendiği bir çalışmada ise, PDT uygulanmadan önce 2.9-5.2 mmHg olan oksijen basıncı ($p\text{O}_2$)'nın, ışıkla muameleden bir dakika sonra 0.7-1.1 mmHg'ya düştüğünü gösterilmiştir [65].

Klinik öncesi PDT uygulamaları, PDT'nin başarısında oksijenin önemini göstermiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda, PDT'de ışık gücünün de önemini ortaya koymuştur. Deneysel uygulamalarla karşılaştırıldığında, klinik uygulamalarda kullanılan ışık gücü yüksektir. Diğer taraftan ışık gücünün düşürülmesi, uygulama süresini arttıracığından pratikte uygun değildir. Fraksiyonel uygulama söz konusu olduğunda ise, sublethal hasarların tamiri, PS'nin ışık etkisiyle parçalanması ve tümör oksijenlenmesi göz önüne alınmalı; buna göre, her model ve her PS için optimal fraksiyon aralıkları ve sayısı belirlenmelidir [65].

1.4.5. Fotodinamik Terapinin Tümör Seçiciliği

PS'nin tümör bölgesinde lokalizasyonu ve dokunun belirli bir bölümünün ışınlanması nedeniyle PDT, tümör spesifik bir terapidir [78]. PS'nin hedef dokuda lokalizasyonu, PS'nin biyokimyasal özelliklerine bağlı olmakla birlikte, bazı taşıma sistemlerinin kullanılmasıyla seçiciliğin artırılması mümkündür [79]. İlk hücrel hasarın meydana geldiği yer olmasından dolayı PS lokalizasyonu, PDT sonucu ortaya çıkan hücre ölüm modeli için de belirleyicidir [78].

1.4.5.1. Fotosensitayzrın Tümör Hücrelerine Alımı ve Hücre İçi Lokalizasyonu

Tümör dokusu ve normal doku arasındaki fizyolojik farkların, Ps'nin seçici olarak tümör dokusunda birikmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu fizyolojik farklılıklar 1) Tümör dokusunun normal dokudan daha büyük bir interstitial hacme sahip olması; 2) Tümörlü dokuda normal dokudan daha fazla sayıda makrofajın bulunması (hidrofobik PS'lerin bu bölgede toplanmasını kolaylaştırır); 3) Tümör dokusundaki mikrodamarlarda çatlakların bulunması; 4) Tümörde lenfatik drenajın düşük olması; 5) Tümör dokusunda hücre dışı pH'nın düşük olması (düşük pH da PS'in hücre içine alınması kolaylaşır); 6) Tümörün normalden fazla miktarda kollajen içermesi (porfirinler kollejene bağlanır); 7) Tümör

dokusunda yer alan hücrelerin normal hücrelerden daha fazla sayıda lipoprotein reseptörüne sahip olmasıdır [42, 80].

Klinik olarak kabul edilmiş bir PS olan PF, lipofilik özellikleri farklı, çeşitli porfirin bileşenleri içerdiğinden hücre içerisinde farklı yapılarda lokalize olabilir. Ancak sentezlenen ikinci nesil PS'ler daha saftır ve lokalizasyonun tanımlanması genellikle kolaydır. PDT'nin tümör hücrelerindeki potansiyel hedefleri mitokondri, lizozomlar, plazma membranı ve endoplazmik retikulum (E.R.)'dur. Birikme özelliği ve lokalizasyon, PS'nin lipofilik özelliği ve yığılma kapasitesine bağlıdır. Yüksek ve düşük yoğunluktaki lipoproteinlerle güçlü bağ yapabilen hidrofobik PS'ler, intravenöz yolla dolaşıma verildiğinde malign dokuya yüksek seçicilikle transport olur. Lipofilik PS'lerin neoplastik hücrelerde konsantre olmalarının nedeni, bu hücrelerin yüksek sayıda düşük yoğunluklu yağ (Low Density Lipid-LDL) membran reseptörlerine sahip olmalarıdır. Reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye giren lipofilik PS, tümör hücrelerinin lipofilik karakterdeki plazma, mitokondri, E.R., çekirdek ve lizozom membranlarında birikir. Bahsedilenlerden başka, tümör pH'sının düşük olması gibi başka faktörler, PS'nin hücre içine alımını kolaylaştırır. Pek çok tümörde, düşük oksijen miktarı ve yüksek glikolitik aktiviteden dolayı pH düşüktür. Hidrofilik PS'ler ise intravenöz yolla enjeksiyonun ardından başta albümin olmak üzere diğer serum proteinlerince taşınırlar. Hidrofilik karakterlerinden ötürü stoplazmaya geçiş oranları düşük olan PS'ler, interstitial boşluk ve tümör dokudaki vaskular stromada birikme eğilimindedirler [68, 80].

Hidrofobik PS'lar genellikle tümör hücrelerini doğrudan etkilerler. Hidrofilik PS'lar ise kan damarlarını tahrip etmek suretiyle, hiperproliferatif hücrelere giden oksijeni ya da besin kaynağını azaltarak dolaylı yoldan hücre ölümüne neden olurlar [68].

1.4.5.2. Taşıyıcı Sistemler

İlaçlar için kullanılan hedefe spesifik (drug targeting) taşıma sistemlerinin PS'ler için de kullanılabileceği düşünülmüştür. Taşıma sistemlerinin kullanılması ile PS'nin tümör dokusuna spesifikliği sağlanabileceği gibi, hedef dokudaki konsantrasyonu artırılabilir ve böylelikle düşük konsantrasyonlarda da etkinlik sağlanabilir. Büyük moleküller karmaşık

sentez işlemleri gerektirdiğinden ve PS'ye konjuge haldeki bu moleküler çoğu kez transport bariyerlerini geçemediğinden, taşıyıcı sistem olarak tercih edilmez [79].

Lipid temelli taşıma sistemleri, lipozomlar ve yağ emülsiyonları gibi, suda çözünmeyen PS'lerin kullanımına olanak tanır; böylelikle PS'nin hücre içine alınması sağlanır. Ancak PDT'de spesifikliğı arttırmak isterken amaçlanan PS'nin tercihen ya da seçici olarak tümör hücrelerinde birikmesidir. LDL ve monoklonal antikorlar bu amaçla geliştirilmiştir [78].

Bölünme kabiliyeti yüksek hücrelerde membran sentezi için yüksek miktarda kolestrole ihtiyaç duyulduğundan LDL reseptörü sentezinde artış görülür. Bu nedenle LDL, anti-kanser ilaçlar için kullanışlı bir taşıyıcı sistemdir. Hidrofobik PS'ler LDL'nin lipid bölgesiyle birleşir ve oluşan kompleks endositoz yoluyla etkin bir şekilde hücre içine alınır [80, 81].

Lipozomlar da PS'nin tümöre spesifik olarak taşınmasında kullanılmaktadır. Tümör spesifik taşınımın, PS'nin lipozomdan lipoproteine transfer edilmesiyle gerçekleştiğı düşünülmektedir [80].

PS'nin spesifik tümör antijenlerine, spesifik monoklonal antikor (monoclonal antibody-Mab) ile konjuge edilmesi, PS'nin tümör spesifikliğini arttırmaya yönelik başka bir uygulamadır. Bu antijenler sadece tümör hücrelerinde eksprese edilen antijenler olabileceğı gibi tümör hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla eksprese olan antijenler de olabilir. Mab ile PS'nin tümöre spesifik olarak konjuge halde kullanılmasına "fotoimmuno-targeting" denir. Mab-PS konjugantları iki şekilde sentezlenebilir: (a) PS Mab'ye doğrudan bağlanabilir, (b) Konjugant oranını arttırmak için PS, Mab'ye bir polimer aracılığı ile bağlanabilir [78]. Burada kullanılan polimerler dextranlar, poliglutamik asit (PGA), polivinil alkoller (PVAs), poli [N-(2-hidroksipropil) metakrilamid] ve poli-L-lizinler olabilir [80].

Sonuç olarak PS'nin hedeflenen dokuda lokalizasyonu, PDT'nin spesifikliğı için belirleyicidir. Oluşacak hücresel yanıtı belirleyici olması nedeniyle PS'nin hücre içi lokalizasyonu da önemlidir. Hem tümör spesifik hem de hücre içi hedeflenen kompartmana spesifik taşıyıcı moleküllerin geliştirilmesi, daha iyi karakterize edilmiş, yüksek saflıkta,

tümör hücresinden geçecek büyüklükte, uygun moleküler yükte konjugantların oluşturulması, PDT'nin başarısı için önemlidir [80].

1.4.5.3. Işık

Işığın tümörlü bölgeye uygulanması, PDT'de seçiciliği destekler. PDT'de kullanılan PS'ler karanlıkta toksik özellik göstermezler. Böylelikle terapi ile sadece ışığa maruz kalan bölgede tahribat oluşur. Lazerle kombine haldeki fiber-optik sistemler, ışığın sadece lezyonun bulunduğu bölgeye uygulanabilmesini ve abdominal boşluk gibi vücudun zor ulaşılabilir bölgelerine ulaşmasını sağlamıştır. PS'nin dağılımı zamana bağlı bir süreç olduğundan, ışık uygulamasından önce geçen süre de PDT'nin spesifikliğinde belirleyici faktörlerden biridir [78].

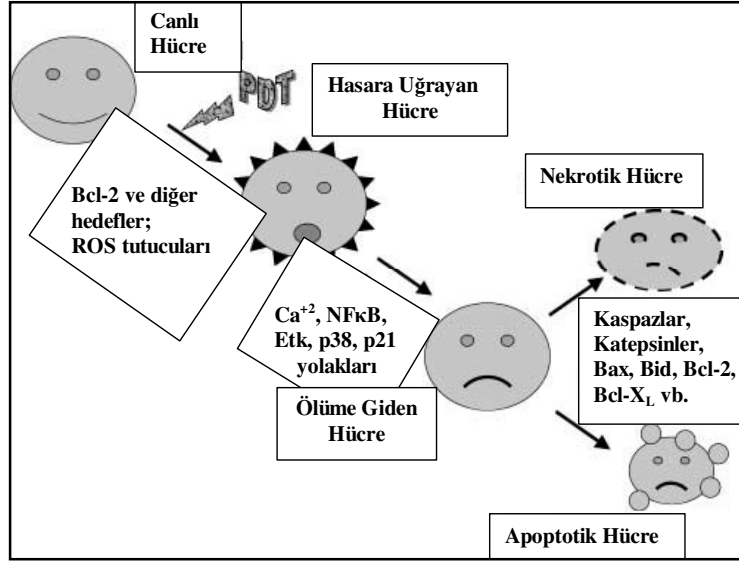
1.5. Fotodinamik Terapi ve Hücre Ölümü

PDT'nin anti-tümör etkisi, doğrudan hücre ölümü, damar yapısının hasara uğraması ve spesifik olmayan bağışıklık sisteminin aktivasyonundan kaynaklanır. PS'nin tümör dokusunda lokalizasyon kabiliyeti, PS'nin verilmesi ve ışınlama arasındaki zaman, tümör dokusunun özellikleri (damar sayısı ve bölgedeki bağışıklık sistemi hücrelerinin sayısı gibi), tümör yıkımının hangi yol ya da yollarla gerçekleşeceğini belirler [80].

PDT'ye hücresel düzeyde verilecek yanıt iç ve dış parametrelere bağlıdır [82]. PS konsantrasyonu, ışık dozu, inkübasyon koşulları gibi faktörler dış parametreleri, hücrenin metabolik özellikleri, dokudaki oksijen düzeyi, hücrenin genotipi, hücre döngüsü fazı gibi faktörler ise iç parametreleri oluşturur. PDT'nin etki mekanizması PS'nin hücre içi lokalizasyonu ile doğrudan ilgilidir [83]. Bunun nedeni PDT'de en etkin foto-ürün olan 1O_2 'nin ömrünün 0,05 μs 'den daha kısa olmasıdır. Yüksek reaktif özelliğinden dolayı 1O_2 , açığa çıktığı bölgeden itibaren sadece 0.02 μm kadar difüz edebilir. Bu nedenle PS'nin hücre içerisindeki lokalizasyonu, hangi organelin öncelikli olarak hasar göreceğini belirler. PS'lerin

çoğunun çekirdek dışında lokalize olması ve O_2 'nin kısa yaşam ömründen dolayı, PDT'nin mutajenik etkisi oldukça düşüktür [80].

PDT ardından hücre ölümü apoptozis, nekrozis ya da kombinasyonu şeklinde ortaya çıkar [82].



Şekil 1.24: PDT tarafından tetiklenen hücre ölümü için öngörülen model. PDT, Bcl-2 gibi moleküler hedeflerde hasar oluşturur. ROS tutucuları gibi faktörler foto-ürünlerin miktar ve dağılımını değiştirirler ve böylelikle meydana gelecek hücre hasarının şiddetini belirlerler. Eğer hasar fazla ise, hücre ölüme gider. Bununla birlikte çeşitli yollar ve hasar tamir mekanizmaları sayesinde hasarların tamir edilebildiği hücreler yaşamaya devam eder. PDT ardından hücre ölümü meydana gelen hasara bağlı olarak apoptozis ya da nekrozis şeklinde ortaya çıkabilir [56].

1.5.1. Fotodinamik Terapide Nekrozis Yolu ile Hücre Ölümü

Pasif hücre ölümü olarak da adlandırılan nekrozis, hipoksi, fiziksel hasar, yüksek sıcaklık, yüksek basınç gibi ekstrem çevresel koşullar ve UV gibi hücre dışı uyaranlar sonucu ortaya çıkabilir. Nekrozisde hücre şişer ve ardından hücre membranının yıkılması sonucunda sitoplazmik içerik doku aralığına salınır. Hücrenin nekrotik artıkları enflamatuvar hücreleri

dokuya çekerek dokunun parçalanmasına ve enflamasyona neden olur [83, 50].

PDT uygulamalarında yüksek enerjili ışık, yüksek konsantrasyonda PS ya da mitokondri dışında lokalize olma eğilimi gösteren PS'ler kullanıldığında ve glukoz yetersizliğinde hücre ölümünün çoğunlukla nekrozis şeklinde olduğu görülmüştür [71].

Mitokondri, diğer organeller ya da stoplazmada lokalize olan PS'lerin aksine, plazma membranında lokalize olan PS'lerin kullanıldığı PDT uygulamalarında, nekrozisin baskın ölüm modelinin olduğu görülmüştür. Membran sisteminde lokalize olan anyonik, lipofilik PS'ler membrandaki kolestrol ve başka doymamış fosfolipidlerin peroksidasyonuna yol açar. Bu durumda membran geçirgenliği ve akışkanlığı bozulur, aminolipid ve polipeptidler arasında çapraz bağlar meydana gelir ve membranla ilgili enzim ve reseptörler inaktive olur. Bu olayları takiben membran transport sisteminin bozulması ve plazma membranının depolarizasyonu, mitokondriyal, sitozolik ve lizozomal enzimlerin inaktivasyonuna neden olur ve sonuçta hücrel hemostazın bozulmasıyla nekrozis ortaya çıkar [83].

1.5.2. Fotodinamik Terapide Apoptozis

Hücre içi ve hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenen ve kontrol edilen apoptozis, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişimin ardından ortaya çıkan apoptotik cisimciklerin makrofajlar ya da çevre hücreler tarafından sindirilir. Apoptozis düzenleme mekanizmalarının bozulması, kanserin de içinde bulunduğu pek çok hastalığa neden olur. Apoptozis düzenleme mekanizmalarının bozulduğu pek çok kanser hücresi normal apoptotik sinyale ya da terapötik muamelelere cevap vermez [8].

PDT apoptozu mitokondri ya da hücre ölüm reseptörleri (death receptors) aracılığı ile tetikleyebilir. Bazı proteinlerin karbonilasyonunun, bahsedilen mekanizmaların tetiklenmesinde öncü rol oynadığı düşünülmektedir [8].

1.5.2.1. Mitokondri Aracılığı ile Apoptozis

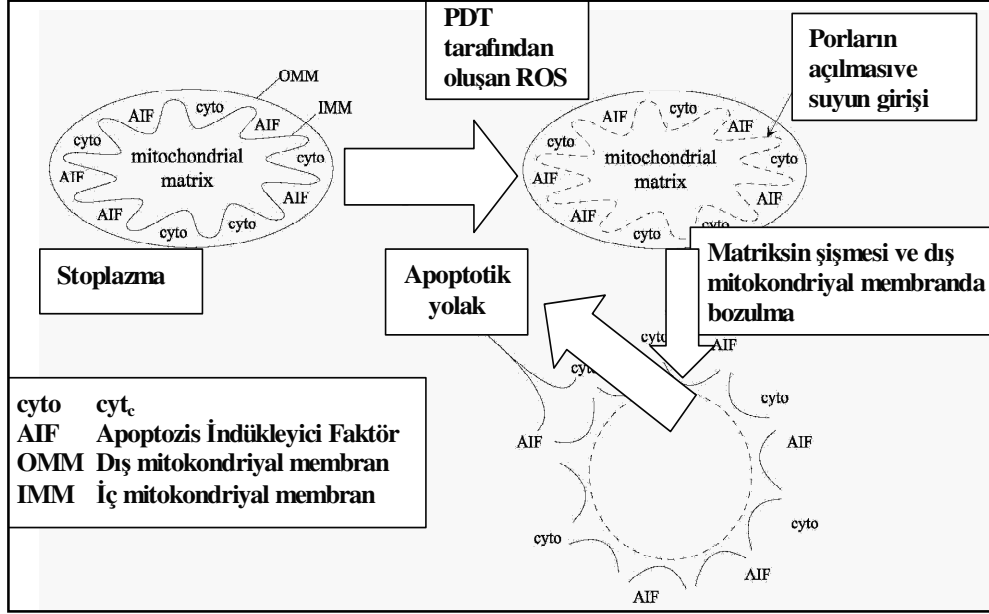
PS mitokondride lokalize olduğunda ya da mitokondri dışındaki hücre içi yapılar PDT etkisine doğrudan maruz kaldığında, hücre mitokondriyal yolla apoptoza gider [84]. Mitokondriyal yolla apoptozda ilk aşama, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve sitozole cyt-c salınmasıdır. cyt-c salımının ardından oluşan apoptozom kompleksi kaspazların aktivasyonuna sebep olur. Bu olaylarda Bcl-2 ailesi proteinlerinin önemli etkisi vardır [56].

Mitokondri ya da stoplazmada oluşan ROS'nin, PDT sonrası ortaya çıkan apoptozisin tetikleyicisi olduğu bilinmektedir. [42]. ROS ile pro-apoptotik proteinlerin salımına neden olan mitokondriyal porların açılması ve apoptozis arasındaki ilişki üzerine pek çok teori ortaya atılmıştır. Bazı deneysel sonuçlar, mitokondriyal membran üzerinde yer alan, "Permeability Transition Pore Complex (PTPC)" denen, geçirgenlik özelliğine sahip büyük kanalların, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasında ve sitozole cyt-c salımında etkili olduğunu göstermiştir. PDT'nin PTPC açılmasında doğrudan etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte bir PTPC alt ünitesi olan "Adenin Nucleotid Translocator (ANT)"ın hedef olduğu düşünülmektedir. -SH gruplarının oksidasyonu, özellikle de sistein aminoasitinin oksidasyonu ile oluşan disülfid köprüleri, ANT'nin 1500 daltondan küçük olan solütler için geçirgenlik spesikliğini kaybetmesine neden olur. Porun geçirgenlik seçiciliğini kaybetmesi sonucu mitokondriyal matriks şişer, iç membran gerilir ve düzleşir, dış membranda kırılmalar meydana gelir ve sonunda sitozole cyt-c salımı gerçekleşir.

Mitokondriyal membran yapısındaki lipidlerin oksidasyonu, membranda hasara neden olur ve mitokondriyal membran potansiyeli düşer. Mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmanın, bir başka PTPC alt ünitesi olan voltaj bağımlı anyon kanalları (Voltage Dependent Anion Channel-VDAC)'nın açılmasına neden olduğu ve sonucunda da cyt-c salımının gerçekleştiği görülmüştür [83, 84].

Mitokondriden sitozole salınan cyt-c, sitozolde Apaf-1 ve prokaspaz-9'a bağlanarak "apoptozom" denen protein kompleksini meydana getirir. Bu kompleks içerisinde prokaspaz-

9, kendi kendini keser ve aktif kaspaz-9 oluşur. Aktif kaspaz-9, prokaspaz-3'ü keserek aktive eder. Pek çok deneysel PDT uygulamasında bir seri kaspazın (kaspaz-2,-3,-6,-7) aktive olduğu gösterilmiştir. Bu hidrolitik enzimlerin aktivasyonu pek çok hücrel proteinin kesilmesine, DNA'nın parçalanmasına ve sonunda hücre ölümüne neden olur [71].



Şekil 1.25: PDT tarafından tetiklendiği öngörülen apoptozis mekanizması. PDT tarafından oluşturulan ROS, mitokondriyal membranda bulunan porların açılmasına neden olur. Osmotik etkiye bağlı olarak mitokondriye su girişi, mitokondriyal matriksin şişmesi, dış mitokondriyal membran yapısının bozulması ve cyt-c, AIF ve prokaspazlar gibi apoptotik moleküllerin stoplazmaya salınmasına neden olur [83].

1.5.2.2. Fotodinamik Terapi ve Endoplazmik Retikulum Hasarı

PDT'nin ardından, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda artış gözlenmiştir. Hücre içi Ca^{+2} 'nin miktarındaki artışın E.R. ya da mitokondride bulunan Ca^{+2} 'nin hücre içine verilmesinden veya dışarıdan hücreye Ca^{+2} 'nin girişinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bir hipoteze göre PDT, E.R.'nin membran yapısını bozarak, depo edilmiş Ca^{+2} 'nin stoplazmaya akmasına neden olur. Bir ikinci mesajcı olarak Ca^{+2} , birçok düzenleyici süreçle ilgili olduğu gibi, hücreyi apoptozize götüren sinyal iletim mekanizması için de gereklidir [83].

1.5.2.3. Fotodinamik Terapi ve Lizozom Hasarı

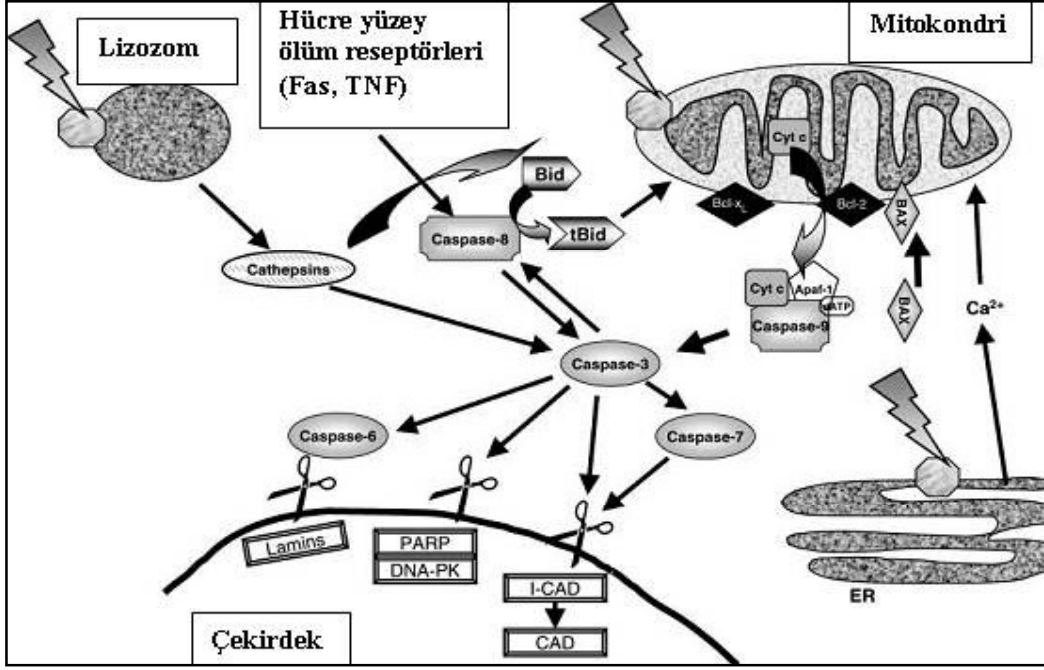
Kullanılan PS hidrofilik özellikteyse, tercihen lizozomlarda birikir. Hasara uğramış lizozomlardan salınan katepsinler, ya doğrudan kaspazları aktive ederek ya da Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik bir protein olan Bid'i parçalayarak apoptozise neden olurlar [83].

1.5.2.4. Fotodinamik Terapi ve Hücre Ölüm Reseptörleri Aracılığı ile Apoptozis

PDT'de kullanılan PS hücre membranına bağlanıyorsa hücre, ölüm reseptörleri vasıtasıyla apoptoza gider. Bu mekanizma TNF reseptör ailesine ait membran reseptörlerinin multimerizasyonu ile başlar. TNF ailesinden Fas reseptörleri, PDT ardından gerçekleşen apoptozda en önemli rolü üstlenir. FasL'nin, Fas reseptörüne bağlanmasıyla, Fas, FADD adaptör proteini ve prokaspaz-8 den meydana gelen kompleks (Death Induced Signalling Complex), prokaspaz-8'in kendini aktive etmesini sağlar. Aktif kaspaz-8, apoptotik yolda görevli diğer kaspazların proteolitik yolla aktivasyonunu başlatır.

PDT'de bu tip apoptoz modeli, çok çeşitli hücre hatlarında çalışılmıştır. A431 hücrelerinde, PDT uygulamasından beş dakika sonra, Fas-FADD kompleksi ve kaspaz-8 aktivasyonunda artış gösterilmiştir. Kaspaz-8'in inhibe edildiği başka bir çalışmada, kaspaz-3 aktivasyonunun ve sitozole cyt-c salımının düştüğünün görülmesi, hücre membranına bağlanan PS'lerin, mitokondriyal apoptozisi de tetikleyebileceğini düşündürmüştür.

PDT ardından hücrelerin TNF aracılığıyla da apoptozise uğradığı bilinmekle beraber, PDT'nin bu yolağı nasıl tetiklediği bilinmemektedir [71].



Şekil 1.26: Hücre yüzey ölüm reseptörleri, mitokondri, lizozomlar ve ER, kaspaazlar ve Bcl-2 ailesi proteinlerini içeren PDT'ye bağı apoptotik yolak [56].

1.6. Servikal Adenokarsinoma ve Mezotelyoma

Tez çalışmasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü tarafından sentezlenen, yeni Pc bileşiklerinin PDT etkinliği HeLa, SPC111 ve SPC212 hücre serileri üzerinde denenmiştir. HeLa hücreleri servikal adenokarsinoma, SPC111 ve SPC212 hücreleri ise malign plevral mezotelyoma (Malignant Pleural Mesothelioma-MPM) kökenli, ölümsüz hücrelerdir.

1.6.1. Servikal Adenokarsinomada Karsinogenez Nedenleri ve Tedavi Yöntemleri

Dişi üreme sisteminin bir parçası olan uterus, abdomenin alt kısmında, mesane ve rektum arasında yer alan, içi boş, armut şekilli bir organdır. Uterusun vajinanın üst kısmı ile birleştiği bölge serviks (rahim ağzı) olarak adlandırılmaktadır [85]. Serviksin dış yüzeyi (ektoserviks), bu dokuyu bakteriler, virüsler, cinsel ilişkinin aşındırıcı etkileri gibi çeşitli dış etkenlere karşı korumakla görevli çok katlı yassı epitel (skuamöz) ile, serviksin iç yüzeyi ise (endoserviks)

salgı yapıcı (glanduler) epitel hücreleri ile döşenmiştir. Skuamöz epitelden köken alan servikal kanserler (rahim ağzı kanseri) skuamöz hücre kanserleri olarak adlandırılır ve serviks kanserlerinin % 85'ini oluşturur. Adenokarsinomalar ise glanduler epitel hücrelerinden ortaya çıkan serviks kanserleridir [86].

Servikal kanser, özellikle az gelişmiş ülkelerde kadın kanserleri arasında en çok ölüme neden olanlar arasındadır. Ülkemizde en sık görülen kanserler arasında yedinci sırada yer alan servikal kanser [87], yumurtalık ve rahim kanserinin ardından en sık görülen üçüncü jinekolojik kanserdir [88]. Türkiye'de sekiz ilde yapılan çok yeni bir çalışmada servikal kanserin görülme sıklığı 100.000'de 3.96 olarak bildirilmiştir [89]. Servikal kanserde erken dönemde ortaya çıkan semptomlar postkoital kanama, asiklik kanama, kanlı ve kötü kokulu akıntı; geç dönemde ortaya çıkan semptomlar ise bacak ve kasık ağrıları, fistüller (serviko-vajinal, veziko-vajinal, serviko-rektal, rekto-vajinal), hidronefroz ve böbrek fonksiyon bozuklukları, alt ekstremitte ödem, anemi, kilo kaybıdır [91]. Servikal displazi veya karsinoma *in situ* durumunda iken teşhis edilen kanserlerde tedavi başarısı yüzde yüze yakındır [92]. Bununla birlikte metastaz durumunda tedavi güçleşir. Serviks etrafında bulunan geniş kan ve lenf damarları ağı ve böbreklerden idrar torbasına ilerleyerek rahim ağzına çok yakından geçen idrar yolları, serviks kanseri hücrelerinin rahim ağzında yerleştikten sonra derinlere doğru ilerleyerek komşu doku ve organlara yayılmasını kolaylaştırır. İlerlemiş olgularda yayılan kanser hücreleri, böbrek ve idrar kanallarında tıkamalar meydana getirerek, böbreklerde anormal genişlemeler (hidronefroz)'e, idrar kanallarında şişme ve genişlemeler (hidroureter)'e neden olur [86].

Servikal kanser gelişiminin pek çok genetik değişikliği gerektirdiği bilinmek ile birlikte, karsinogenez sürecinde insan papilloma virüs (Human Papilloma Virus-HPV)'ün en önemli risk faktörü olduğu düşünülmektedir [94]. Kuşlardan insanlara kadar çok sayıda yüksek omurgalı canlı türünde varlığı saptanan papilloma viruslar içinde yer alan HPV'nin, 100'den fazla tipi bulunduğunu [95] ve bunlar içerisinde 40'dan fazlasının genital bölgede enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir. HPV tip 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 66 ve 68'in servikal epiteli enfekte ettiği ve genital siğillere neden olduğu belirlenmiştir. Gerek hücresel, gerekse moleküler biyolojik çalışmalarla HPV tip 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 59 ve 68'in servikal karsinogenez ile ilgili

olabileceği, özellikle HPV tip 16, 18, 31 ve 45'in yüksek riskli viruslar olduğu gösterilmiştir [94].

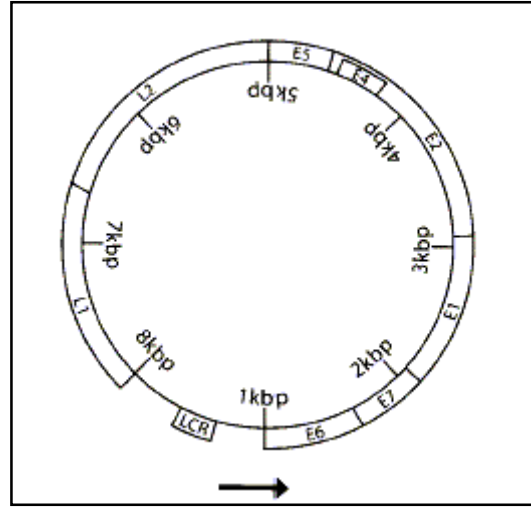
Risk	HPV Genotipleri
Yüksek risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Olası yüksek risk	26, 53, 66
Düşük risk	6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Çizelge 1.5: İnsan papilloma virüslerinin servikal kanserdeki risk derecelerine göre sınıflandırılması [95].

Servikal skuamöz hücre kanserlerinin % 99.7'de HPV'ye rastlanmıştır. Servikal adenokarsinomalarda da HPV'ye rastlanmak ile birlikte, kanserin ortaya çıkmasının yaş ile de bağlantılı olduğu görülmüştür. 40 yaşının altında olup adenokarsinoma taşıyan kadınlar arasından % 89'unun HPV taşıdığı, 60 yaş ve üzerindeki kadınlarda ise bu oranın % 43'e düştüğü belirlenmiştir [96].

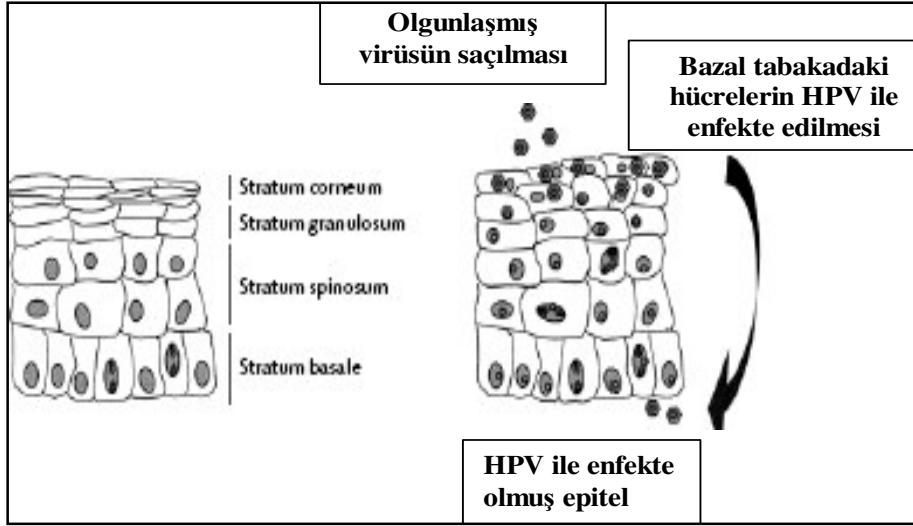
1.6.1.1. İnsan Papilloma Virüs

Papovaviridae ailesinden olan HPV, 55 nm çapında, zarfsız bir virüsdür. 6.500-8.000 baz çiftinden oluşan ve sekiz açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame-ORF) içeren HPV genomu halkasal yapılı, çift zincirli DNA'dan oluşmaktadır. HPV genomu fonksiyonel anlamda üç bölgede incelenebilir. İlk bölge kodlanmayan bölge, uzun kontrol bölgesi (Long Control Region-LCR) veya üst düzenleyici bölge (upper regulatory region) olarak adlandırılır ve 400-1000 bp uzunluğundadır. Yüksek düzeyde çeşitlilik (variance) gösteren bu bölge DNA replikasyonunu ORF'lerin transkripsiyonunu kontrol ederek düzenleyen p97 promotörünü içerir. İkinci bölge replikasyon ve onkogenез için gerekli E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 ORF'leri yer alır. Bu genler erken genler olarak isimlendirilir ve DNA replikasyonu, transkripsiyonun regülasyonu ve hücrel transformasyon ile ilgili proteinleri kodlar. Virusun bulunduğu ancak tam yaşam döngüsünü tamamlayamadığı durumlarda yalnızca erken genlerin transkribe olduğu gözlenmektedir. Üçüncü bölge ise viral kapsül proteinleri olan, yalnızca farklılaşmasını tamamlamış konak hücrede eksprese edilen L1 ve L2 proteinlerini kodlar [94, 96].



Şekil 1.27: İnsan papilloma virüs genomunu. L1, majör kapsid proteinini; L2, minör kapsid proteinini; E1, helikaz ve ATPazı; E2, transkripsiyon düzenleyici proteini; E4, sitokeratini tahrip eden proteini; E5, membrana transforme edici proteini; E6, p53'ü degrade eden ve telomozları aktive eden transforme edici proteinleri; E7, Rb'ye bağlanan ve transformasyona yol açan proteini kodlar. LCR bölgesi uzun kontrol bölgesi olup viral replikasyon ve transkripsiyonu kontrol eden düzenleyici (regülâtör) elementleri taşır [96].

HPV'nin replikasyon döngüsüne epitelin bazal tabakasından girişinden itibaren başladığı var sayılmaktadır. Epidermisin bazal tabakasındaki aşınmaların ya da travmaların HPV ile enfekte olmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir. α_6 -İntegrin epitel hücre reseptörünün HPV 6'nın, hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfatın ise HPV 16 ve HPV 33'ün hücre yüzeyine tutunmasını sağladığı bilinmektedir. HPV genomunun erken servikal lezyonlarda hücresel genoma entegre olmamış formda (epizomal), servikal kanserlerde ise hücresel genoma entegre formda bulunduğu belirlenmiştir. HPV'nin epitel hücreleri içindeki üreme döngüsü dönemlere ayrılır ve bu dönemler epitel hücrenin farklılaşma basamaklarına bağlıdır.



Şekil 1.28: İnsan papilloma virüs enfeksiyonu. HPV'nin replikasyonu enfekte ettiği hücrenin farklılaşma düzeyi ile ilişkilidir. HPV, bazal epitel hücrelerinin enfekte eder ve enfeksiyon erken virüs genlerinin replikasyonuna neden olur. Konak hücre bazal tabakayı terk edip farklılaşma sürecine girdiğinde DNA replikasyonu artar ve geç virüs genleri eksprese edilmeye başlar. Süreç sonunda olgunlaşan virüs parçaları epitelyal yüzeyden dışarı saçılır [97].

Epiteldeki bazal hücrelerde hücresel DNA sentezi ve hücre bölünmesinin tamamlanabilmesi için gerekli koşullar vardır. Bu koşullar HPV için de uygun olduğundan, bazal hücrelerde kalıcı bir viral enfeksiyon oluşabilir. Ancak, bazal hücrelerde virüs kendini konak replikasyon sisteminin kullanarak düşük kopya sayılarında replike eder. HPV enfeksiyonu olan bir hücre bazal tabakadan farklılaşmış epitel hücrelerinin olduğu tabakaya doğru göç ederse, HPV DNA'sını yüksek kopya sayısında replike etmeye ve kapsid proteinlerini sentezlemeye başlar. Konağın transkripsiyon faktörleri HPV genomunun LCR bölgesine bağlanır ve E6 ve E7 gen ürünlerinin transkripsiyonunu başlatır. E6 ve E7 proteinleri konağa ait tümör baskılayıcı proteinlere, siklinlere ve CDK'lara bağlanarak hücre döngüsünü bozar.

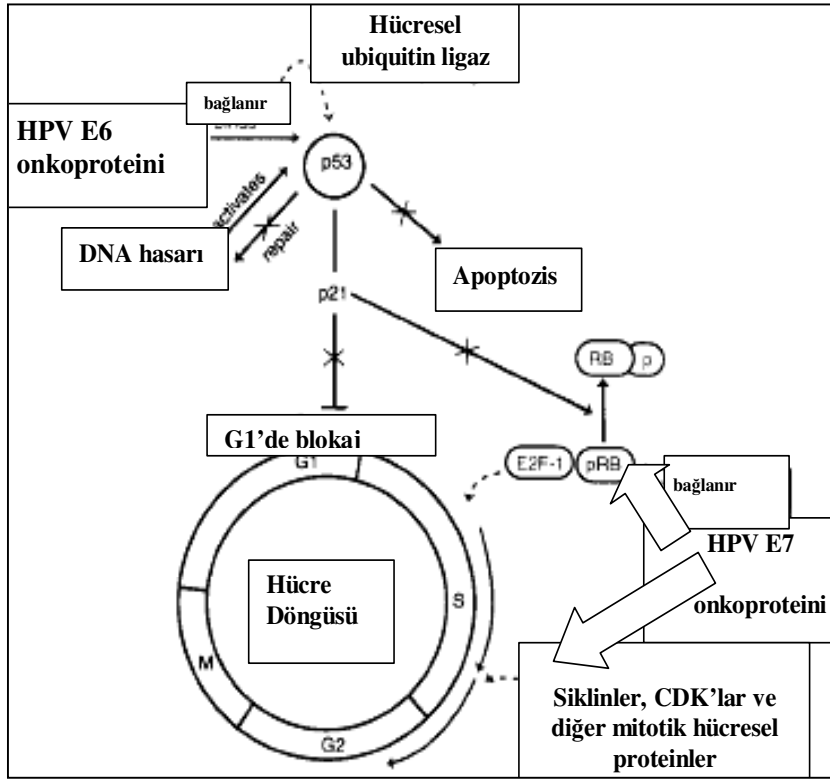
E6, serviks kanserlerinde genellikle mutant olmadığı bilinen p53'e bağlanır ve p53'ü ubiquitin ligaz tarafından parçalanacak hedef molekül haline getirir. Bu degradasyona bağlı olarak p53'ün G1 fazı, apoptozis ve DNA tamirindeki etkisi ortadan kalkmış olur. *In vitro*'da düşük riskli HPV virüslerinin, p53 kararlılığını etkilemediği belirlenmiştir. E7 ise Rb'ye bağlanarak E2F ile kompleks oluşturmasını engeller. Yüksek riskli HPV alt tipleri olan HPV

16 ve 18'de, E7/pRB bağlanması, HPV 6 ve 11'de gerçekleşen E7/RB bağlanmasına kıyasla 5-10 kat daha etkin olarak gerçekleşmektedir ve bu durumun karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir. E7'in Rb'nin yanı sıra siklin E'ye de bağlandığı da bilinmektedir. Bu protein ilişkileri sonucunda ise konakta DNA sentezi ve proliferasyon uyarılmış olur. E5 proteini ise mitojenle aktive olan protein kinaz aktivitesini arttırarak hücrenin büyüme faktörlerine karşı olan hassasiyetini arttırır.

E1'in HPV'nin LCR bölgesinde yer alan replikasyon başlangıcına (origin of replication) bağlanmasını sağlar ve böylelikle virüs kendisini ekstrakromozomal olarak replike etmeye başlar. Bu aşamada transkripsiyon düzeyi düşüktür. E2'ye bağlı olarak azalan E6 ve E7 transkripsiyonu sonucunda ise serbest kalan p53 ve Rb proteinleri normal fonksiyonlarını gerçekleştirebilir ve konak hücre farklılaşma sürecine devam edebilir. L1 ve L2 kapsid proteinlerinin sentezlenmesinin ardından, E4 proteininin vironların hücreden sitolitik özellik oluşturmayan bir süreçle salımına neden olduğu gösterilmiştir. Bazı HPV tiplerinde E4'ün siklin D-CDK2 kompleksinin çekirdekte birikimini engellediği, böylelikle hücre döngüsünün G2 fazında blok oluşturduğu, konak hücrenin mitozu girmesini engellediği de belirlenmiştir. HPV 16 ile enfekte hücrelerde ise E4'ün siklin B-CDK1 kompleksini etkileyerek mitozu önlediği görülmüştür.

Mikroarray analizleri sonucunda HPV 31 ile enfekte olmuş hücrelerde 178 genin ekspresyonunun arttığı, 150 genin ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Ekspresyonun arttığı genler hücre büyümesini düzenleyen genler, keratinosit genleri ve interferona cevap veren genler (interferon-responsive genes) olarak belirlenmiştir. HPV'lerin oluşturduğu benign lezyonlarda HPV DNA'sı konak kromozomuna entegre olmaz iken (epizomal form) neoplazi ve kanserde HPV'nin genelde konak genomuna katıldığı görülmüştür. Konak hücre HPV'nin hem genoma entegre hem de ekstrakromozomal formunu aynı anda taşıyabildiği de belirlenmiştir. HPV konak genomuna katılırken E2 geninde delesyon oluşur ve E2 eksprese edilemez. E2'nin yokluğunda E6 ve E7 ekspresyonu artar. Yüksek risk oluşturan HPV tiplerinde E6 ve E7 sırasıyla p53 ve Rb proteinlerine bağlandığından, konak hücrede artmış proliferasyona ve genom kararsızlığına neden olurlar. Artan proliferasyonla birlikte DNA hasarı birikir ve sonuçta aktive olmuş onkogenler, kromozomal kararsızlık, viral ve hücresel DNA'nın metilasyonu, telomeraz aktivasyonu, hormonal ve immunogenetik faktörler,

transforme olmuş hücreleri oluşturur. Serviks kanserinde oluşum süreci 10-20 yıldır; bununla birlikte bazı lezyonların bir kaç yıl içerisinde kanser oluşturduğu görülmüştür [96, 98, 94].



Şekil 1.29: İnsan papilloma virüsünün patogenezi. E6 ve E7 proteinleri p53 ve Rb proteinlerine bağlanır bu proteinlerin hücre fonksiyonlarını engeller, hücre döngüsü düzenleme mekanizmaları bozulur ve transforme karakter ortaya çıkar [96].

1.6.1.2. Servikal Karsinogenezi Diğer Etkenler ve Genetik Değişimler

Nud (timusu olmayan, bağışıklık sistemi oluşmamış) ve transgenik farelerde yapılan çalışmalar HPV enfeksiyonlarının tek başına servikal karsinogenezi için yeterli olmadığını göstermiştir. HPV ile enfekte kişilerin ancak bir bölümünde kanser gelişmesi ve viral enfeksiyon ile invazif karsinoma gelişimi arasındaki sürenin uzunluğu, kanser gelişimi için virusun tek başına yeterli olmadığını destekler niteliktedir. Bu nedenle HPV enfeksiyonunun serviks kanserinin en erken basamaklarından birisi olduğu ve serviks kanseri gelişiminde ek genetik değişikliklerin de önemli olduğu düşünülmektedir [94].

HPV ile sigara kullanımının sinerjistik etkili olduğu, tütün metabolitlerinin servikal kanser gelişiminde risk faktörü oluşturduğu görülmüştür [98]. Herpes virus (özellikle HSV-2) enfeksiyonlarının da papilloma viruslar ile sinerjistik rol oynayarak servikal karsinom oluşumunu tetiklediği düşünölmektedir. HPV ile enfekte serviks epitelinin malign transformasyonunda bağışıklık sistemi yanıtının da önemli olduğu düşünölmektedir. HIV enfeksiyonu gibi bağışıklık sistemin baskılandığı durumlarda servikal displazi ve invazif kanser riski, bağışıklık sisteminin baskılanma derecesi ile ilişkili olarak arttığı belirlenmiştir. İnsan lökosit antijen (Human Leukocyte Antigen-HLA) genlerindeki polimorfizmlerin de HPV ile ilişkili servikal neoplazi oluşumunda risk faktörü olduğu düşünölmektedir [99, 94].

Skumöz hücreli servikal kanserlerde *p53* mutasyonları nadir olarak görülmüştür. Bunun yanında özellikle ileri evrelerdeki serviks karsinomlarında *myc* onkogeninin amplifikasyonu ve yüksek düzeydeki ekspresyonları üzerinde durulmaktadır. HPV negatif tümörlerde *c-myc*'nin yüksek düzeyde eksprese olmasının metastaz riskini artırdığı belirlenmiştir. Servikal kanserlerde HPV ile ilintili olmayan bazı moleküler düzensizlikler olduğu da bildirilmiştir. *Bcl-1* ve *Bcl-2* gen ekspresyonları ile ilgili çalışmalarda, *Bcl-1*'in yüksek düzeyde ekspresyonu ve amplifikasyonu saptanırken, *Bcl-2*'de yüksek düzeyde ekspresyonun daha çok erken evredeki displazilerde görülmüştür. Artan *Bcl-2* ekspresyonunun malign transformasyonun erken döneminde etkili olabileceği düşünölmektedir [94].

1.6.1.3. Servikal Kanser Tedavisi

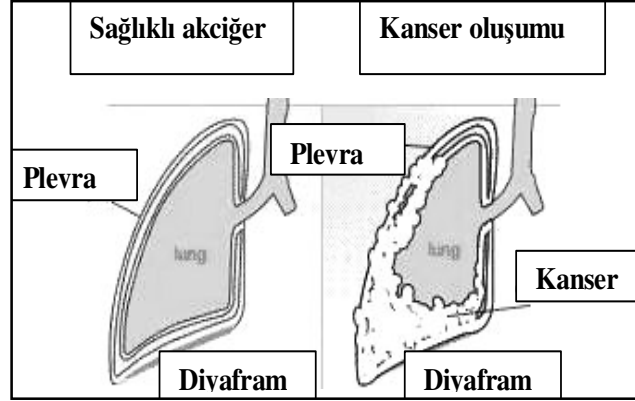
Servikal kanser tedavisinde cerrahi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Kullanılan tedavi yöntemlerinin pek çok dezavantajı vardır. Cerrahi uygulamaların ardından kanamalar ve kramplar gözlenmektedir. Uterusun kaybedildiği durumlarda ise hastalarda psikolojik travmalar ortaya çıkabilmektedir. Radyasyon terapisi ise yoğun bir yorgunluk hissi oluşturmakla beraber saç dökülmesi, ciltte kızarma, kuruma, kaşınma ve gevşemeye neden olur. Şiddetli ve uzun süreli diare ile idrara çıkma sırasında acı hissedilmesi, radyasyon tedavisinin diğer yan etkileridir. Kemoterapi ise kan hücreleri, kıl kökü ve sindirim sistemi hücreleri gibi sıklıkla bölünen hücreleri de etkilediğinden bazı yan etkiler oluşturur. Kemoterapiden etkilenen kan hücreleri, hastanın enfeksiyonlara yatkınlaşmasına, halsizlik hissetmesine ve yaralarında kanama süresinin uzamasına neden olurken, saç kökü

hücrelerinin hasar görmesiyle saçların kaybedilmesi de psikolojik problemler yaratabilir. Sindirim sistemi hücrelerinin kemoterapötiklerce etkilenmesi sonucunda ise kusma, mide bulantısı ve iştahsızlık baş gösterir [85].

1.6.2. Maliganant Plevral Mezotelyomada Karsinogenez Nedenleri ve Tedavi Yöntemleri

Malign mezotelyoma (MM), plevra, perikard (kalp zarı) ve periton (karın zarı)'u döşeyen serozal bir zar olan mezotelyumun primer malign tümörüdür [101]. Tüm mezotelyoma olgularının yaklaşık % 75'i plevra kökenli ve yerleşimlidir; yani göğüs kafesi içinde oluşur [102].

Plevra kökenli tümörlerin difüz ve lokalize formları bulunur. Tek bir bölgeye yerleştiği ve yayılım seyri çok yavaş olduğu için önceleri lokalize mezotelyoma olarak adlandırılan tümör üzerinde yapılan çalışmalar, tümörün mezotel hücrelerinden değil de bu hücrelerin altında yerleşmiş destek dokudan köken aldığı belirlenmiş ve nedensel olarak mezotelyoma ile benzerliği yada ilişkili olmadığı için plövranın fibröz tümörü olarak sınıflandırılmıştır. Fibröz plevra tümörlerinin % 10'u malign, % 90'ı ise beningdir. Malign plevral mezotelyoma (MPM) ise, plevral mezotelyomanın difüz formu olup akciğerleri ve akciğerlerin etrafındaki yapıları döşeyen zar olan plevradan köken alan tümörlere verilen addır [103]. MPM'li hastaların % 90'ında nefes darlığı ve/veya göğüs ağrısı, % 29'unda kilo kaybı, ateş, öksürük, iştahsızlık, % 1'inde hemoptizi (alt solunum yolundan köken alan kanamalar), disfaji (yutma güçlüğü) ve Horner sendromu, % 84'ünde plevral efüzyon (plevral boşlukta sıvı birikmesi) görülmüştür [104].



Şekil 1.30: Plevral mezotelyoma. MPM, plevranın üst yüzeyini döşeyen ve mezotelyum adı verilen ince katmanı oluşturan mezotel hücrelerinden köken alır [105].

Daima malign formda olup nadir görülen MPM, sıklıkla bir çeşit silikat lifi olan asbeste maruziyet sonucu oluşur. Asbest ile MPM arasındaki bağlantı, ilk olarak 1960'da Wagner ve çalışma arkadaşları tarafından bildirilmiştir. MPM vakalarının % 62-85'inde akciğer yerleşimli asbeste rastlanmıştır. Asbeste benzer lifsi yapıda bir mineral olan erionitin de MPM'ye neden olduğu bilinmektedir [106].

Asbestin amfibol ve serpentin lifleri olmak üzere iki formu vardır. Büyük lifler olan serpentin lifleri, geniş hava yollarından daha ileri gidemez iken, ince amfibol lifleri akciğer lenfatikleri içinde dolaşarak interstisyel boşluklar ve subplevral alanlara, hatta peritona taşınabilir. Bahsedilen mineraller ile temas dozu arttıkça ve ilk temasdan sonra geçen süre uzadıkça, MPM riski de artmaktadır. Genel olarak hem asbest hem de erionit için 10 yıldan daha az süreyle temas etmiş kişilerde hastalığın gelişme riski oldukça düşük olarak kabul edilir [107].

Asbest fiberlerinin MM'yi hangi mekanizmalar ile tetiklediği henüz bilinmemektedir ancak karsinojeniteye kimyasal yapıdan çok fiziksel yapının neden olduğu düşünülmektedir. Boy ve en oranı üçe birden fazla olan liflerin karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Doku kültüründe asbestin hidroksil radikallerinin ve süper oksit anyonlarının oluşumu ile DNA zincir kırıkları, delesyon mutasyonları gibi mutasyonlara, kromozom morfolojisinde değişimlere ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını sürecini etkileyerek plödiye neden olduğu gösterilmiştir. Asbest fiberlerinin fagosite edilmesini takiben makrofajların parçalandığı ve makrofaj içerisinde bulunan oksidatif radikallerin hücre dışı ortama salınması

sonucunda da hücre DNA'sında hasarlar oluşturduğu düşünülmektedir. Fiberler tarafından başlatılan bağışıklık sistemi aktivasyonu sonucu üretilen sitokin ve büyüme faktörlerinin ise mezotelyal hücrelerde proliferasyonu tetiklediği bilinmektedir [106].

Yapılan çalışmalarda lif teması olmayan MPM olgularının oranının % 50' ye ulaşması, ayrıca çocukluk çağında da mezotelyoma saptanması, MPM etiolojisinde asbest ve diğer mineral liflerden başka nedenlerin de etkin olabileceğini düşündürmüştür. Simian Virüs 40 (SV40)'ın karsinojenik etkisinin ve bazı kanserlerle olan ilişkisinin saptanmasını takiben yapılan kapsamlı çalışmalarda, bazı insan mezotelyoma hücrelerinde SV40 benzeri genetik diziler gösterilmiştir. Asbest ve erionit mineralleri ve SV40 dışında, etiolojide rol aldığı ciddi biçimde ileri sürülebilecek bir neden henüz gösterilememiştir. Geçmiş hikayesinde mineral lif teması olmayan ve bir başka neden tanımlanamayan, tüm olgular içinde % 10-50 arası bir oranı oluşturan bu olguların bir kısmı için radyoterapi, virus enfeksiyonları, tüberküloz, kimyasal madde teması gibi etmenler neden olarak öne sürülmüş olsa da, bu bilgiler henüz kabul görmemiştir. Sigara içiminin ise tek başına hastalığa neden olmamakla birlikte sigara ile asbest ya da erionitin sinerjik etki gösterdiği düşünülmektedir [107].

1.6.2.1. Malign Plevral Mezotelyoma Karsinogenezinde Etkili Genetik Değişimler

MM'de hücre döngüsünün ilerleyişinin bozulmasına, apoptozisin inhibe olmasına ve onjiyogenez sürecine neden olan pek çok genetik değişim saptanmıştır. Bu değişimler, asbest fiberlerinin mezotelyal hücreler üzerindeki doğrudan etkisinden, hasar oluşan dokudan salınan hormon ve sitokinlerden, viral olarak eksprese edilen proteinlerden ve DNA hasarı sonucunda normal protein fonksiyonlarının kaybından kaynaklanabilmektedir [106].

Mezotelyomada sıklıkla görülen delesyonlardan biri $p16^{INK4a}$ ve $p15^{INK4b}$ CDKI'larını kodlayan 9p21 lokusunda görülür. Aynı lokusta bulunan $p14^{ARF}$ 'in da sıklıkla delesyona uğradığı ve $p16^{INK4a}$ ve $p14^{ARF}$ delesyonlarının genellikle birlikte ortaya çıktığı belirlenmiştir. $p15^{INK4b}$ delesyonun görüldüğü durumlarda $p16^{INK4a}$ delesyonun da görülmesi, ancak bu durumun tersine nadiren rastlanması, 9p21 delesyonunda kritik hedefin $p16^{INK4a}$ olduğunu düşündürmüştür. Mezotelyoma hücreleri, $p16^{INK4a}$ eksprese eden adenovirüsler ile transfekte

edildiğinde Rb'de fosforilasyonun azaldığı, p14^{ARF} eksprese eden adenovirüsler ile transfekte edildiğinde ise p53 ve p21 protein seviyelerinde ve Rb defosforilasyonunda artış olduğu görülmüştür [108].

MPM'de p53 ve Rb mutasyonları nadir görülse de, sırası ile p53 ve Rb'nin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alan p16^{INK4a} ve p14^{ARF} tümör baskılayıcı genlerindeki delesyonlar sıklık ile görülür. p53, G2/M kontrol noktasında bulunan ve bir CDK inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu tetikler. p21'in yüksek düzeyde eksprese olduğu mezotelyomalarda yaşam süresinin arttığı, düşük düzeyde eksprese olduğu hastalarda ise yaşam süresinin azaldığı görülmüştür. Bir başka CDK inhibitörü olan p27'nin ekspresyon düzeyinin de hastada yaşam süresini etkilediği görülmüştür [109].

Tümör proliferasyonunda ve metastazında önemli büyüme faktörlerinden biri olan insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like Growth Factor-IGF)'nün ve SV40'ın mezotelyal hücreyi transforme etmesi için gerekli olan IGF reseptörlerinin mezotelyomada yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir. yeni kan damarlarının oluşumunda önemli olan VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ekspresyonunun da MPM'de yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek VEGF ekspresyonunun SV40 tarafından tetiklendiği öne sürülmektedir. Hücre proliferasyonu ve anjiyogenezde rol alan epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR)'nde de yüksek düzeyde ekspresyon söz konusudur. Anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-X_L ekspresyonlarının da arttığı MPM'de, NF2 ve WT1 tümör baskılayıcı genlerinde mutasyonlar, RASSF1A tümör baskılayıcı geninde ise yüksek düzeyde metilasyon belirlenmiştir [109].

1.6.2.2. Malign Plevral Mezotelyomada Tedavi

MPM tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve bu tedavilerin kombinasyonları kullanılmaktadır [110].

Radyasyon Tedavisi

Malign mezotelyoma genellikle tüm bir hemitoraksı (göğüs boşluğunun yarısını) tutma eğiliminde olduğundan, hemitoraks içindeki özofagus, akciğer ve omurilik gibi yapıların

radasyona karşı olan hassasiyeti, radyasyon tedavisinde uygulanacak dozun sınırlandırılmasını gerektirmektedir. Radyoterapi, genellikle primer tedavi olarak uygulanmamakta, ya cerrahi tedaviye ek olarak verilmekte, ya da semptomatik palyasyon (semptomların hafifletilmesi) amacı ile uygulanmaktadır. Bu amaçla yapılan tedavilerin sağladığı sağ kalım ise 2 yıl için % 17 gibi oldukça düşük orandadır. Genel olarak radyoterapi, MPM'de kür sağlamaktan uzak bir tedavidir. MPM aynı zamanda radyoterapiye karşı dirençli tümörler arasında yer almaktadır [111].

Kemoterapi

Kemoterapide hedeflenen, sitotoksik bir ajan kullanarak tümör hücrelerinin sayısını azaltmaktır. Mezotelyoma tedavisinde çok farklı kemoterapötikler tek başlarına veya kombine halde uygulanmıştır. Tedavide etkili olduğu bildirilen en aktif ajanlar sisplatin, mitomisin, gemsitabin, doksorubisin ve kombinasyonlarıdır. Son zamanlarda pemetreksed (Alimta) de etkili bulunmuştur. Bugün için dünyada en yaygın kullanılan rejim sisplatin ve gemsitabinin birlikte kullanımındır [107].

Tek başına ve cerrahi tedavi öncesi ve sonrası kullanımlarda daha etkili olabilecek yeni ilaçlar için çalışmalar sürdürülmektedir [111].

İmmünoterapi

İmmünoterapide yöntem, vücuda anti-tümör bağışıklık yanıtı geliştirecek bir antijenin verilmesidir. Bu amaçla MPM'de sistemik ve intraplevral uygulamalar denenmiştir. Sistemik uygulamalarda Interleukin-2 (IL-2) ve interferon-gamma (IFN- γ) gibi teorik olarak etkili olması beklenen ajanlar kullanılmış ancak pratikte bu ajanların çok az iyileştirici etki, çok fazla yan etki oluşturduğu görülmüştür [107].

Cerrahi

MPM tedavisinde radyoterapi ve kemoterapinin başarısızlığı, cerrahi tedaviyi ana tedavi basamaklarından biri haline getirmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, yapılan cerrahi tedavi ile tüm tümör hücrelerinin alınmasının olanaksız olduğunu, bu nedenle cerrahi müdahaleye kemoterapi ve radyoterapinin eklenmesi gerektiğini bildirmektedirler [111].

1.7. Konu ile İlgili Çalışmalar

Bu bölümde pek çok farklı PS'nin PDT'deki etkinliğinin HeLa hücreleri üzerinde araştırıldığı *in vitro* çalışmalar ile mezotelyoma üzerine yapılmış klinik öncesi *in vivo* PDT uygulamalarından bahsedilmiştir.

1.7.1. HeLa Hücre Serisinde *in vitro* Fotodinamik Terapi Uygulamaları

Hypocrella bambusae isimli mantardan izole edilen, yağda çözünebilen ve tek başına sitotoksik etki göstermeyen bir PS olan Hipokrelin A (Hypocrellin A-HA) ile yapılan bir çalışmada, 15 μM HA, 16 saat boyunca HeLa hücreleri ile inkübe edilmiş, ardından hücreler 7.2 J/cm^2 enerjiye sahip ışığa maruz bırakılmıştır. PDT'den 20 saat sonra canlı hücre sayısında ancak % 50'lik bir azalma görülmüştür [112].

Bir başka çalışmada *in vivo* uygulamalarda fare tümörlerinde başarılı sonuçlar vermiş, ikinci nesil bir PS olan çinko(II)-Pc (ZnPc) HeLa hücreleri üzerinde denenmiştir. Lipozomların taşıyıcı olarak kullanıldığı *in vitro* PDT denemelerinde, 150 W gücündeki lamba ile donatılmış ışık kaynağı kullanılmıştır. Plak yüzeyindeki ışık gücünün 21 mW/cm^2 olduğu uygulamalarda, 0.1 μM Pc, 1 dakikalık ışık muamelesi sonucunda % 20 oranında (LD_{20}), üç dakikalık ışık uygulaması sonucunda % 60 oranında (LD_{60}) hücre ölümüne neden olmuştur. 5.0 μM Pc ise, onbeş dakikalık kırmızı ışık ($\lambda > 600 \text{ nm}$) uygulaması ardından hücrelerin tümünün öldüğü bildirilmiştir [113].

İkinci nesil PS'lardan olan aliminyum Pc (Aluminium phthalocyanine-AlPc) ve sülfür içeren formu (Aluminium phthalocyanine tetrasulphonate-AlPcS₄)'nun PDT etkinliği HeLa hücreleri üzerinde denendiği, her iki Pc'nin 10 µM'lık konsantrasyonlarının kullanıldığı bir diğer çalışmada, ışık uygulaması lazer ile yapılmış olup, 670 nm dalga boyundaki ışık, enerjisi 0.5 J/cm² olacak şekilde uygulanmıştır. Işık ile muameleden 24 saat sonra, AlPc ile inkübe edilmiş hücrelerde hücre canlılığının % 95 oranında azaldığı, AlPcS₄ kullanıldığında ise hücre canlılığındaki azalmanın % 22 olduğu görülmüştür [114].

Klinik ve deneysel çalışmalarda tümör hücresine yüksek seçiciliği, güçlü fotodinamik etkisi, düşük toksisitesi olduğu görülen ve HpD'ye göre çok daha kısa süreli cilt hassasiyeti oluşturduğu belirlenmiş, Porfirin temelli bir ikinci nesil PS olan mono-metil eter mono-methyl ether (HMME) ile yapılan *in vitro* çalışmada, HeLa hücreleri 10 mg/ml konsantrasyondaki HMME ile 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler lazer ışık kaynağı kullanılarak 510.6 nm dalga boyundaki ışığa maruz bırakılmıştır. Işık enerjisinin 18 J/cm² olacak şekilde uygulandığı çalışmada, ışık ile muameleyi takip eden 24 saat sonunda canlı hücre sayısında % 80 azalma olduğu belirlenmiştir [115].

Hipokrelin B (HB) ve türevi olan 2-bütülamino-2-demetoksi-hipoklerin B (2-BA-2-DMHB)'inin PS olarak kullanıldığı PDT uygulamasında ise ışık enerjisi 24 J/cm² olacak şekilde uygulanmış ve ışık uygulamasını takip eden 20 saat sonunda, HeLa hücrelerindeki canlılık oranı belirlenmiştir. Buna göre, belirtilen ışık enerjisinde 2.0 µM HB'nin % 50 oranında sitotoksikite oluşturduğu, aynı sitotoksik etkinin 2-BA-2-DMHB'nin 0.4 µM'lık konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür [116].

Seçici olarak tümörde konsantre olduğu bilinen, altı flor molekülü içeren bir ZnPc olan ZnFPc, hidrofobik yapılı olup fotodinamik etkisinin oldukça düşük olduğu gösterilmiş bir Pc'dir. Düşük PDT etkinliğinin nedeninin agregasyon (Pc moleküllerinin kümelenmesi) olduğu düşünülmektedir. Agregasyon şartlarını azaltmak amacıyla ZnFPc yapısından iki flor çıkarılmış ve yapının hidrofilik özelliğini arttırmak amacı ile de karboksil grupları eklenmiştir. Işık uygulamasının halojen lamba ile yapıldığı ve ışık enerjisinin 31 J/cm² olduğu çalışmada, bu yeni bileşiğin 1.0 µM'lık konsantrasyonu ile 2 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde, ışık uygulamasından 20 saat sonra HeLa hücrelerinin neredeyse tümünün öldüğü görülmüştür [117].

İkinci nesil bir PS olan Hiperisinin 1.0 μM 'lık konsantrasyonu ile 16 saat boyunca inkübe edilen HeLa hücreleri, inkübasyonun ardından cm^2 'ye düşen ışık enerjisi 4J olacak şekilde ışığa maruz bırakılmıştır. PDT uygulamasından 7 saat sonra, hücrelerin tümünün öldüğü görülmüştür [118].

Bir başka *in vitro* uygulamada ise HeLa hücreleri ikinci nesil bir PS olan ALA (Aminolevulinic acid)'nın 1.0 mM'ı ile 4 saat boyunca inkübe edilmiş, ardından hücreler 635 nm dalga boyunda, 100 J/cm^2 enerjili ışığa maruz bırakılmıştır. PDT uygulamasının ardından 20 saat sonra canlı hücre sayısında % 90 azalma görülmüştür [119].

1.7.2. Malign Plevral Mezotelyomada *in vivo* Fotodinamik Terapi Uygulamaları

Ortalama yaşam süresinin bir yıldan az olduğu MPM'da genel olarak kabul gören bir tedavi standardı yoktur. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları kendi başına yetersiz sonuçlar vermiştir. Kombine tedaviler ise ancak genç yaş, hastalık ve epitelyal tip hücre yapısına sahip olan hastalarda sağ kalıma katkı sağlamaktadır [101].

MPM tedavisinde geleneksel kanser tedavi yöntemlerinin başarısızlığı, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi sonucunu doğurmuştur. Bu tedavilerden biri de PDT'dir [120]. MPM'nin lokalize bir kanser olduğu, PDT'nin de lokal bir tedavi yöntemi olduğu göz önüne alındığında, PDT'nin radyasyon ya da cerrahi uygulamaları ile birlikte kullanılabilceği düşünülmüştür [121].

Fotofrin temelli PDT'nin cerrahi uygulama ile birlikte kullanımında ön veriler, intraploral PDT'nin hastalığın I ve II. evrelerindeki hastalarda yaşama süresini arttırdığı, ancak III. ve IV. evre hastalarında başarılı olmadığını göstermiştir. Fotofrinin cerrahi uygulama ile birlikte kullanımı üzerine başka klinik denemeler de yapılmış ancak sınırlı terapötik etkinin yanı sıra pek çok yan etki görülmüştür. Bu yan etkiler arasında bronchopleural fistula, esophageal perforation ve empyema bulunmaktadır. Birinci nesil bir PS olan Fotofrin ile yapılan

uygulamalar, intraplevral PDT'de kullanılabilecek yeni PS'ların ve PDT tekniklerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir [122].

Hollanda ve Amerika Birleşik Devletleri'nde cerrahi ardından PDT uygulanması temelli çalışmalar, faz I klinik deneme aşamasındadır. Bu denemelerde ikinci nesil bir PS olan meta-tetrahidroksil fenil klorin (m-THPC, Foscan) kullanılmaktadır. HPD türevlerine (Fotofrin) göre doku geçirgenliği ve O₂ verimi yüksek olan Foscan'ın vücuttan uzaklaştırılma süresi ise düşüktür ve Fotofrin'e göre daha kısa süreli cilt hassaslığı yaratır. Foscan ile yapılan klinik öncesi çalışmalarda, dört MPM hastasından üçünde tedaviyi takip eden 9-11 ay süre boyunca tümörün tekrarlamadığı görülmüştür. Dört hastanın ikisinde cilt yanıkları, diaphragmatic rupture ve hemopericardium görülürken, bir hastada tümörün tekrarladığı ve tedavinin ardından 7 hafta sonra da hastanın öldüğü görülmüştür [123].

Foscan ile yapılan bir başka PDT uygulamasında sekiz hastaya 0.3 mg/kg olacak şekilde, cerrahi uygulamadan 48 saat önce Foscan verilmiş ve tümörlü bölgeye 10 J/cm² enerjide, 652 nm dalga boyundaki ışık uygulanmıştır. Tedavi sonunda, biyopsilerde 10 mm derinlikte nekrotik hücreler tespit edilirken, hastalardan biri operasyondan 6 gün sonra contralateral pneumoniyadan dolayı yaşamını yitirdiği, diğer yedi hastada ise 4-18 hafta sonunda metastaz ya da contralateral hastalıkların ortaya çıktığı bildirilmiştir. 0.1 mg/kg dozdaki Foscan'ın, cerrahi operasyondan 4 gün önce verildiği ve 4 günün ardından tümörün 10 J/cm² enerjide, 652 nm dalga boyundaki ışığa maruz bırakıldığı bir diğer PDT uygulamasında ise beş hastanın dördünde tedaviyi takip eden 9-11 ay boyunca tümör tekrarı görülmemiştir. Bir hastada ise tümör tekrarlamıştır [120].

Tez çalışmasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde sentezlenen yeni Pc bileşiklerinin PDT etkinliklerinin, servikal kanser hücreleri olan HeLa hücrelerinde ve mezotelyoma kanser hücreleri olan SPC111 ve SPC212 hücrelerinde tespiti amaçlanmıştır. Yapılan literatür incelemesi sonunda, bazı AlPc ve ZnPc'lerin kullanıldığı PDT uygulamalarının HeLa hücre canlılığında % 90'ın üzerinde azalma meydana getirdiği görülmüştür. Bu anlamda tez çalışmasında kullanılan yeni Pc bileşiklerinin PDT potansiyellerinin değerlendirilmesinde, HeLa hücreleri üzerinde önceden yapılmış olan *in vitro* çalışmalar belirleyicidir. Bununla birlikte literatür taramaları ardından, SPC111 ve SPC212 hücre serilerinde *in vitro* PDT uygulamalarının yapılmamış olduğu belirlenmiştir.

Yeni Pc bileşiklerinin etkinliğinin kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olduğu bilinen mezotelyoma hücrelerinde *in vitro* olarak incelenmesi ve uygulamalarda bir non-coherent ışık kaynağı olan LumaCare Model LC-122'nin kullanılması, tez çalışmasının özgün yönünü oluşturmaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

RPMI-1640 (Gibco, 13018-031), DMEM (Gibco, 12800-116), Fetal Bovin Serum (Gibco, 10108-165), 10X PBS Dulbecco's (Gibco, 14190-094), Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15140-122), 10X Trypsin-EDTA (Sigma, T4049), Dimetil sülfoksit (Sigma, D5879), The CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS Kit, Promega, G3558B), Sodyum bikarbonat (Sigma, S8875), Sodyum klorür (Sigma, S3014), Sodyum asetat (Sigma, S2889), D-glikoz (Merck, 108337), Phenol red (Merck, 107241), Potasyum klorür (Sigma, P5405), ApoStat Intracellular Caspase Detection Kit (RD Systems, FMK012).

2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma), Işık mikroskobu (Otech Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Mettler), 2-200µl Mikro pipetör ve uçları (Gilson), 200µl Multi pipetör (Gilson), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK Ins.), Santrifüj (Beckman coulter microfuge 18, Nüve NF 800), Laminar kabin (HeraSafe), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Flow Sitometri (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences), Buzdolabı (+4°C , -20°C ve -80°C derin dondurucu), Sıvı azot tankı (Union Carbide), Manyetik karıştırıcı (Isolab), Vorteks (VWR), Pipet tabancası, ELISA plakları (Orange), Kültür kapları (Orange, Iwaki), 15 ml ve 50 ml Santrifüj tüpleri (Orange),

Dondurma tüpleri, Petri kapları (Orange), Thoma lamı (Burker-Turk), Enjektör (5-20cc) (Set), Cam pipet ve pastör pipetleri (Iso-Lab), 0.22 µm'lik şırınga filtresi (Schleicher&Schuell), 0.22 µm'lik, 150 ml hacimli vakum filtresi (Milipore), V-şekilli hücre solüsyonu küvetleri (VWR), 1.5ml'lik ependorf tüpleri (VWR).

2.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

1) **10X DMEM:** 13.38 g DMEM üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2) **10X RPMI-1640:** 15.8 g RPMI-1640 üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3) **DMEM Besiyeri için 10X NaHCO₃:** 3.7 g NaHCO₃ üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

4) **RPMI-1640 Besiyeri için 10X NaHCO₃:** 2.43 g NaHCO₃ üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

5) **DMEM Besiyeri:** 50 ml FBS (Fetal Bovin Serum), 50 ml 10X DMEM¹, 50 ml 10X NaHCO₃ (Sodyum bikarbonat)³ ve 5 ml penisilin-streptomisin üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 1 M NaOH⁹ ve % 20 HCl¹⁰ kullanılarak pH 7.2-7.4'e ayarlanmıştır. Besi yeri +4°C'de saklanmıştır.

6) **RPMI-1640 Besiyeri:** 50 ml FBS (Fetal Bovin Serum), 50 ml 10X RPMI-1640², 50 ml 10X NaHCO₃⁴ (Sodyum bikarbonat) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 1 M NaOH⁹ veya % 20 HCl¹⁰. kullanılarak pH 7.2-7.4'e ayarlanmıştır. Besi yeri +4°C'de saklanmıştır.

7) Puck's Salin A Solüsyonu: 0.4 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.5 g D-Glikoz, 0.5 ml Fenol kırmızısı (% 0.5'lik solüsyon) üzerine eklenen steril distile su ile toplam hacim 500 ml'ye tamamlanarak solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilmiştir. 1 M NaOH⁹ ve % 20 HCl¹⁰ kullanılarak pH 7.2'ye ayarlanmıştır ve solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

8) 1X Tripsin-EDTA Solüsyonu: 5 ml, 10X Tripsin-EDTA solüsyonuna 45 ml Puck's salin A solüsyonun⁷ eklenmiş, ardından 1 M NaOH⁹ ve % 20 HCl¹⁰ kullanılarak pH 7.4'e ayarlanmıştır. Enzim solüsyonu +4°C'de saklanmıştır.

9) 1 M NaOH: 4.0 g NaHCO₃ steril distile suda çözülerek toplam hacim 100ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

10) % 20'lik HCl: % 37'lik stok solüsyonu halinde bulunan HCl'den 54 ml alınarak üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilen solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

11) Serumsuz Besiyeri: DMEM serumsuz besiyeri hazırlamak için, 50 ml 10X DMEM¹, 50 ml 10X NaHCO₃³, 5 ml penisilin/streptomisin üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. RPMI-1640 serumsuz besiyeri hazırlamak için ise 50 ml 10X RPMI-1640², 50 ml 10X NaHCO₃⁴, 5 ml penisilin/streptomisin üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Her iki besiyerinin pH'sı 1 M NaOH⁹ ve % 20 HCl¹⁰ kullanılarak 7.2-7.4'e ayarlanmıştır ve besiyerleri +4°C'de saklanmıştır.

12) 1X PBS (Phosphate Buffered Saline): 10X PBS steril distile su ile 1X olacak şekilde seyreltilmiştir. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır

2.2. Yöntem

Bu kısımda HeLa, SPC111 ve SPC212 hücrelerinin kültüründe kullanılan protokoller, hücrelere ait büyüme eğrilerinin oluşturulması, *in vitro* PDT uygulamaları ile PDT'nin

sitotoksik etkisinin ve hücre içine alınma veriminin belirlenmesinde kullanılan yöntemler anlatılmıştır.

2.2.1. Hücre Kültürleri

Yeni sentezlenen Pc bileşiklerinin kullanıldığı *in vitro* PDT uygulamaları ardından sitotoksik etki, HeLa, SPC111 ve SPC212 hücre hatlarında incelenmiştir. SPC111 ve SPC212 hücreleri İsviçre Fribourg Üniversitesi, Histoloji-Embriyoloji Enstitüsü'nden, HeLa hücre hattı ise Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden, tez danışmanı Yrd. Doç. Dr. Nil Saydan aracılığıyla sağlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan, ölümsüz bir hücre serisi olan HeLa, 1951 yılında, 31 yaşında iken servikal kanserden yaşamını yitiren Henrietta Lacks isimli kadından alınmış hücreler ile oluşturulmuştur. HeLa hücre hattı oluşturulmuş ilk epitelyal hücre hattıdır ve 1952 yılından bu yana hücre kültürü çalışmalarında kullanılmaktadır. HeLa hücrelerinde proliferasyon hızı, diğer hücre serileri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Epitelyal olan HeLa hücreleri, hücre kültürü ortamına kolaylıkla adapte olabilen ve kültür ortamında substrata tutunarak büyüyen hücrelerdir [135, 136]. Çoklu kopyalar halinde HPV 18 genomu taşıyan HeLa hücrelerinde sayısal ve yapısal kromozomal anomalilere de rastlanmıştır. 82 kromozoma sahip olan HeLa hücrelerinde dört tane belirteç (marker) kromozom vardır. Bir kopya olarak bulunan M1 belirteç kromozomu kromozom 1'in uzun kolu ve sentromerinden, bir kopya olarak bulunan M2 belirteci kromozom 3'ün kısa kolu ile kromozom 5'in uzun kolundan, 4-5 kopya halinde bulunan M3 belirteci kromozom 5'in kısa kolundan, 2 kopya olarak bulunan M4 belirteci ise kromozom 11'in uzun kolu ile kromozom 19 parçasından oluşmaktadır. HeLa hücrelerinde düşük p53 ekspresyonuna ve normal düzeyde Rb ekspresyonuna rastlanmıştır [135, 137].

Mezotelyal kökenli olan SPC111 ve SPC212 hücre hatları ise heterojen fenotipe sahip olup adherent ve monolayer olarak büyürler. Flow sitometride diploid DNA içeriği gösterirler. SPC111 hücreleri % 5.2 iri polinükleer, % 2.6 küçük sferikal, % 90.4 epitelyal poligonal, % 1.8 epiteloid star biçimlidir. Çoğu homojen tipte ve normal plevral hücre görünümünde olan SPC111 hücrelerinde, epitelyal poligonal morfolojinin karakteristiği

sonucu kümelenmeye eğilim gözlenir. SPC212 hücreleri ise % 7.74 fibroblast benzeri, % 2.11 iri polinükleer, % 3.52 küçük sferikal ve % 86.61 epitelooid yıldız biçimlidirler ve seyrek, monolayer şekilde büyürler [124]. Fenotipik karakterlerinin 2001 yılında belirlendiği SPC111 ve SPC212 hücrelerinin [124] sitogenetik özellikleri konusunda ise detaylı bilgi yoktur.

2.2.1.1. Alt Kültürleme

Pek çok hayvan hücre hattı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyür. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (confluent culture) büyüme önce yavaşlar, sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme (subculturing) yapılması gerekir. Alt kültürleme, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollagenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen dilüsyon yapılarak taze besi yeri içeren yeni kültür kabına (flask, petri kabı vs.) alınır. Yeni kültür kabında hücreler önce substrata tutunur, sonra büyümeye ve bölünmeye başlar. Başlangıçtaki inokulasyon miktarına, kültür koşullarına ve hücre hattına bağlı olan inkübasyon zamanının sonunda kültür, yeniden konfluent hale gelir ve alt kültürleme (pasaj) tekrarlanır [7].

Çalışmada konfluent haldeki kültürler için rutin olarak yapılan alt kültürlemede izlenen protokol şu şekildedir:

- 1) Kültürdeki besi yeri uzaklaştırılır,
- 2) 1X PBS ile yıkama yapılır,
- 3) 1X tripsin-EDTA ile muamele edilen hücreler 37°C, % 5 CO₂ inkübatöründe hücreler yüzeyden ayrılana kadar, 5-10 dakika inkübe edilir,
- 4) Taze besi yeri kullanılarak enzimatik reaksiyon durdurulur ve hücre süspansiyonu falkon tüplere alınır (harvesting; toplama).
- 5) 1000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilir,

- 6) Süpernatant uzaklaştırılır, pellet besi yerinde çözülür ve hücre sayımı yapılır,
- 7) HeLa hücre hattı için DMEM, SPC111 ve SPC212 hücre hatları için RPMI-1640 besi yeri içeren 25 cm² veya 75 cm² lik flasklara, 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapılır ve hücreler % 5 CO₂, % 95 hava içeriğine sahip, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C'de büyütülür.
- 8) Pasajlama 96 saatte bir tekrarlanır.

2.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

2.2.1.1.'inci kısımda bahsedildiği gibi harvest ardından hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, 10⁶ hücre/ml olacak şekilde % 10 DMSO (Dimetil Sülfoksit) içeren besi yerinde süspansiyon edilmiş ve süspansiyon 2.0 ml'lik kriyo tüplere alınmıştır. Hücreler 24 saat boyunca -80°C'da inkübe edilmiş, ardından ilerde çözülerek kullanılmak üzere sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Dondurulmuş hücreleri çözme işlemi ise 37°C su banyosunda yapılmıştır. Çözünmüş haldeki hücre süspansiyonu, besi yeri içeren 25 cm² lik flaska yavaşça, damlatılarak eklenmiş ve kültür % 5 CO₂, % 95 hava içeren, 37°C inkübatöre alınmıştır. Hücrelerin flask yüzeye yapışmasını takiben (yaklaşık 4 saat sonunda) besi yeri değiştirilmiş ve kültür inkübasyona bırakılmıştır. Kültür konfluent hale geçene kadar 96 saat aralıkla besi yere değiştirilmiştir.

2.2.1.3. Hücre Sayımı

Çalışmada, hücre süspansiyonundaki canlı hücrelerin sayısını belirlemek için, harvest ve santrifüj işlemleri ardından elde edilen pellet, besi yerinde süspansiyon edildikten sonra 10 µl alınarak hücre sayım lamına aktarılmıştır. Hücre sayım lamı olarak Burker-Turk kullanılmıştır. Sayım, 0.25 x 0.25 mm boyutundaki karelerde ve her bir sayım çemberi için yapılmıştır. Sayım çemberlerinde yer alan 1mm x 1 mm boyutundaki karelerin hacminin 10⁻⁴ cm³ olduğundan ve bu karelerden on tanesinin sayılmış olduğundan yola çıkılarak, 1.0 ml süspansiyonundaki hücre sayısı şu şekilde hesaplanmıştır [126]: Hücre/ml = Ortalama hücre sayısı x Dilüsyon faktörü x 10⁴ (2.1).

2.2.1.3. Hücre Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

Üç farklı hücre hattına ait büyüme eğrileri, canlı hücrelerin tespitinin kolorimetrik olarak yapıldığı The CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit, bir tetrazolyum bileşiği olan MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium] ve elektron bağlayıcı bir ajan olan PMS (fenazin metosülfat)'yi içerir. Metabolik olarak aktif hücrelerde MTS, dehidrogenaz enzimi ile suda çözünebilen formazan ürününe dönüşür. Formazan ürününün 490 nm'de ölçülen absorbansı, kültürdeki yaşayan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır [127].

Çalışmada her bir hücre hattı için 1×10^3 hücre/100 μ l olacak şekilde 96 kuyulu yedi ayrı plağa üçer kopya olarak ekim yapılmıştır. 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde her bir kuyucuğa 20 μ l MTS eklenmiş ve plaklar 37°C'da, 2 saat inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda oluşan rengin yoğunluğu, Elisa okuyucusunda (ELISA plate reader), 490 nm'de belirlenmiştir. Deneyler her bir hücre hattı için üç kez tekrarlanmış olup büyüme eğrileri, Microsoft Excel programı kullanılarak, 490 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmalarının hesaplanması ile oluşturulmuştur.

2.2.2. *In vitro* Fotodinamik Terapi Uygulamaları

PDT uygulamasında, HeLa, SPC111 ve SPC212 hücreleri değişik konsantrasyonlardaki Pc bileşikleri ile inkübe edilmiş, ardından hücreler, kullanılan Pc'nin aktivasyon dalga boyuna uygun dalga boyuna sahip, farklı enerjilerde görünür ışığa maruz bırakılmıştır. PDT'nin oluşturduğu sitotoksik etki, MTS boya indirgeme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.2.1. Ftalosiyanın ile İnkübasyon

PDT uygulamalarında kullanılan Pc bileşiklerinin kimyasal yapıları şekil 2.1'de, bileşiklerin çözünen maddeleri ve maksimum absorpsiyona sahip oldukları dalga boyları ise çizelge 2.1'de verilmiştir.

Molekül	λ_{\max} (nm, Maksimum Dalga Boyu)	Çözücü
PcA	693	DMSO
PcB	692	DMSO
PcC	682	DMSO
PcD	697	DMSO
PcE	680	dH ₂ O

Çizelge 2.1: Pc moleküllerinin çözen maddeleri ve en yüksek absorpsiyonu verdikleri dalga boyları.

Tez çalışmasında *in vitro* PDT uygulamaları yapılırken, karanlık toksisitesi, 0.5 J, 1.0 J ve 2.0 J enerjiler için olmak üzere dört ayrı 96 kuyulu plak (50x75 mm) kullanılmıştır. Hücre ekimi, plağın bir kuyusunda 1×10^3 hücre/100 μ l besi yeri olacak şekilde, her bir Pc konsantrasyonu ve Pc içermeyen negatif kontroller için üçer kopya olarak yapılmıştır. Hücreler lag fazına geldiğinde Pc bileşiklerinin değişik konsantrasyonları uygulanmıştır. 24 saat boyunca, 37°C'da Pc ile inkübe edilen hücreler, 2.2.2.3.'de belirtildiği şekilde görünür ışığa maruz bırakılmıştır.

Çizelge 2.1'de belirtildiği gibi PcA, B, C ve D bileşiklerinin çözücü maddesi, hücre metabolizması ve hücre membranı üzerindeki hasarları bilinen DMSO (C_2H_6SO)'dur [128]. PDT uygulamalarında DMSO'nun oluşturacağı sitotoksik etkiden kaçınmak amacıyla, HeLa, SPC111 ve SPC212 hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etki oluşturmaya başladığı konsantrasyon belirlenmiştir. Bu amaçla 1×10^3 hücre/100 μ l besi yeri olacak şekilde, 96 kuyulu plaklara, üçlü hücre ekimi yapılmıştır. PDT uygulaması sırasında takip edilen protokole uygunluk göstermek üzere 24 saat inkübasyon sonunda hücreler, % 0.5, % 1.0 ve % 2.0 (v/v)'lik DMSO'ya maruz bırakılmıştır. DMSO uygulanmamış kültür, negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından besi yeri uzaklaştırılmış, 100 μ l 1X PBS ile yıkama yapılmış, PBS'nin uzaklaştırılmasını takiben 100 μ l taze besi yeri eklemesi yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda DMSO'nun proliferasyon üzerindeki etkisi MTS boya indirgeme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir deney üç kez tekrarlanmış, deneylerin ortalamalarının ve standart sapmalarının belirlenmesinin ardından, DMSO konsantrasyonu ve MTS'nin indirgenmesiyle oluşan formazan ürününe ait absorbanslar arasındaki ilişkiye dayalı proliferasyon grafikleri elde edilmiştir.

2.2.2.3. Işık ile Muamele

Pc ile inkübasyonun ardından, Pc'ler için karanlık toksisitesinin araştırıldığı plaklar dışındaki plaklar ayrı ayrı 0.5 J, 1.0 J ve 2.0 J enerjilere sahip görünür ışığa maruz bırakılmıştır. Işık kaynağı olarak LumaCare Model LC-122'nin kullanıldığı uygulamalarda, her bir Pc için, Pc'nin aktivasyon dalga boyuna uygunluk gösteren fiber optik prop (Fiber Optic Probe-FOP) kullanılmıştır. Pc'lere ait maksimum absorpsiyonu veren dalga boyları çizelge 2.1'de yer almaktadır.

Işık kaynağından gelen ışığın güç yoğunluğu (Watt/cm^2), silikon detektöre sahip bir güç ölçer (power metre) olan Ophir xx ile belirlenmiştir. Işık uygulanan yüzeydeki güç, yüzeyin farklı bölgelerinden elde edilen güç değerlerinin ortalamalarının alınmasıyla elde edilmiştir. Yüzeydeki ortalama ışık gücünün belirlenmesinin ardından, $0.5 \text{ J}/\text{cm}^2$, $1.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ ve $2.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ enerji yoğunluğu için hücrelerin ışığa maruz kalacağı süre: $t=P/E$ (2.2) formülüyle hesaplanmıştır. Burada t, zaman (dakika); P, güç (Watt); E ise enerji (Joule-J) dir.

Farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılan hücreler 24 saat boyunca, 37°C 'da inkübe edilmiştir. 2.0 J 'nin üzerindeki enerjilerde, hücreler için optimal büyüme koşullarına ($\% 5 \text{ CO}_2$, 37°C) uygun olmayan ortamda bulunma süresi artacağından, PDT uygulamalarında 2.0 J üzerindeki ışık enerjileri tercih edilmemiştir. Güç yoğunluğu ise oluşabilecek ısınmadan dolayı $100\text{-}300 \text{ mW}/\text{cm}^2$ aralığında tutulmuştur [139]. Çalışmada, her bir FOP için LumaCare firması tarafından tavsiye edilen güç yoğunlukları kullanılmıştır (Çizelge.2.2).



Şekil 2.2: LumaCare Model LC-122. LumaCare Model LC-122, bir non-coherent (lazer olmayan, ışığı doğrusal olarak vermeyen) ışık kaynağıdır. Cihaz, 100W gücünde ışık verebilen kuartz halojen bir lamba, kontrol paneli, güç kaynağı ve $400\text{-}800 \text{ nm}$ dalga boyu aralığındaki ışık için uygun filtreye sahip, değiştirilebilir FOP'lardan oluşmaktadır. FOP'lar ışığın dalga boyuna bağlı olarak $20 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 'den $1.0 \text{ W}/\text{cm}^2$ 'ye kadar güç yoğunluğu sağlayabilmektedir [129].

FOP	Güç yoğunluğu (mW/cm ²)
680±10	225
690±10	200
700±10	200

Çizelge 2.2: PDT uygulamalarında kullanılan güç yoğunlukları [129].

2.2.3. Fotodinamik Terapi Ardından Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Işık uygulanmış hücrelerin 24 saat inkübasyonunu takiben 96 kuyulu plağın hücre ekimi yapılan her bir kuyusuna 20 µl MTS eklenmiş ve plaklar 37°C'da 2 saat inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda oluşan rengin yoğunluğu, Elisa okuyucusunda, 490 nm'de belirlenmiştir.

Her bir Pc ve ışık enerjisi için üçer kez tekrarlanan deneylerde, deneysel verilere ait grafikler Microsoft Excel programı kullanılarak oluşturulmuştur. Pc konsantrasyonuna ve farklı enerji yoğunluğuna bağlı absorbans değişimi grafikleri, 490 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak oluşturulmuştur. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisi ve Pc dozuna bağlı olarak hücre canlılığında azalmanın yüzde olarak ifade edildiği grafiklerde ise sağ kalım, PDT uygulanmış hücrelere ait absorbans değerleri ortalamalarının, Pc ile inkübe edilmemiş ve ışığa maruz bırakılmamış kontrol hücrelerine ait absorbans değerleri ortalamalarına bölünmesi ile elde edilmiştir [115]. Belirli enerjilerdeki ışık ile uyarıldıklarında hücrelerin % 50 ve/veya % 90'ının ölümüne neden olan Pc konsantrasyonlarının (LD=Lethal Dose) belirlenmesinde de sağ kalım grafiklerinden faydalanılmıştır [116].

Tez çalışmasında PDT uygulamalarına ait deneysel verilerin istatistiksel analizi "ANOVA" ve "Independent Samples Student's *t*-test" kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak alınmıştır.

2.2.3. Ftalosiyaninlerin Hücre İçine Alınma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Floresan PS'lerin hücre içine alınma potansiyeli belirlenirken, hücre içi floresan yoğunluğundan faydalanılabileceği bilinmektedir [72]. Çalışmada hücre içi floresan yoğunluğu flow sitometri (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde, HeLa hücreleri 25 cm²'lik flasklara 3x10⁵ hücre/4ml olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından hücre kültürlerine PcA, B, C, D ve E sırası ile 50, 2.0, 15, 50 ve 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde eklenmiştir. Pc ile 24 saat inkübasyonun ardından hücreler harvest edilmiştir. Harvest sonunda elde edilen pellet, 1.0 ml, 1X PBS ile bir kez yıkanmış, yıkama sonunda 500 µl 1X PBS içinde süspansiyon edilip, hafifçe vorteksledikten sonra da hücre içi floresan sinyal, FL3 (fluorescence 3) kanalı kullanılarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak Pc ile inkübe edilmemiş hücre kültürleri kullanılmıştır.

2.2.4. Fotodinamik Terapi Ardından Apoptozis Tayini

Kaspaz özel peptid dizilerine bazı aldehid, nitril ya da keton bileşiklerinin eklenmesi ile oluşturulmuş, kaspaza bağlanarak, apoptozise uğrayan hücrelerde kaspaz aktivasyonunu geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olarak inhibe eden inhibitörler geliştirilmiştir. Florometil keton (FMK) türevi peptidler, kaspaz aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden ve sitotoksik etki oluşturmayan inhibitörlerdir. İnhibitörün floresan bir boya ile (FITC gibi) konjuge edilmesi ise aktif kaspaz enzimine bağlanan hücre içi inhibitörün flow sitometride kısa bir sürede tespitini sağlar [130].

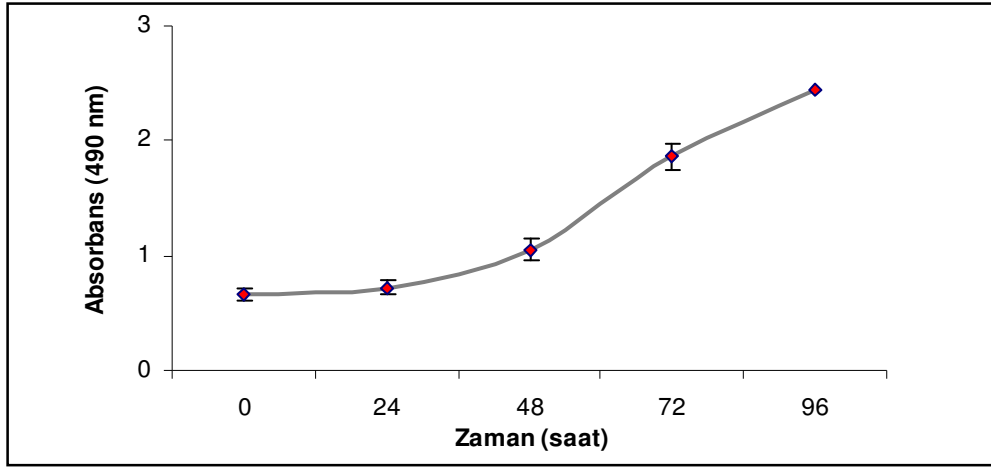
Tez çalışmasında, hücre canlılığı deneylerinde fototoksik etkinliğinin oldukça yüksek olduğu tespit edilen PcB'nin kullanıldığı PDT'nin, HeLa hücrelerinde apoptozisi tetikleme potansiyeli incelenmiştir. Apoptozis tayininde, aktif kaspazın kalitatif ve kantitatif olarak tespitinin flow sitometri ile yapıldığı ApoStat Intracellular Caspase Detection Kit, RD Systems kullanılmıştır. Bu amaç ile, HeLa hücreleri 24 kuyulu üç ayrı plağa 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilen plaklardan ikisine kültürdeki konsantrasyonu 5.0 µM olacak şekilde, eklenmiştir. PcB uygulanmış hücreler 24 saat inkübe edilmiş, 24 saat sonunda hem Pc ile inkübe edilmiş plaklardaki hem de Pc'nin eklenmediği,

negatif kontrol olarak kullanılacak plaktaki besi yeri vakum ile uzaklaştırılmıştır. 1X PBS ile bir kez yıkanan kuyulara 1.0 ml yeni besi yerinin eklenmesinin ardından Pc ile inkübe edilmiş hücreler 1.0 J enerjideki ışığa maruz bırakılmıştır. PDT uygulanmış hücrelerde kaspaz aktivitesi tayini, ışık uygulamasından sonraki 6. ve 24. saatlerde yapılmıştır. 6. ve 24. saat sonunda PDT uygulanmış kültürler ile negatif kontrol olarak kullanılan kültürler 10 µl FITC ile konjuge edilmiş, hücre içine girebilen pan-kaspaz inhibitörü (V-D-FMK) ile boyanmış ve 30 dakika süre ile 37° C'da inkübe edilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon süresinin sonunda besi yerleri 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. 500 µl 1X PBS ile yıkanan hücreler, 500 µl, 1X tripsin-EDTA ile 37°C'da, 5 dakika inkübe edilmiştir. Yüze tutunmuş halde bulunan hücrelerin, apoptozise uğradıktan sonra yüzeyden koparak besiyeri içinde yüzmeye başlamasından yola çıkılarak, tripsin enzimatik reaksiyonunun durdurulmasında 15 ml'lik falkon tüplerindeki besi yerleri kullanılmıştır. Tripsin reaksiyonunun durdurulmasından sonra toplanan hücreler, 15 ml'lik falkon tüplere alınarak, 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, pelletler ise 4.0 ml, 1X PBS'de süspanse edilmiştir. PBS'de süspanse halde bulunan hücreler, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre içi aktif kaspaza bağlanmayarak, hücre dışına çıkan inhibitörün uzaklaştırılması amacı ile süpernatant uzaklaştırılmış, pelletler ise 500 µl, 1X PBS'de süspanse edilerek, flow sitometride analiz edilmek üzere 5.0 ml'lik flow sitometri tüplerine alınmıştır. Flow sitometride (FACSCalibur Flow Cytometer, BD Biosciences) FL1 kanalında toplanan ve kaspaz aktivitesi ile orantılı olan hücre içi floresan sinyali, logaritmik ölçekte olmak üzere, histogramın X ekseninde belirtilirken, hücre sayısı Y ekseninde belirtilmiştir.

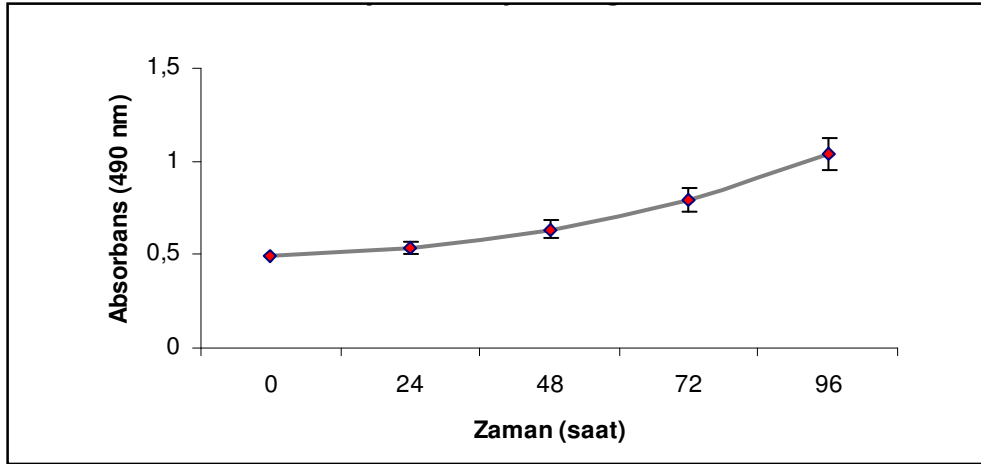
3. BULGULAR

3.1. Hücre Büyüme Eğrileri

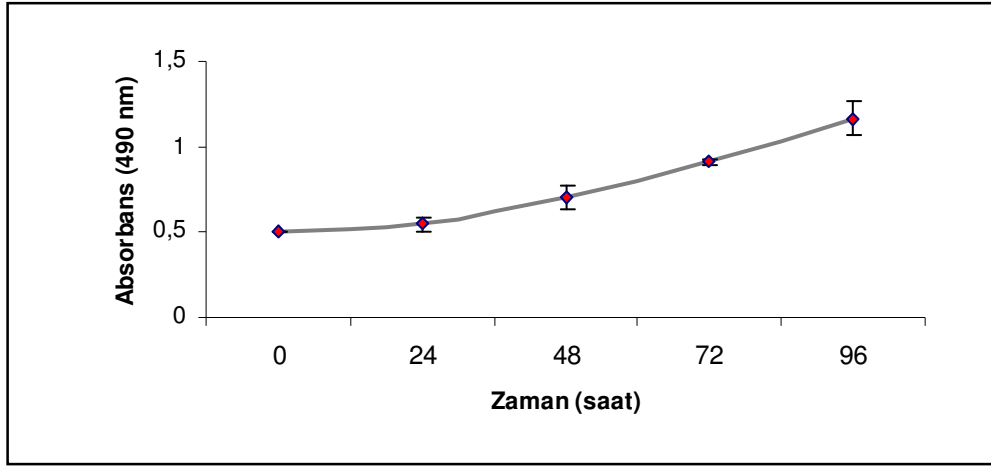
Materyal ve yöntem'in 2.2.1.4. kısmında bahsedildiği gibi, hücre büyüme eğrileri MTS boya indirgeme yöntemiyle belirlenmiştir.



Şekil 3.1: HeLa büyüme eğrisi. Grafikte X ekseninde HeLa hücrelerinin inkübasyon süreleri, Y ekseninde ise belirtilen inkübasyon süreleri sonunda ölçülen absorbans değerleri ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



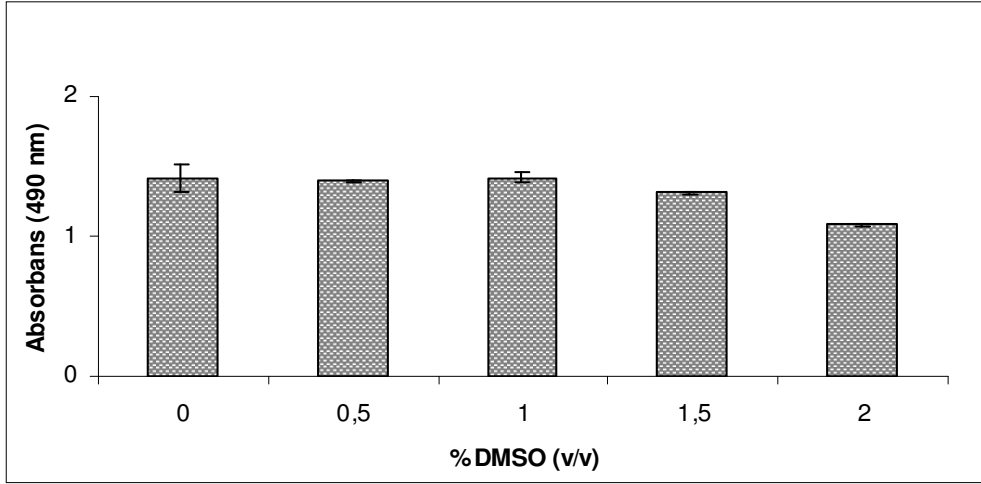
Şekil 3.2: SPC111 büyüme eğrisi. Grafikte X ekseninde SPC 111 hücrelerinin inkübasyon süreleri, Y ekseninde ise belirtilen inkübasyon süreleri sonunda ölçülen absorbans değerleri ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



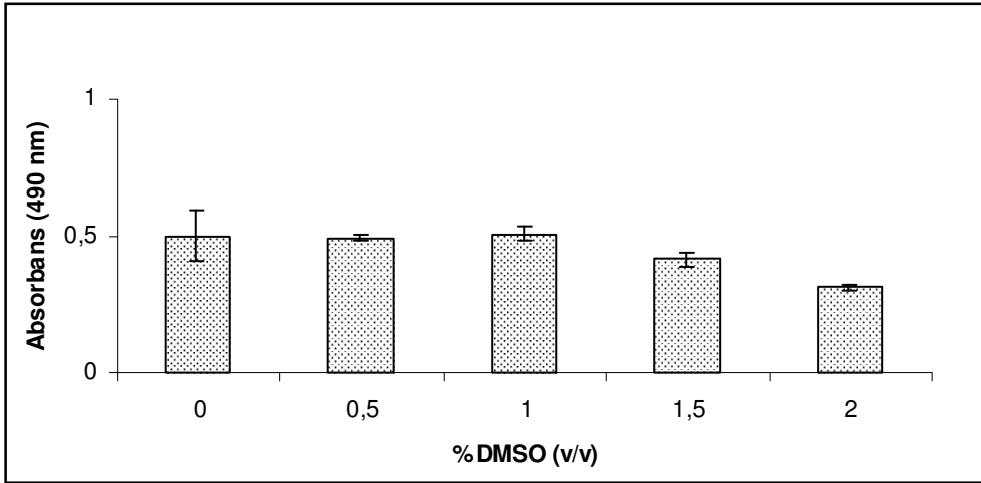
Şekil 3.3: SPC 212 büyüme eğrisi. Grafikte X ekseninde SPC 212 hücrelerinin inkübasyon süreleri, Y ekseninde ise belirtilen inkübasyon süreleri sonunda ölçülen absorbans değerleri ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

3.2. Fotodinamik Terapinin Hücre Canlılığına Etkisi

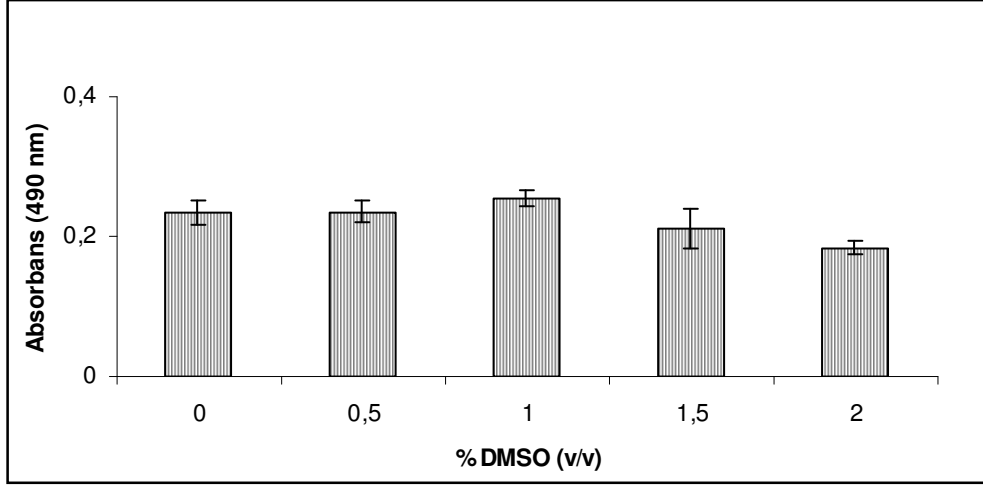
In vitro PDT uygulamalarında kullanılan PcA, B, C ve D bileşikleri, sitotoksik olduğu bilinen [128] DMSO'da çözünmektedir. Pc uygulamasının ardından oluşabilecek DMSO kaynaklı hücre hasarından kaçınmak amacıyla HeLa, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde DMSO'nun sitotoksik etki oluşturmaya başladığı konsantrasyon, 2.2.2.1.'de bahsedildiği şekilde, MTS boya indirgeme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kültürdeki miktarı % 0.5, % 1.0, % 1.5 ve % 2.0(v/v) olan DMSO'nun HeLa, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde, hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTS'in indirgenmesiyle oluşan formazan ürününe ait absorbans değerlerinin, negatif kontrol olarak kullanılan, DMSO ile muamele edilmemiş kültürlerin absorbans değerlerinin istatistiki olarak karşılaştırılması ile elde edilmiştir. Buna göre şekil 3.5, 3.6 ve 3.7'de de görüldüğü üzere HeLa, SPC111 ve SPC 212 hücre serilerinde DMSO'nun sitotoksik etkisi % 1.0 (v/v) üzerindeki konsantrasyonlarda kendini göstermektedir. Bu sitotoksik etkiden dolayı PcA, B, C ve D bileşiklerinin farklı konsantrasyonları için kültürdeki DMSO miktarı v/v olarak hesaplanmış, % 1.0 (v/v)'den yüksek DMSO konsantrasyonu oluşturan Pc konsantrasyonları PDT uygulamalarında kullanılmamıştır. PcE ise suda çözünen bir Pc olduğundan, PcE'nin kullanıldığı PDT'de DMSO'nun sitotoksik etkisinden bahsedilemez.



Şekil 3.4: HeLa hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi. DMSO'nun besiyeri içerisindeki miktarının yüzde olarak X ekseninde ifade edildiği grafikte, absorbans değerleri Y ekseninde yer almaktadır. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



Şekil 3.5: SPC 111 hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi. DMSO'nun besiyeri içerisindeki miktarının yüzde olarak X ekseninde ifade edildiği grafikte, absorbans değerleri Y ekseninde yer almaktadır. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



Şekil 3.6 : SPC 212 hücre serisinde DMSO'nun sitotoksik etkisi. DMSO'nun besiyeri içerisindeki miktarının yüzde olarak X ekseninde ifade edildiği grafikte, absorbans değerleri Y ekseninde yer almaktadır. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

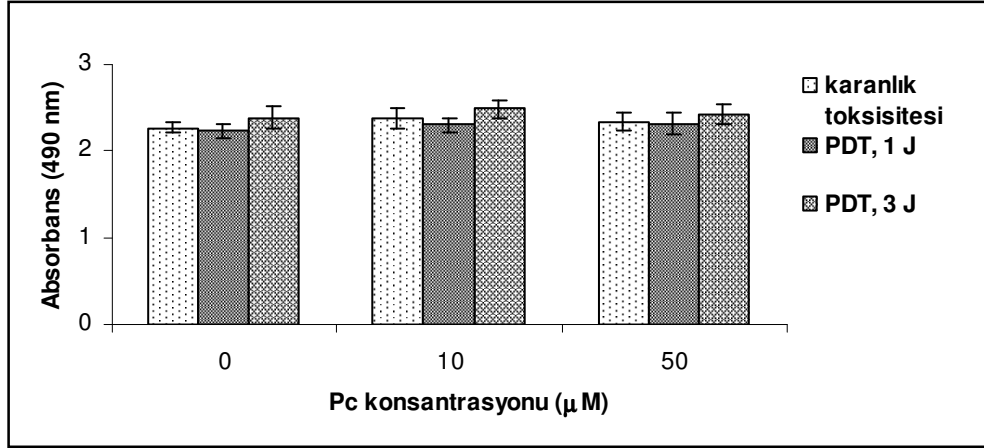
2.2.2.'de bahsedildiği üzere *in vitro* PDT uygulamasında, HeLa, SPC111 ve SPC212 hücreleri değişik konsantrasyonlardaki Pc bileşikleriyle inkübe edilmiştir. 24 saat sonra Pc'ler için karanlık toksisitesinin araştırıldığı kültürler dışındaki kültürler, kullanılan Pc'nin aktivasyon dalga boyuna uygun dalga boyundaki, 0,5, 1,0 ve 2,0 J enerjideki görünür ışığa maruz bırakılmıştır. PDT'nin oluşturduğu sitotoksik etki, MTS boyası indirgeme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.1. PcD ve PcE'nin Fototoksik Etkileri

PcD ve PcE, karanlık toksisite göstermedikleri gibi fototoksik etki de oluşturmamıştır (Şekil 3.7 ve 3.8)

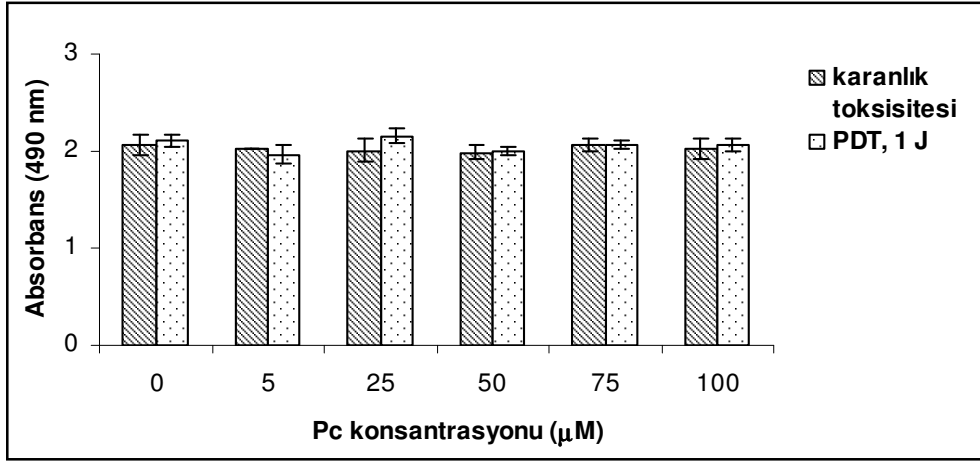
Şekil 3.7'de de görüldüğü gibi, karanlık toksisitesinin araştırıldığı kültürlerde 0, 10 ve 50 μM PcD konsantrasyonları, HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etki yaratmamaktadır ($p=0.33$). PcD'nin 0, 10 ve 50 μM 'lık konsantrasyonları ile 1,0 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılmış kültürlerle ait absorbans değerleri arasında istatistiksel anlamlılık olmadığı gibi ($p=0.68$), bu değerler ile 0, 10 ve 50 μM 'lık PcD uygulanmış karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri arasında da istatistiksel anlamlılık yoktur ($p=0.48$). PcD'nin 0, 10 ve 50

μM 'lık konsantrasyonları ile 3.0 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılan kültürlerin absorbans değerleri arasında ($p=0.50$) ve bu değerler ile karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri arasında da ($p=0.09$) istatistiki anlamlılık görülmemiştir. PcD'nin bahsedilen konsantrasyonları ile 1.0 J ve 3.0 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılan kültürler arasında da hücre sitotoksitesi anlamında istatistiki bir farklılık yoktur ($p=0.83$).



Şekil 3.7: PcD kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi. PcD'nin HeLa hücreleri üzerinde canlılığa etkisi olmadığı görülmektedir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

Proliferasyon deneyleri sonuçlarına göre, suda çözünen Pce'nin 96 kuyuluk plakların 200 μl 'lık kuyu hacmine bağlı olarak kullanılacak en yüksek miktarı olan 100 μM 'lık konsantrasyonu ile 690 ± 10 nm dalga boyunda, 2.0 J'lik enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT de HeLa hücrelerinde sitotoksik etki oluşturmamıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: PcE kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi. PcE karanlıkta sitotoksik etki oluşturmadığı gibi ışığa bağlı fototoksik etki de yaratmamıştır. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

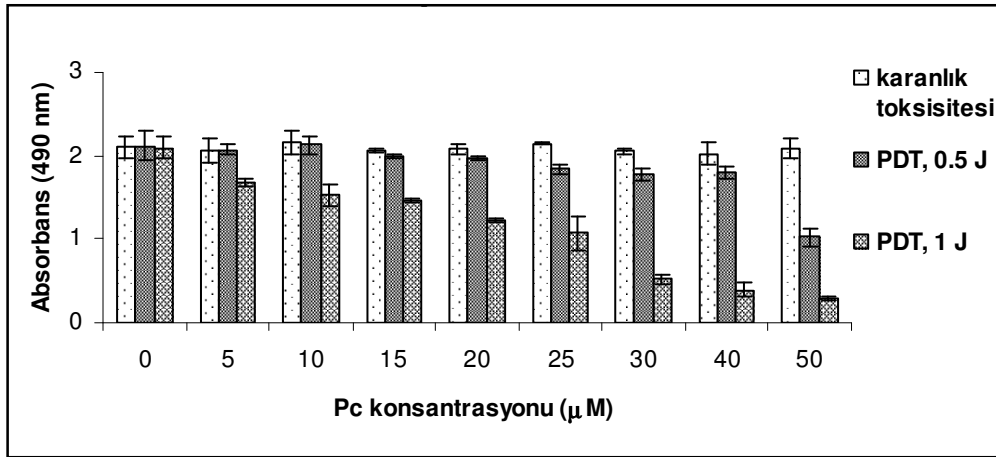
3.2.2. PcA'nın Fototoksik Etkisi

Çalışmada HeLa hücreleri farklı PcA konsantrasyonlarına ve 690 ± 10 nm dalga boyunda, 0.5, 1.0 ve 2.0 J enerjideki ışığa maruz bırakılmıştır. Şekil 3.9'da, PcA kullanılan PDT'nin Pc konsantrasyonu ve ışık enerjisine bağlı olarak HeLa hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi görülmektedir.

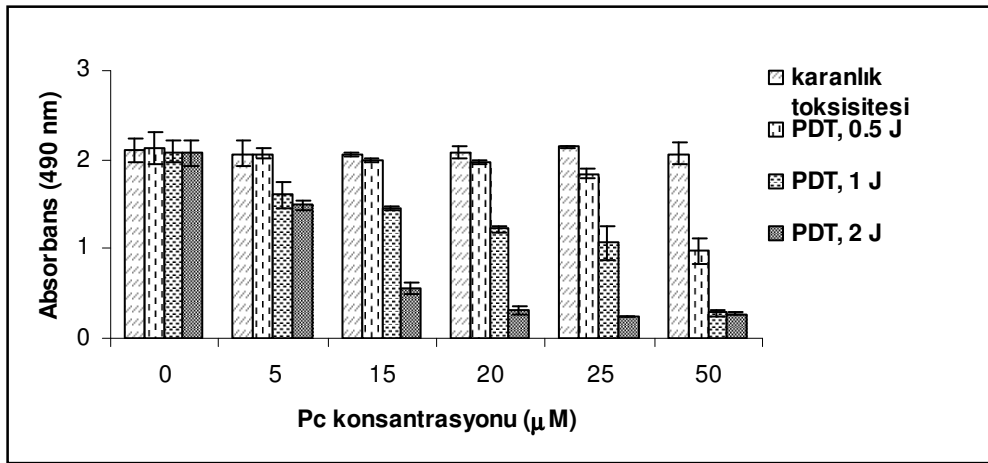
Artan PcA konsantrasyonuna rağmen, karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri arasında istatistiki anlamlılık olmaması ($p=0.65$), PcA'nın karanlıkta sitotoksik etki oluşturmadığını göstermektedir. Farklı PcA konsantrasyonları ve 0.5 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılmış kültürler ile karanlık toksisitesinin araştırıldığı kültürlerle ait absorbans değerleri karşılaştırıldığında, 25 μM 'lık konsantrasyonda istatistiki anlamlılık saptanmıştır (5.0 μM için $p=1.00$, 10 μM için $p=1.00$, 15 μM için $p=1.00$, 20 μM için $p=0.345$, 25 μM için $p<0.001$, 30 μM için $p<0.001$, 40 μM için $p=0.05$ ve 50 μM için $p<0.001$).

PDT'nin 1.0 J enerji ile uygulandığı deneylerde elde edilen absorbans değerleri, karanlık toksisitesine ve 0.5 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarına ait absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında ise, fototoksik etkinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptanmıştır ($p<0.001$).

PcA ile inkübe edilmiş ve 2.0 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılmış kültürlerin absorbans değerleri, karanlık toksisitesini oluşturan deney grubunun absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında, 5.0 μM 'dan sonraki PcA konsantrasyonlarında sitotoksik etkinin, artan PcA konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Ancak buradaki artış, 25 μM 'dan sonra anlamsızdır; başka bir deyiş ile 2.0 J enerjili ışık ile 25 μM PcA ve 2.0 J enerjili ışık ile 50 μM PcA konsantrasyonunun oluşturduğu sitotoksik etki arasında istatistiki anlamlılık yoktur ($p=0.80$). 2.0 J ve 1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamaları karşılaştırıldığında ise, 5.0 ve 50 μM PcA'nın her iki enerjide de aynı oranda fototoksik etki yarattığı (5.0 ve 50 μM için p değerleri sırası ile 0.80 ve 1.00'dir), 5.0 ile 50 μM arasındaki konsantrasyonlarda fototoksik etkinin, ışık enerjisi ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$). 2.0 J ve 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamaları için de sitotoksitenin, artan ışık enerjisi ve artan PcA konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı söylenebilir ($p<0.001$).



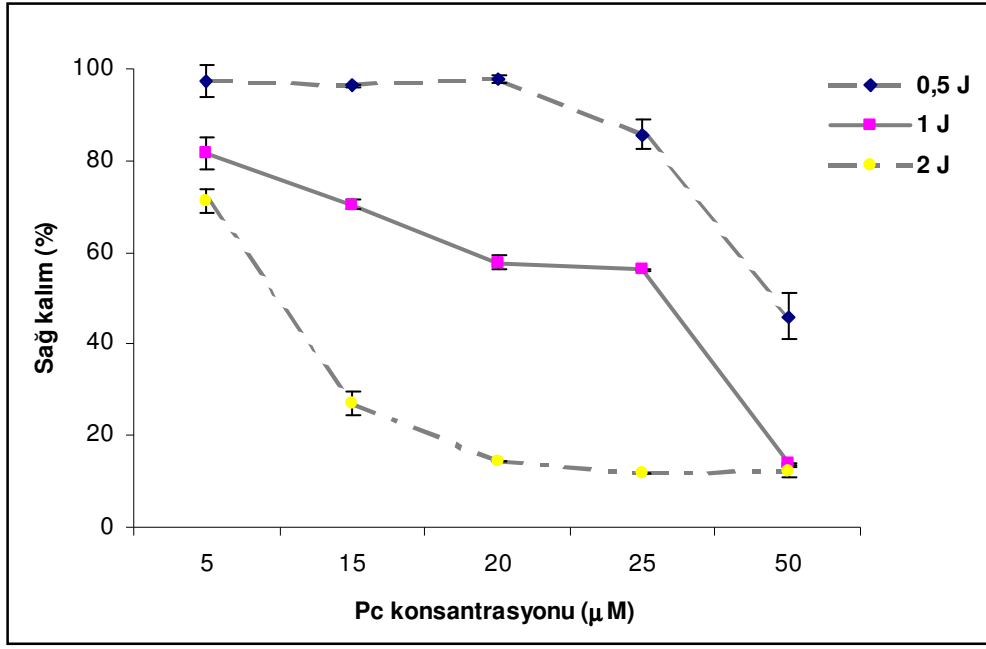
(a)



(b)

Şekil 3.9: PcA kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi. (a) Farklı PcA konsantrasyonları ile 0.5 ve 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. (b) Farklı PcA konsantrasyonları ile 0.5, 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

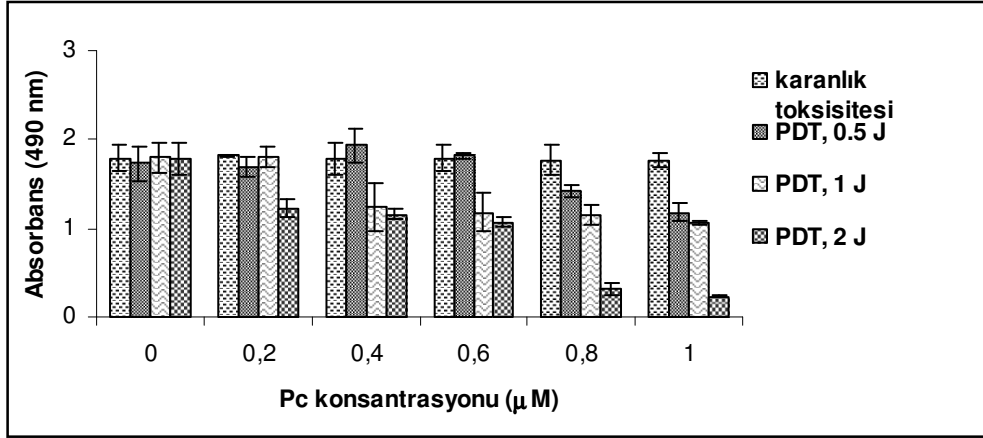
Şekil 3.10'da PcA'nın kullanıldığı PDT uygulamasına ait hücre sağ kalım grafiği görülmektedir. Grafikte, 1.0 J için LD₉₀'ın 50 µM, 2.0 J için LD₉₀'ın 25 µM PcA olduğu görülmektedir. Başka bir deyişle 50 µM PcA ile 1.0 J enerjili ışık veya 25 µM PcA ile 2.0 J enerjili ışık birlikte kullanıldığında hücrelerin % 90'ının ölümüne neden olmaktadır. 0.5 J enerjide ışık kullanıldığında ise, 50 µM PcA'nın HeLa hücrelerinin % 50'sinin canlılığını kaybetmesine neden olduğu görülmektedir. Buna göre 50 µM PcA'nın, 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'de LD₅₀ olduğu söylenebilir.



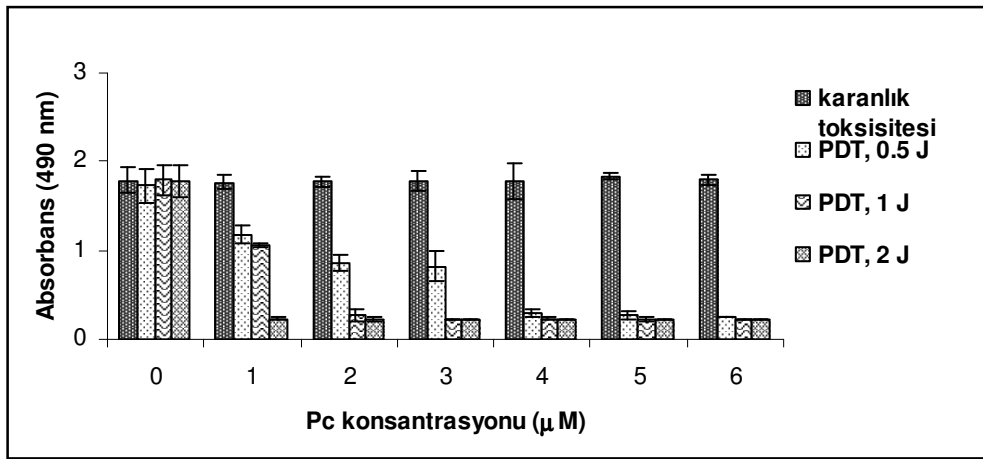
Şekil 3.10: Artan PcA konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisine ve Pc konsantrasyonuna (X eksen) bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma yüzde olarak (Y eksen) ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

3.2.3. PcB'nin Fototoksik Etkisi

PcB'nin fototoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla HeLa hücreleri PcB'nin değişik konsantrasyonu ile inkübe edilmiş, ardından 690 ± 10 nm dalga boyunda, 0.5, 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışığa maruz bırakılmıştır. Şekil 3.12'de PcB kullanılarak PDT'nin HeLa hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi görülmektedir.



(a)



Şekil 3.11: PcB kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi. (a) 0-1.0 µM aralığında artan PcB konsantrasyonunun HeLa hücrelerinde fototoksik etkisi. (b) 0-6 µM aralığında artan PcB konsantrasyonunun HeLa hücrelerinde fototoksik etkisi.

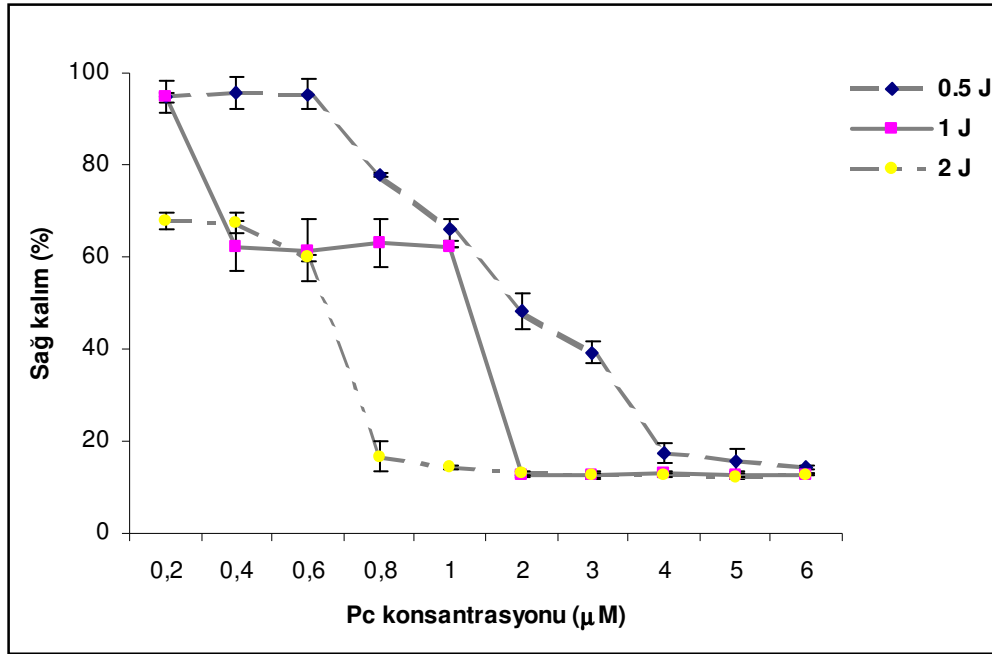
Şekil 3.11'de de görüldüğü gibi PcB, karanlıkta sitotoksik etki oluşturmamaktadır ($p=0.99$). 0.5 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT sonrası elde edilen absorbans değerleri, karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.00 µM PcB konsantrasyonları için p değerleri sırası ile 1.00, 0.63, 1.00, 0.037 ve 0.004'tür; buna göre sitotoksik etkinin 0.8 µM'dan itibaren başladığı söylenebilir. 0.5 J ışık enerjisinde, 0.8 µM'dan 4.0 µM'a kadar, artan PcB konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etkinin de arttığı (0.8 µM ve 1.0 µM PcB uygulanmış kültürler için $p=0.027$ 'dir) görülmüş, 4.0, 5.0 ve 6.0 µM'lık PcB konsantrasyonunun oluşturduğu fototoksik etkiler arasında ise istatistiki anlamlılık bulunmamıştır (4.0 µM ve 5.0 µM'lık konsantrasyonlar için $p=0.85$, 4.0 µM ve 6.0

μM 'lık konsantrasyonlar için $p=0.402$ ve $5.0 \mu\text{M}$ ve $6.0 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar için $p=0.816$ 'dur).

0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1.00 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarda PcB ve 1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT ardından elde edilen absorbans değerleri karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında, sitotoksik etkinin $0.2 \mu\text{M}$ 'dan sonra başladığı belirlenmiştir ($0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ ve $1.00 \mu\text{M}$ 'lık PcB konsantrasyonlarını için p değerleri sırası ile $1.00, 0.008, 0.002, 0.003$ ve <0.001 'dir). $2.0 \mu\text{M}$ 'dan itibaren ise artan Pc konsantrasyonuna rağmen sitotoksik etkiye artış görülmemiştir ($2.0 \mu\text{M}$ ve $4.0 \mu\text{M}$ arasında $p=0.84$, $2.0 \mu\text{M}$ ve $5.0 \mu\text{M}$ arasında $p=0.89$, $2.0 \mu\text{M}$ ve $6.0 \mu\text{M}$ arasında $p=0.77$). 1.0 J ve 0.5 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT ardından kültürlerle ait absorbans değerleri karşılaştırıldığında, $0.2-4.0 \mu\text{M}$ arasındaki PcB konsantrasyonları için sitotoksik etkinin ışık enerjisine ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı ($0.4, 0.6, 0.8$ ve $1.0 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar için p değerleri sırası ile $0.005, 0.001, 0.004$ ve 0.038 'dir.), $4.0 \mu\text{M}$ ve sonraki konsantrasyonlar için ise artan ışık enerjisine rağmen sitotoksik etkinin istatistiksel anlamda değişmediği belirlenmiştir ($4.0, 5.0$ ve $6.0 \mu\text{M}$ konsantrasyon için p değerleri sırası ile $0.11, 0.99$ ve 0.40 'tır.). 1.0 J ve $2.0 \mu\text{M}$ PcB ile 0.5 J ve $4.0 \mu\text{M}$ PcB'nin, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri arasında da istatistiksel farklılık görülmemiştir ($p=0.40$).

Karanlık toksisitesine ait absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamasında, $0.2 \mu\text{M}$ PcB konsantrasyonundan itibaren sitotoksik etkinin başladığı görülmüştür ($p<0.001$). $0.8 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyona kadar, artan konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin de arttığı ($p<0.001$), $0.8 \mu\text{M}$ ve üzerindeki konsantrasyonların ise istatistiksel anlamda aynı sitotoksik etkiyi yarattığı görülmüştür (0.8 ve $1.0 \mu\text{M}$ PcB için $p=0.93$, $1.0 \mu\text{M}$ 'ın üzerindeki konsantrasyonlar için $p=1.00$ 'dir). 0.4 ve $0.6 \mu\text{M}$ PcB'nin, 2.0 J ve 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında aynı sitotoksik etkiyi oluşturduğu ($0.4 \mu\text{M}$ için $p=1.00$, $0.6 \mu\text{M}$ için $p=0.99$), 0.8 ve $1.0 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar için ise fototoksik etkinin ışık enerjisine bağlı olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$). $1.0 \mu\text{M}$ 'dan sonraki konsantrasyonlar için 2.0 J ve 1.0 J enerjiye sahip ışığın oluşturduğu sitotoksik etkiler arasında istatistiksel anlamlılık yoktur ($p=1.00$). 0.5 J ve 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında ise $4.0 \mu\text{M}$ ve üzerindeki PcB konsantrasyonlarında elde edilen absorbans değerleri arasında istatistiksel fark yok iken ($4.0, 5.0$ ve $6.0 \mu\text{M}$ için p değerleri sırası ile $0.14, 0.99$ ve 0.68 'dir), $4.0 \mu\text{M}$ 'ın altındaki konsantrasyonlar için

sitotoksitenin, artan ışık enerjisi ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı (her bir konsantrasyon için $p < 0.001$) söylenebilir.

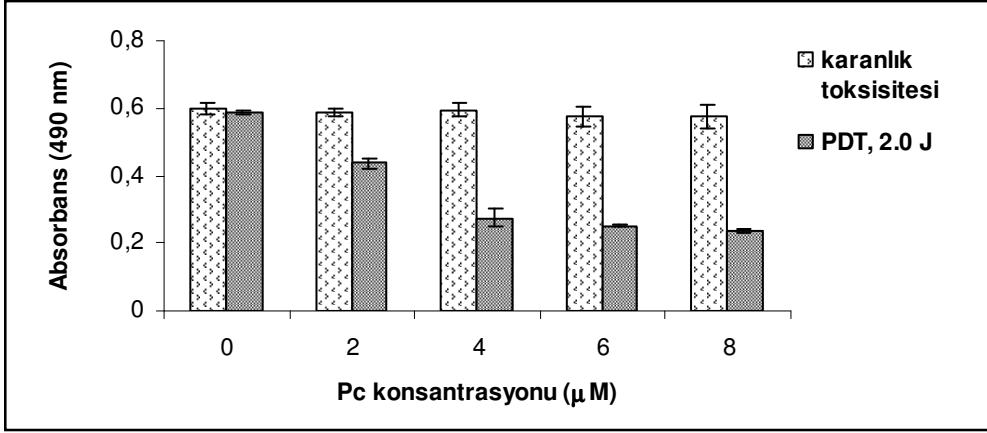


Şekil 3.12: Artan PcB konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisine ve Pc konsantrasyonuna (X eksen) bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma yüzde olarak (Y eksen) ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

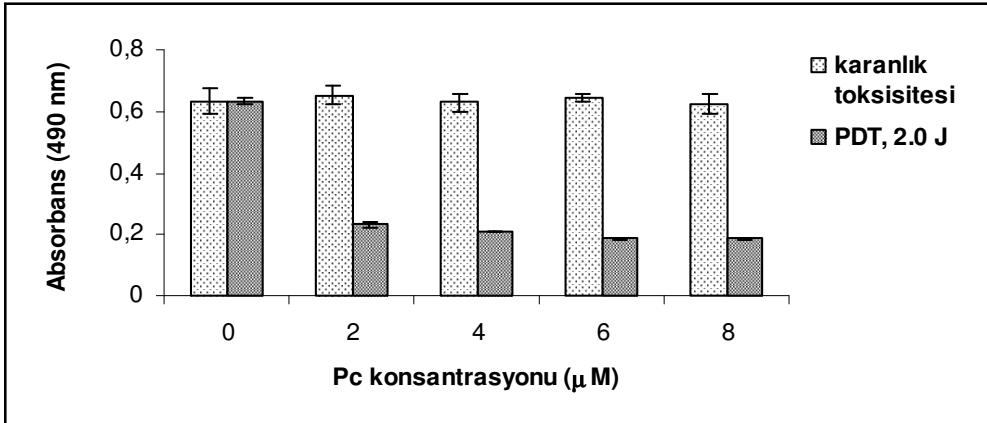
Şekil 3.12'deki sağ kalım eğrisine bakıldığında ise, 2.0 J enerjideki ışıkta 1.0 µM ve üzerindeki PcB konsantrasyonlarının, 1.0 J enerjideki ışıkta 2.0 µM ve üzerindeki PcB konsantrasyonlarının, 0.5 J enerjideki ışıkta ise 4.0 µM ve üzerindeki PcB konsantrasyonlarının LD₉₀ olduğu söylenebilir. PcB'nin 2.0 µM'lık konsantrasyonunun ise 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında LD₅₀ olduğu görülmektedir.

Şekil 3.13 ve 3.14'de PcB ve 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'nin sırası ile SPC111, ve SPC212 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi görülmektedir. SPC111 hücrelerinde 4.0 µM ve 6.0 µM PcB için $p=0.014$, 6.0 µM ve 8.0 µM PcB için ise $p=0.155$ 'tir. Sağ kalım eğrisinde de görülebileceği gibi (Şekil 3.15) 6.0 µM ve 8.0 µM PcB, 2.0 J ışık ile birlikte kullanıldığında SPC111 hücrelerinin ancak % 60'ı ölmüştür. SPC212 hücrelerinde ise 6.0 µM'dan düşük Pc konsantrasyonları için $p < 0.001$ iken, 6.0 µM ve 8.0 µM PcB konsantrasyonları arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p=1.00$). 2.0 J enerjili ışık

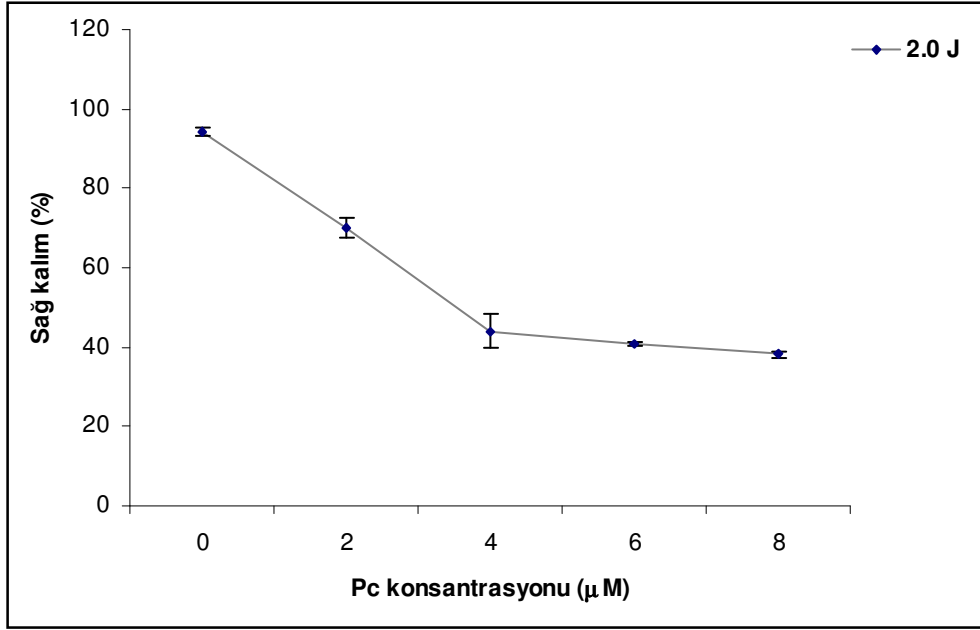
kullanıldığında 6.0 μM ve 8.0 μM PcB, SPC212 hücrelerinin % 70'inin canlılığını kaybetmesine neden olmuştur (Şekil 3.16).



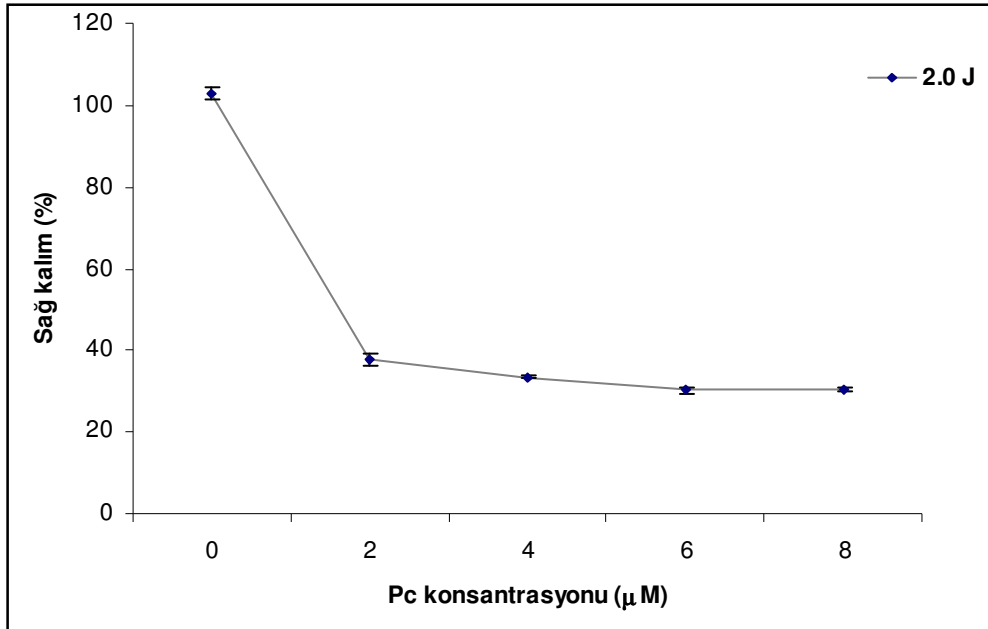
Şekil 3.13: PcB'nin SPC111 hücrelerinde fototoksik etkisi. 0-8 μM arasında artan PcB konsantrasyonları ve 2.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT'nin SPC111 hücrelerinde sitotoksik etkisi. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



Şekil 3.14: PcB'nin SPC212 hücrelerinde fototoksik etkisi. 0-8 μM arasında artan PcB konsantrasyonları ve 2.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT'nin SPC212 hücrelerinde sitotoksik etkisi. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



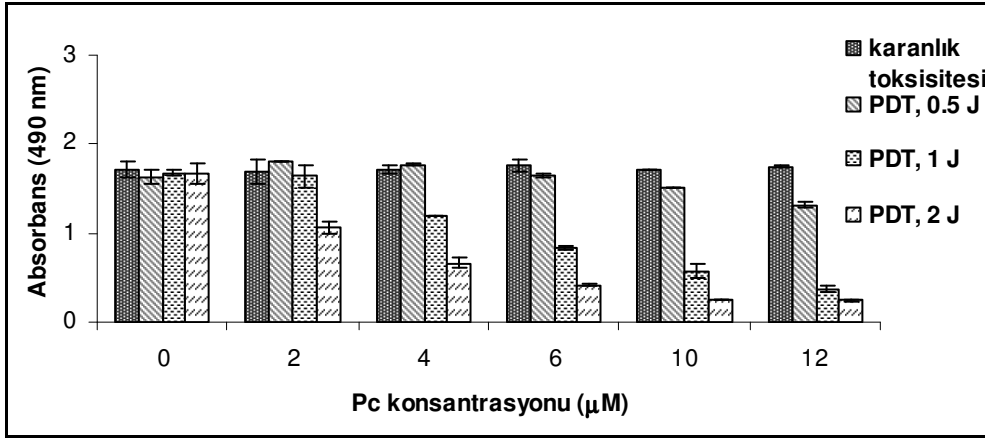
Şekil 3.15: Artan PcB konsantrasyonlarına ve 2.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış SPC111 hücrelerine ait sağ kalım eğrisi. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisine ve Pc konsantrasyonuna (X eksen) bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma yüzde olarak (Y eksen) ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.



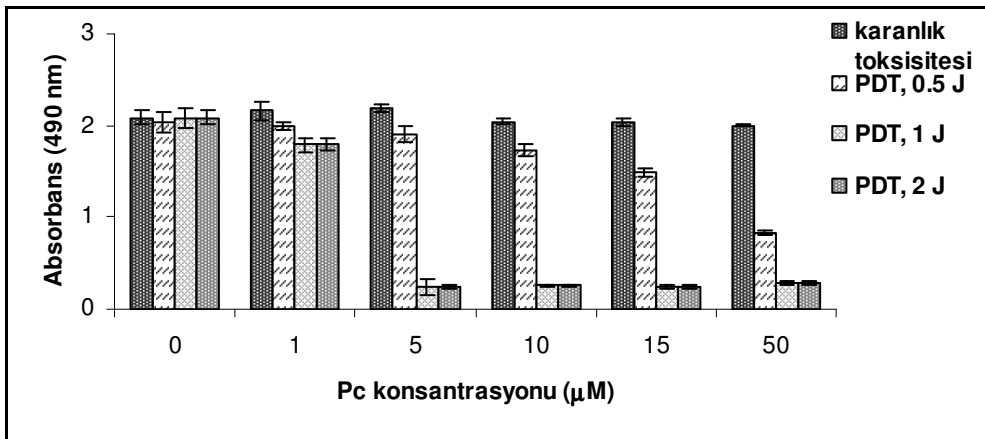
Şekil 3.16: Artan PcB konsantrasyonlarına ve 2.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış SPC212 hücrelerine ait sağ kalım eğrisi. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisine ve Pc konsantrasyonuna (X eksen) bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma yüzde olarak (Y eksen) ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

3.2.4. PcC'nin Fototoksik Etkisi

Şekil 3.17'de PcC'nin 0-12 μM ve 0-50 μM aralığındaki konsantrasyonları ile 0.5, 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışığın hücre canlılığı üzerindeki etkisi görülmektedir. Karanlıkta sitotoksik etki göstermediği belirlenen PcC, 680 \pm 10 nm dalga boyunda, 0.5, 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışık ile birlikte kullanıldığında HeLa hücrelerinde sitotoksik etki yaratmıştır.



(a)



(b)

Şekil 3.17: PcC kullanılan PDT'nin HeLa hücrelerinde canlılığa etkisi. (a) 0-12 μM aralığında artan PcC konsantrasyonunun HeLa hücrelerinde fototoksik etkisi (b) 0-50 μM aralığında artan PcC konsantrasyonunun HeLa hücrelerinde fototoksik etkisi. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.

Karanlık toksisitesinin araştırıldığı deneylerdeki absorbands değerleri, 0.5 J enerjili ışık ile uygulanan PDT'deki absorbands değerleri ile karşılaştırıldığında, 6.0, 10 ve 12 μM PcC için p değerleri sırası ile 0.004, 0.04 ve <0.001 dir. Başka bir deyiş ile 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamasında, PcC'nin fototoksik etkisi, ancak 6.0 μM 'dan sonraki konsantrasyonlarda ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.17 (a)).

2.0 μM PcC ve 1.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış hücrelere ait absorbands değerleri, karanlık toksisitesine ait absorbands değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel farklılık belirlenmemiş ($p=1.00$) iken, 2.0 μM 'dan sonraki konsantrasyonlarda artan PcC konsantrasyonuna bağlı olarak fototoksik etkide de artış görülmektedir ($p<0.001$). 1.0 ve 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında, 2.0 μM PcC için iki enerji arasında istatistiksel farklılık yok iken ($p=0.20$), 2.0 μM 'dan sonra fototoksik etkinin konsantrasyon ve artan ışık enerjisine bağlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 3.17 (a)).

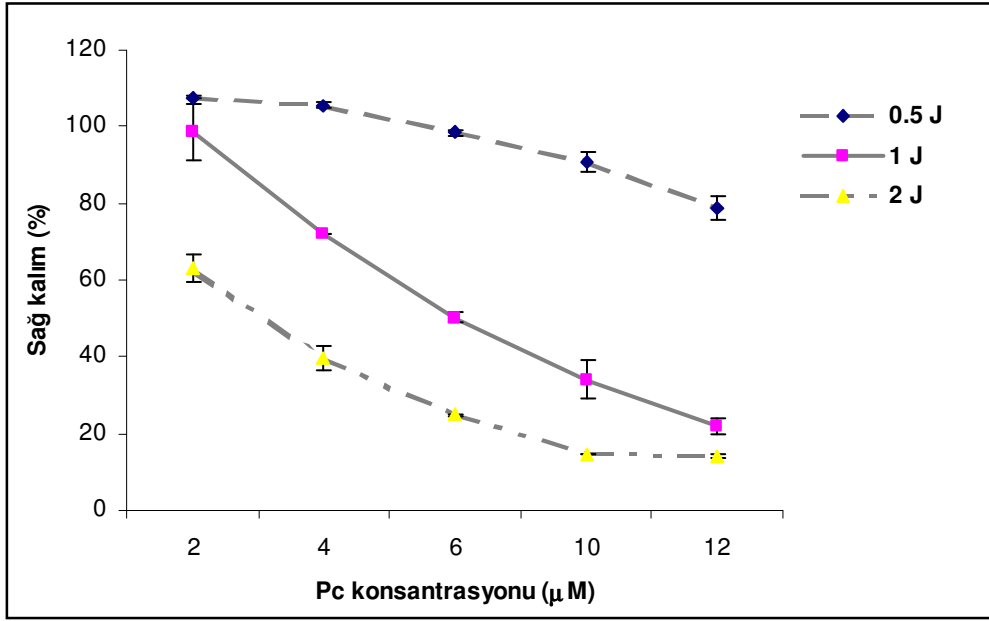
2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'de de sitotoksik etki konsantrasyona bağlı olarak artmakta iken ($p<0.001$), 10 ve 12 μM Pc'nin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri arasında istatistiksel farklılık yoktur (6.0 ve 10 μM için $p=0.001$, 6.0 ve 12 μM için $p<0.001$, 10 ve 12 μM için $p=0.19$ 'dur). 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT sonucu elde edilen absorbands değerleri karşılaştırıldığında ise, 2.0, 4.0 ve 6.0 μM için p değerlerinin sırası ile $p<0.001$, $p=0.004$, $p=0.006$ olduğu, sitotoksitenin de artan ışık enerjisi ile birlikte arttığı belirlenmiştir. 0.5 ve 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarına ait sonuçların karşılaştırılması sonucunda da sitotoksisteki artışın ışık enerjisindeki artışla ilişkili olduğu görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 3.14 (a)).

PcC'nin 0-50 μM 'lık konsantrasyonlarının fototoksik etkisinin gösterildiği şekil 3.17 (b)'ye bakıldığında, 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'de sitotoksik etkinin 5.0 μM PcC uygulamasından itibaren başladığı söylenebilir. 0.5 J enerjide, 5.0, 10, 15 ve 50 μM PcC ile inkübe edilen kültürlerden alınan absorbands değerleri, karanlık toksisitesine ait absorbands değerleri ile karşılaştırıldığında 5.0, 10, 15 ve 50 μM için p değerlerinin sırası ile 0.016, 0.008, <0.001 ve <0.001 olduğu görülmüştür.

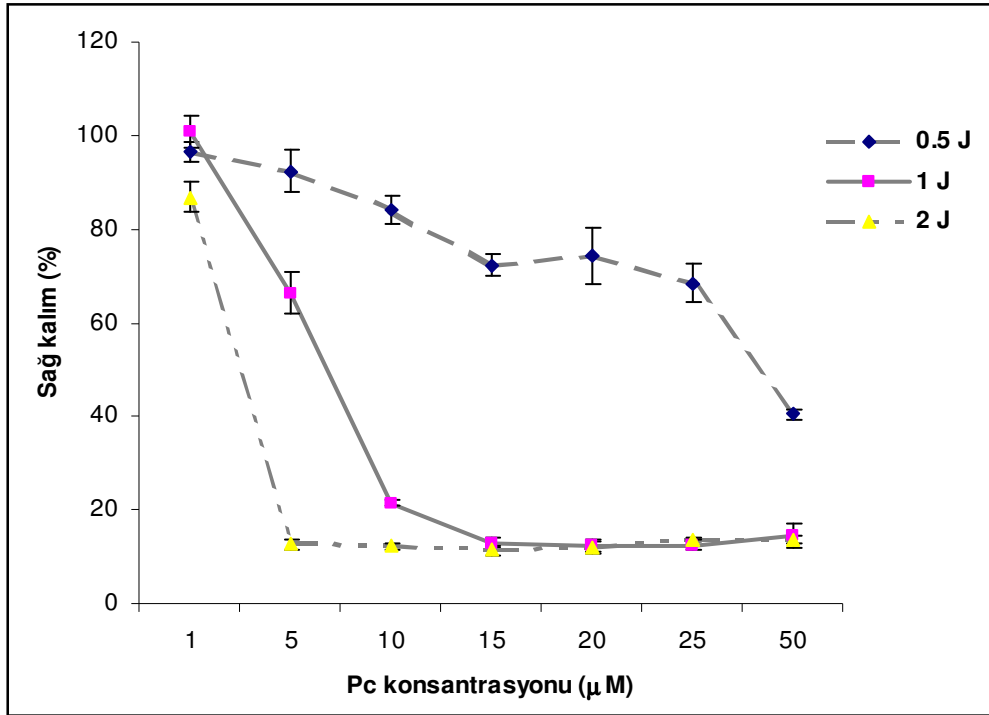
1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı ve 0-50 μM aralığındaki konsantrasyonlar için fototoksik etkinin araştırıldığı PDT uygulamalarında (Şekil 3.17 (b)) sitotoksik etkinin, 5.0 μM PcC uygulamasından itibaren başladığı görülmüştür ($p<0.001$). 15 ve 50 μM için $p=0.47$ 'dir. Buna göre 15 ve 50 μM PcC uygulamalarında artan PcC konsantrasyonun sitotoksistede artışa neden olmadığı söylenebilir. 0.5 J ve 1.0 J ışığın kullanıldığı PDT uygulamaları karşılaştırıldığında ise, 1.0 μM konsantrasyonda, artan ışık enerjisinin sitotoksistede artışa neden olmadığı ($p=0.97$) ancak 5.0 μM ve sonrasındaki konsantrasyonlar için sitotoksik etkinin konsantrasyon ve ışık enerjisindeki artışa bağlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 3.17 (b)).

0-50 μM aralığındaki her bir PcC konsantrasyonu için, ışık enerjisinin 2.0 J olduğu PDT uygulaması sonunda elde edilen absorbans değerleri, karanlık toksisitesine ve 0.5 J ışık enerjisinin kullanıldığı PDT uygulamalarına ait absorbans değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p<0.001$). 1.0 J ve 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında ise 15 ve 50 μM PcC konsantrasyonları için $p=1.00$ olduğu görülmüştür. Bu istatistiksel sonuçlara göre, 1.0 J ve 2.0 J enerjili ışık kullanıldığında, 15 μM ve üzerindeki konsantrasyonlar için sitotoksik etkinin oranında ışık enerjisine bağlı bir değişim olmamaktadır (Şekil 3.17 (b)).

Şekil 3.18'de artan PcC konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerine ait sağ kalım eğrisi görülmektedir. Sağ kalım grafiklerine bakıldığında, 10 μM PcC ile 2.0 J enerjiye sahip ve 15 μM PcC ile 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında hücre canlılığında % 90 oranında azalma olduğu görülmektedir. 0.5 J enerjiye sahip ışığın % 50 oranında hücre ölümüne neden olabilmesi için gerekli olan PcC konsantrasyonu 25 μM 'ın üzerinde olmalı iken (Şekil 3.18 (a)), 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında LD_{50} 6.0 μM 'dır (Şekil 3.18 (b)).



(a)



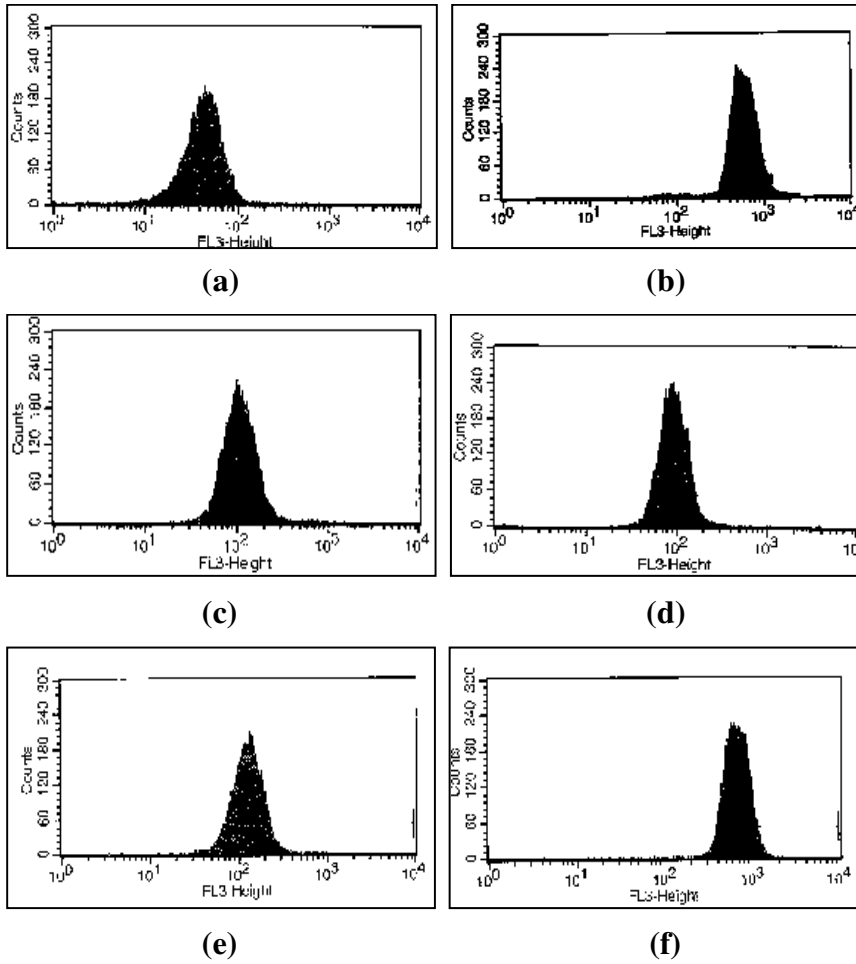
(b)

Şekil 3.18: Artan PcC konsantrasyonlarına ve farklı enerjilerdeki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinde sağ kalım eğrisi. PDT uygulaması sonunda kullanılan ışık enerjisine ve Pc konsantrasyonuna (X eksen) bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma yüzde olarak (Y eksen) ifade edilmiştir. Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir. (a) PcC'nin 0-12 µM aralığındaki konsantrasyonlarının kullanıldığı PDT ardından HeLa hücrelerinde hücre

sağ kalımı. (b) PcC'nin 0-50 μM aralığındaki konsantrasyonlarının kullanıldığı PDT ardından HeLa hücrelerinde hücre sağ kalımı.

3.3. Ftalosiyanin Bileşiklerinin Hücre İçine Alınma Potansiyelleri

Pc A, B, C, D ve E'nin hücre içine alınma potansiyelleri flow sitometri (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences) kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 3.19'da, Pc A, B, C, D ve E ile 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücreleri ve negatif kontrol olarak kullanılan (Pc ile inkübe edilmemiş) HeLa hücrelerinin verdiği floresan sinyaller histogram olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.19: Pc'lerin HeLa hücrelerine alınma potansiyelleri. X eksenı logaritmik ölçekte (10^7 ar kat değişim ile) floresan yoğunluğunu, Y eksenı ise hücre sayısını (Counts) belirtmek üzere: (a) Pc ile inkübe edilmemiş hücrelerden alınan otofloresanı, (b), (c), (d) (e) ve (f) ise

sırası ile Pc A, B, C, D ve E ile inkübe edilmiş hücrelerden alınan FL3 (floresan 3) sinyallerini göstermektedir.

Yapılan flow sitometri analizinde Pc ile inkübe edilmemiş HeLa hücrelerinden (negatif kontrol) alınan floresan sinyalinin yoğunluğunun logaritmik ölçekte 10^1 ve 10^2 aralığında olduğu (a), bu aralıkta floresan veren hücre sayısının tüm hücrelere oranının ise % 2.26 olduğu belirlenmiştir.

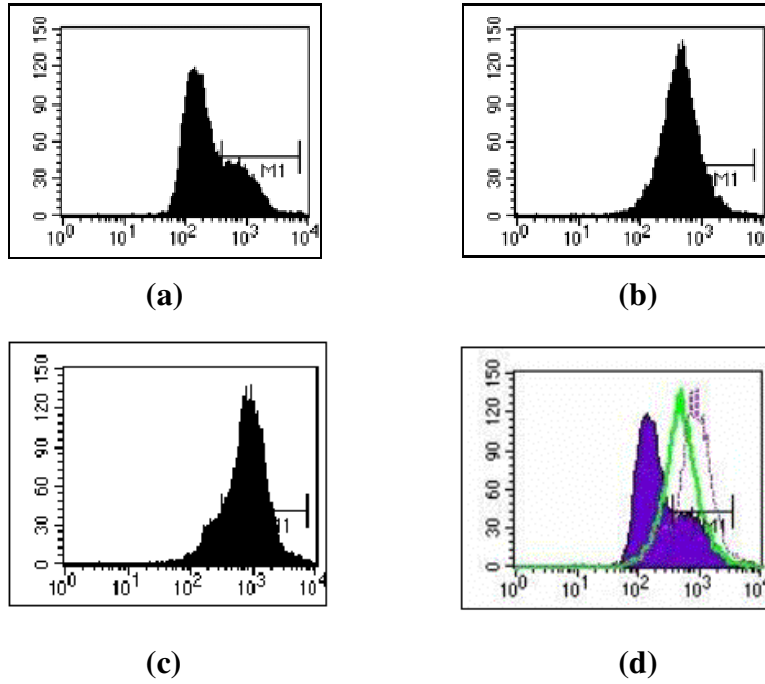
Pc ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan yoğunluğu belirlenirken kontrol hücrelerine ait otofloresan sinyal dikkate alınmıştır. Buna göre, PcA'nın $50 \mu\text{M}$ 'ı ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan sinyali (b) veren hücrelerin oranının % 99.69, PcB'nin $2 \mu\text{M}$ 'ı ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan sinyali (c) veren hücrelerin oranının % 99.89, PcC'nin $15 \mu\text{M}$ 'ı ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan sinyali (d) veren hücrelerin oranının % 73.7, PcD'nin $50 \mu\text{M}$ 'ı ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan sinyali veren hücrelerin oranının % 64.66 ve Pc E'nin $100 \mu\text{M}$ 'ı ile inkübe edilmiş hücrelerde floresan sinyali (e) veren hücrelerin tüm hücrelere oranının % 48.29 olduğu görülmüştür. Ortalama floresan sinyali yoğunluğu ise kontrol için 116.91, PcA için 604.53, PcB için 656.70, PcC için 151.00, PcD için 136.37 ve PcE için 120.96'dır.

3.4. Fotodinamik Terapi Ardından Apoptozis Tayini

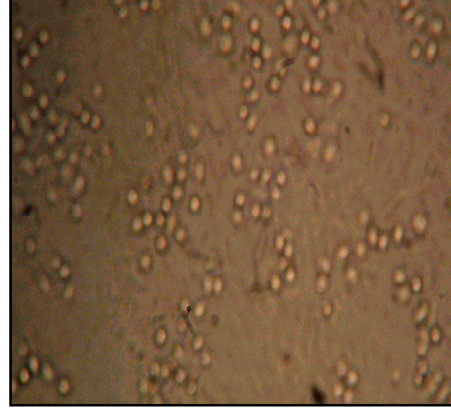
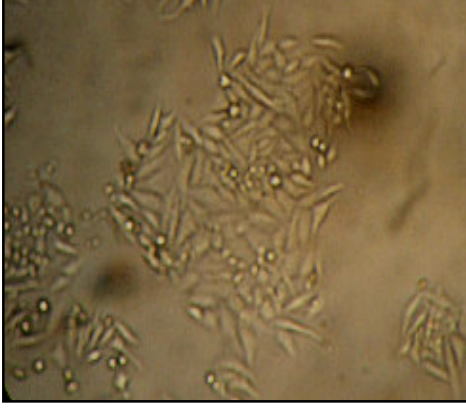
PDT ardından apoptozis tayini, ApoStat Intracellular Caspase Detection Kit, RD Systems kullanılarak [130], kısım 2.2.4.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. PcB'nin $5.0 \mu\text{M}$ konsantrasyonuna maruz bırakılan HeLa hücrelerinde hücre içi aktif kaspaz analizi, 690 ± 10 nm dalga boyunda, 1.0 J enerjili ışık uygulamasını takip eden 6. ve 24. saatlerde yapılmıştır. Negatif kontrol olarak ise Pc ile inkübe edilmemiş ve ışığa maruz bırakılmamış HeLa hücre popülasyonu kullanılmıştır.

Flow sitometri histogram istatistik verilerine göre, kontrol hücrelerinin % 24.99'unun FL1 floresan ışıması verdiği görülmüştür. PDT ardından 6 saat inkübe edilmiş hücre

grubunda hücrelerin % 67.69'undan, PDT ardından 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin ise % 86.12'sinden FL1 ışması alınmıştır. Buna göre, kontrol olarak kullanılan hücrelerden alınan floresan sinyal ile karşılaştırıldığında, PDT ile apoptozisin tetiklendiği hücre populasyonlarından alınan floresan sinyalin artmış olduğu görülmüştür (Şekil 3.20). Floresan yoğunluğundaki artışın, ışık uygulamasından sonra geçen inkübasyon süresi ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir: PDT ardından 24 saat inkübe edilen hücrelerden alınan floresan sinyali, PDT ardından 6 saat inkübe edilmiş hücrelerden alınan floresan sinyalinden % 18.43 oranında fazladır.



Şekil 3.20: PDT ardından hücre içi aktif kaspazın flow sitometride analizi. X ekseninde logaritmik ölçekte (10 'ar kat değişim ile) ifade edilmiş floresan yoğunluğunun, Y ekseninde ise hücre sayısının (Counts) yer aldığı histogramda, kontrol grubunun (a), PDT uygulamasından sonra 6 saat inkübe edilen (b) ve PDT uygulamasından sonra 24 saat inkübe edilen hücrelerin (c) FL1 ışmaları gösterilmiştir. Üç uygulamanın birlikte gösterildiği histogramda (d) ise kontrol grubu hücreleri, PDT uygulamasından sonra 6 saat inkübe edilen ve PDT uygulamasından sonra 24 saat inkübe edilen hücreler, sırası ile mor, yeşil ve pembe çizgiler ile belirtilmiştir.



Şekil 3.21: PDT uygulaması ardından HeLa hücreleri. (a) PcB ile inkübe edilmemiş ve ışığa maruz bırakılmamış HeLa hücrelerinin 20x büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü. (b) PcB'nin 4 μ M konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilmiş ve ardından 2.0 J enerjideki ışığa maruz bırakılmış HeLa hücrelerinin 20x büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserin tedavisinde etkin ve modern bir yöntem olarak kullanılmaya başlanan fotodinamik terapi (PDT), fotosensitayzır (PS) denen ışığa duyarlı maddenin, ışık etkisi ile aktivasyonu sonucu oluşan ROS ve 1O_2 'nin hücreyi tahrip etmesi esasına dayanır [131, 132]. Işık ve ışığa duyarlı madde tek başına tümöre öldürücü etki yapamayacağından, kullanılacak ışık kaynağının ve ışığa duyarlı maddenin biyolojik sistemlerde iyi tanımlanması, terapinin başarısı için gereklidir [78].

İkinci nesil PS'lerden olan ftalosiyanın (Pc)'ler, kırmızı ışıkta yüksek molar asorbisyona sahip olmaları, ışık karşısında kararlılıkları ve uyarılmış üçlü haldeki ömürlerinin uzun olması nedeni ile PDT için kullanışlı moleküllerdir. Makro halkaya eklenen gruplar sayesinde Pc molekülünün çözünürlük özelliklerini değiştirmek mümkündür. Yeni Pc moleküllerinin geliştirilmesinde, Pc'nin yığılma (agregasyon) özellikleri oldukça önemlidir. Agregasyon, uzun zincirlerin ya da hacimli grupların Pc makro halkasına eklenmesiyle engellenebilmektedir [133].

Çinko (Zn) ya da magnezyum (Mg) gibi dimanyetik metalleri merkezinde taşıyan Pc'lerin fototoksititeyi arttırdığı belirlenmiştir. Son dönemlerde çinko (Zn) Pc'ler, PDT'de yaygın şekilde kullanılmaktadır. Tiyol türevi metalloftalosiyanın (MPcs) kompleksleri oldukça iyi spektroskopik ve fotokimyasal özellikler göstermektedir; örneğin 700 nm'nin üzerindeki görünür ışığı absorbe ederler. Tiyol türevi MPC'ler bahsedilen nitelikleri dolayısı ile PDT uygulamaları için de elverişlidir [133].

Tez çalışmasında ışık ile aktive edilen PcA, B, C, D ve E'nin HeLa, PcB'nin ise HeLa, SPC111 ve SPC212 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Mezotelyoma hücre serileri ile gerçekleştirilen PDT uygulamalarında PcB'nin kullanılma nedeni, HeLa hücreleri ile yapılan hücre canlılığı deneylerinde bahsedilen Pc'nin oldukça yüksek fotodinamik aktivite göstermesidir.

PcA, B, C ve D sitotoksik olduğu bilinen DMSO'da çözünenen ZnPc'lerdir. Deneysel sonuçlar, DMSO'nun besi yeri içindeki oranının % 1.0 (v/v)'den büyük olduğu koşullardan itibaren HeLa, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde sitotoksik etki göstermeye başladığını ortaya

koymuştur (şekil 3.4, 3.5 ve 3.6). PDT uygulamaları ardından sitotoksik etki değerlendirmesi yapılırken, DMSO kaynaklı hücre ölümünün sonuçları etkilemesinden kaçınmak amacıyla, kullanılan Pc konsantrasyonlarının besiyeri içerisinde oluşturacağı DMSO yüzdesi (v/v) olarak hesaplanmış, % 1.0 (v/v) oranının üzerinde DMSO içeriği oluşturacak Pc konsantrasyonları kullanılmamıştır.

PcD ve PcE, karanlıkta sitotoksik etki göstermedikleri gibi, ışık ile birlikte kullanıldıklarında HeLa hücreleri üzerinde fototoksik etki de oluşturmamışlardır. 3.0 J enerjili ışık ile PcD'nin, oluşacak DMSO yüzdesi dikkate alındığında kullanılabilir en yüksek konsantrasyonu olan 50 µM'lık dozunun, HeLa hücrelerinde sitotoksik etki yaratmadığı görülmüştür. Suda çözünen PcE'nin de kullanılabilir en yüksek konsantrasyonu olan 100 µM'lık konsantrasyonu ile 1.0 J'lik enerjiye sahip ışığın birlikte kullanıldığı PDT uygulamasında da hücre canlılığında azalma gözlenmemiştir.

HeLa hücre serisinde karanlık toksisitesi oluşturmayan okta-triethilenoksi-sülfonil sübstiyeli ZnPc (PcD) ve kuaterner monoaza bakır (Cu) Pc (PcE)'nin PDT'de etkinlik göstermemesinin nedenlerinden biri, bahsedilen Pc'lerin hücre içine alınma potansiyellerinin düşüklüğü olabilir. 3.3'üncü kısımda da belirtildiği gibi kontrol hücreleri için ortalama floresan sinyali yoğunluğu 116.91, PcD için 136.37 ve PcE için 120.96'dır. Kontrol hücrelerine ait otofloresan sinyalinin yoğunluğu ile karşılaştırıldığında hücre içine giren PS miktarının az olduğu düşünölmektedir.

PcE'nin hücre içine alınma potansiyelinin düşük olmasının, besiyeri içerisinde yığılaşma meydana getirmiş olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. PcE'nin 30 Å'luk büyüklüğü, besiyeri içeriğinde bulunan suya ait H⁺ atomları ile bağ oluşturmayı imkanı kıldığından, PcE kültür ortamında agregat olmuş olabilir. Agregasyon, *in vivo*'da dağılıma engel teşkil etmekte ve ⁻O₂ verimini düşürmektedir [133]. Diğer yandan, Cu⁺² için özel bağlanma bölgelerine sahip olduğu bilinen albuminin [125], PcE'nin merkezinde yer alan bakır atomuna tutarak, hücre içine girişini engelleyebileceği düşünölmektedir. Pc makrohalkasına bağlanmış N⁺ içeren bir grup taşıyan katyonik CuPc'deki N⁺'nın da besiyeri içindeki negatif yüklü bir grup taşıyan biyolojik bir materyale bağlanması, PcE'nin hücre içine girişi engelleyebilecek bir başka faktör olabilir. Benzer durum, PcE makro halkasında

bulunan, N^{+} 'a bağı (OSO_3CH_3)⁻ için de olasıdır: (OSO_3CH_3)⁻, kültür ortamında pozitif yüklü bir grup ile bağ yapabilir ve oluşan hacimli yapı, hücre içine girişi engelleyebilir. PcE'nin izomer karışımı olmaması da besi yeri içerisindeki çözünürlüğünü ve hücre içine girme potansiyelini düşürmüş olabilir. *d* kabuğunda 9 elektron taşıyan, paramagnetik bir metal olan Cu'nun boş orbitali, ışık ile uyarıldığında hızla deaktivasyona yol açtığından, hücre içine girme potansiyeli de düşük olan PcE'nin fotodinamik aktivite göstermemesinin bir diğer nedeni olabilir [64].

PcD'nin singlet oksijen verimi (Φ_{Δ})'nin ve fotodegradasyon kuantum verimi (Φ_d)'nin orta derecede olduğu belirlenmiştir [134]. PcA ve B'nin fotodegradasyon kuantum verimi ile karşılaştırıldığında, PcD'nin ışık karşısındaki kararlılığının daha düşük olduğu görülmüştür [134, 133]. Buradan hareketle, PcD'nin ışık uygulaması sırasında parçalanıyor (photobleaching; photodegradation) olabileceği, buna bağlı olarak fotodinamik aktivite göstermediği düşünülmektedir [133]. Ayrıca, PcD'nin izomer karışımı olmaması, besi yeri ortamındaki agregasyonu arttırarak, hücre içine alınma potansiyelini düşürmüş olabilir.

Tetra-trietilenoksi-sülfonil sübstitiyeli bir ZnPc olan PcA'nın da HeLa hücrelerinde karanlık sitotoksitesi göstermediği belirlenmiştir. 0.5 J enerjiye sahip ışık kullanıldığında, PcA'nın 25 μM 'lık konsantrasyonunda HeLa hücrelerinin % 15'inin, 50 μM 'da ise % 50'sinin canlılığını kaybettiği görülmüştür. 1.0 J ve 0.5 J, 2.0 J ve 0.5 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamaları karşılaştırıldığında, fototoksik etkinin ışık enerjisindeki ve Pc konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak arttığı saptanmıştır. 2.0 J ve 1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamaları karşılaştırıldığında ise, 5.0 ile 50 μM arasındaki konsantrasyonlarda fototoksik etkinin ışık enerjisi ve Pc konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı, ancak 50 μM PcA'nın her iki enerjide de aynı oranda fototoksik etki yarattığı görülmüştür. Bununla birlikte, 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında 25 μM PcA ve 50 μM PcA konsantrasyonunun oluşturduğu sitotoksik etkinin istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p=0.80$).

PcA ile yapılan PDT uygulamalarına ait istatistiksel sonuçlar, fototoksik etkinin Pc konsantrasyonuna ve ışık enerjisine bağlı olduğunu göstermiştir. 50 μM PcA'nın, 1.0 ve 2.0 J enerji için aynı oranda fototoksik etki yaratmasının nedeni HeLa hücrelerindeki Pc miktarının

doğunluğa ermiş olması olabilir. LD₉₀'ın 1.0 J için 50 µM olmasına karşın 2.0 J için 25 µM PcA olması, sitotoksik etkinin konsantrasyon ve enerjiyle olan bağlantısını göstermektedir. $E=hc/\lambda$ (5.1) eşitliğinde, h Planck sabiti ($h=6.623 \times 10^{-34}$ Js) ve c ışığın vakumdaki hızı ($c = 2.998 \times 10^8$ ms⁻¹), λ ışığın dalga boyu (m) olmak üzere, λ dalga boyundaki ışığın enerjisi E (J)'dir. Buna göre J başına düşen foton sayısı, ışık kaynağının enerjisinin (0.5, 1.0, 2.0 J), kullanılan ışığın enerjisine (E) bölünmesi ile elde edilir [90]. Dolayısı ile ışık kaynağının enerjisi ve Pc konsantrasyonu arttıkça, Pc'yi uyaracak fotonların sayısındaki artış ile birlikte \cdot O₂ ve başka ROS'lerinin oluşma olasılığı ve miktarı artmakta, böylelikle fototoksik etkiye de artış gözlenmektedir. 0.5 J enerjili ışığın kullanılacağı uygulamalarda ise LD₉₀ konsantrasyonunun 50 µM PcA'dan yüksek olmasının gerektiğinin görülmesi, bu enerjide ışığın ROS oluşumu için yeterli moleküler enerjiyi tetiklenemediğini düşündürmektedir.

Benzer yapılar gösteren tetra-trietylenoksi-sülfonil sübstiyeli ZnPc (PcA) ve okta-trietylenoksi-sülfonil sübstiyeli ZnPc (PcD) arasında fotodinamik etkinlik açısından fark vardır. Hücre içine alınma potansiyellerinin flow sitometride belirlendiği çalışmalarda, PcA ile inkübe edilen HeLa hücrelerinde alınan ortalama floresan sinyali yoğunluğunun 604.53 olması, PcA'nın hücre içerisine alınma potansiyelinin PcD'den yüksek olduğunu göstermektedir. Molekül büyüklükleri de birbirine yakın olan (PcD için 39 Å, PcA 40 Å) PcA ve PcD molekülleri arasından, PcA'nın izomer karışımı olması ve besi yeri içerisindeki çözünürlüğünün yüksek olması, gözlenen fotodinamik etkinin temelini oluşturmaktadır.

HeLa, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde fototoksik etkisi incelenen PcB'nin tek başına kullanıldığında sitotoksik etki oluşturmadığı görülmüştür. HeLa hücrelerinde 0.5 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT'de, sitotoksik etkinin 0.8 µM'dan itibaren başladığı ve 0.8 µM'dan 4.0 µM'a kadar, artan PcB konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etkinin de arttığı görülmüş, ancak 4.0, 5.0 ve 6.0 µM'lık PcB konsantrasyonlarının oluşturduğu fototoksik etkiler arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmamıştır. 1.0 J ve 0.5 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT'de, 0.2-4.0 µM arasındaki PcB konsantrasyonları için sitotoksik etkinin ışık enerjisine ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı, 4.0 µM ve sonraki konsantrasyonlar için ise artan ışık enerjisine rağmen sitotoksik etkinin istatistiksel anlamda değişmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, 1.0 J ve 2.0 µM PcB ile 0.5 J ve 4.0 µM PcB'nin, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri arasında da istatistiksel farklılık görülmemiştir. 0.5 J ve 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında ise 4.0 µM ve üzerindeki PcB

konsantrasyonlarında elde edilen absorpsiyon değerleri arasında istatistiksel fark bulunmazken, 4.0 μM 'ın altındaki konsantrasyonlar için sitotoksitenin, artan ışık enerjisi ve Pc konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı söylenebilir. 1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'de ise sitotoksik etkinin 0.2 μM 'dan sonra, 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamasında ise, 0.2 μM 'dan itibaren başladığı belirlenmiştir. 1.0 J enerjili ışık kullanıldığında, 1.0 μM 'dan sonraki Pc konsantrasyonlarının, 2.0 J enerjili ışık kullanıldığında ise 0.8 μM 'ın üzerindeki konsantrasyonların istatistiksel anlamda aynı sitotoksik etkiyi yarattığı görülmüştür. 1.0 μM 'dan sonraki konsantrasyonlar için ise 2.0 J ve 1.0 J enerjiye sahip ışığın oluşturduğu sitotoksik etkiler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

2.0 J enerjideki ışıkta 1.0 μM , 1.0 J enerjideki ışıkta, 2.0 μM 'ın, 0.5 J enerjideki ışıkta ise 4.0 μM PcB'nin LD₉₀ olduğu söylenebilir. 0.5 J'de 2.0 μM PcB'nin konsantrasyonunun LD₅₀ olduğu görülmektedir. PcA'nın ve 1.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında LD₉₀ 50 μM , 2.0 J enerjili ışıkta ise 25 μM 'dır. Buna göre PcB'nin daha düşük konsantrasyonları, PcA'nın daha yüksek konsantrasyonları ile aynı oranda hücre sitotoksitesi oluşturmaktadır. Buradan yola çıkılarak, PcB'nin PDT uygulamalarında PcA'dan daha etkin olduğu söylenebilir. PcB'nin yüksek fotodinamik etkinliği, fotodegradasyona karşı kararlılığından ve hücre içine alınma potansiyelinin yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri saptanan PcA, D ve B Pc'leri [133, 134] arasında fotodegradasyon kuantum verimi en düşük olan PcB'dir. Singlet oksijen kuantum verimi de Pc'Adan yüksektir. Flow sitometrinin kullanıldığı analizde, PcB'nin 2.0 μM 'ı ile inkübe edilmiş HeLa hücrelerinde alınan floresan yoğunluğu 656.70 iken, PcA'nın 50 μM 'ı ile inkübe edilen hücrelerden alınan sinyalin yoğunluğu 604.53. PcB'nin hücre içine alınma potansiyelinin PcA'dan yüksek olmasının nedeni, PcA'nın 40 Å olan büyüklüğüne karşın PcB'nin 50 Å'luk hacimli yapısının, besi yeri içinde agregasyonu azaltmış olması olabilir.

SPC111 hücrelerinde 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında PcB'nin 2.0 μM 'lık konsantrasyonunun ancak % 30 oranında, 6.0 μM 'lık ve 8.0 μM 'lık konsantrasyonlarının ise % 60 oranında hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür. SPC212 hücrelerinde ise 2.0 J enerjili ışık, 2.0 μM PcB ile kullanıldığında % 60, 6.0 μM ve 8.0 μM PcB ile kullanıldığında % 70'in oranında sitotoksite oluşturmuştur. Öte yandan HeLa hücrelerinde 2.0 J enerjili ışık, 2.0 μM PcB ile birlikte kullanıldığında hücrelerin % 90'ında ölüme neden olurken, SPC212 hücrelerinde hücrelerin % 60'ında ölüme neden olmuştur.

Buna göre SPC212 hücreleri PDT uygulamasına HeLa hücrelerinden daha dirençli hücrelerdir. Diğer taraftan SPC111 hücre serisinin PDT uygulamalarına SPC212 ve HeLa hücrelerinden daha dirençli olduğu görülmektedir. Mezotelyoma hücrelerinin PDT'ye servikal kanser hücrelerinden daha dirençli olması, apoptozis düzenleme mekanizmalarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. HeLa hücrelerinde düşük p53, normal düzeyde Rb proteini ekspresyonu görülürken [137], MPM'da sırası ile p53 ve Rb'nin pozitif düzenleyicileri olan *p16^{INK4a}* ve *p14^{ARF}* genlerinde delesyon olduğu görülmüştür; başka bir deyiş ile p53 ve Rb'nin MPM'de inaktif olduğu söylenebilir. Ek olarak, gen dizileme analizleri, SPC212 hücrelerinin p53 geninde missense mutasyonu taşıdığını göstermiştir [108]. Radyoterapiye karşı dirençli tümörler arasında yer alan MPM'nin tedavisinde henüz standart bir yaklaşım mevcut değildir. MPM kanserlerinde, cerrahi müdahalenin etkinliğinin düşük olduğu, kemoterapötiklerin de tedavide kesin başarı sağlamadığı bildirilmiştir. Gen tedavisi ve sitokin kullanımı ise henüz klinik öncesi deneme aşamasındadır [93, 111]. Çalışmamızda SPC111 ve SPC212 mezotelyoma hücrelerinin, özellikle SPC111 hücrelerinin PDT uygulamalarına karşı da dirençli olduğu görülmüştür. Mezotelyoma hücrelerini PDT'ye dirençli yapan mekanizmaların, protein ve gen analizleri düzeyinde çalışılması gerekmektedir.

PDT'deki fototoksik etkisi HeLa hücreleri üzerinde araştırılan PcC'nin karanlıkta sitotoksik etki göstermediği, 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında ise 6.0 μM 'dan sonraki konsantrasyonlarda sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. 1.0 J enerjili ışığa maruz bırakılmış hücrelerde sitotoksik etki 2.0 μM 'da ortaya çıkmakta, 10 μM 'dan sonra artan PcC konsantrasyonlarının sitotoksikitede artışa neden olmadığı görülmüştür. 1.0 ve 0.5 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında, 2.0 μM PcC için iki enerji için alınan sonuçlar arasında istatistiksel farklılık yok iken, 2.0 μM 'dan sonra fototoksik etkinin konsantrasyon ve artan ışık enerjisine bağlı olarak arttığı bulunmuştur. 2.0 J enerjili ışığın kullanıldığı PDT'de de sitotoksik etki konsantrasyona bağlı olarak artarken, 10 ve 12 μM Pc'nin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri arasında istatistiksel farklılık yoktur. 1.0 ve 2.0 J enerjiye sahip ışık ile uygulanan PDT'de, 15 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda görülen sitotoksik etkinin oranında, ışık enerjisine bağlı bir değişim olmamıştır.

10 μM PcC ile 2.0 J enerjiye sahip ve 15 μM PcC ile 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında hücre canlılığında % 90 oranında azalma olduğu

görülmektedir. 0.5 J enerjiye sahip ışığın % 50 oranında hücre ölümüne neden olabilmesi için gerekli PcC konsantrasyonu 25 μM 'ın üzerinde olmalı iken, 1.0 J enerjiye sahip ışığın kullanıldığı PDT uygulamalarında LD₅₀ 6.0 μM 'dır. LD₅₀ LD₉₀ konsantrasyonlarına bakıldığında, sitotoksik etki anlamında PcB'nin PcC'den daha etkili olduğu söylenebilir. Fotofiziksel ölçümleri yapılmamış olmakla birlikte, PcC'nin PcB'den daha düşük olan fotodinamik aktivitesi, düşük singlet oksijen kuantum verimi ya da düşük triplet kuantum veriminden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, PcC, PcA'dan daha etkin bir Pc'dir. PcC'nin 49 Å'luk boyutu, yapıya hidrofobik özellik katan CH₃ grupları [78] ve suda çözünürlüğü arttıran trietilenoksi-sülfonil [134] sayesinde besiyeri içerisinde düşük oranda agregasyon oluşturduğu ve böylelikle hücre içine nüfuz ederek fotodinamik aktivite gösterdiği düşünülmektedir.

Pek çok durumda PDT'nin apoptozisi tetiklemede oldukça etkili olduğu görülmüştür. Bu durumun nedeninin hücreyi kemoterapötik ilaçlara ve iyonize radyasyona karşı dirençli kılan mekanizmaların PDT tarafından bypass edilmesi olasılığıdır [56]. Tez çalışmasında flow sitometri kullanılarak yapılan hücre içi kaspaz miktarı tayinine göre, PcB'nin kullanıldığı PDT, önemli ölçüde apoptozis yolu ile hücre ölümüne neden olmaktadır. Kontrol hücrelerinin % 24.99'unun FL1 floresan ışması verdiği flow sitometri çalışmasında, ışık uygulamasından 6 saat sonra HeLa hücrelerin % 67.69'unun, 24 saat sonra ise % 86.12'sinin apoptozis yolu ile öldüğü belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda, PcA ve C'nin de apoptozisi tetiklemedeki başarısının incelenmesi ve PcA, B ve C'nin kullanıldığı PDT'de apoptozise yol açan mekanizmaların araştırılması hedeflenmektedir. Bununla birlikte, PDT ardından ortaya çıkan hücre ölüm modeli ile yakından ilintili olduğundan PcA, B ve C'nin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi de hedeflenenler arasındadır.

Düşük dozlardaki PS'lerin, yüksek konsantrasyonlardaki PS'ler ile aynı fotodinamik etkiyi oluşturduğu durumlarda, düşük dozda etkin olan PS'lerin kullanımının, *in vivo*'da normal doku hasarını azaltacağını bildirilmiştir. PDT'de kullanılma potansiyeline sahip PS'ler, tümör hücresinde birikme eğilimi gösterdiğinden, kullanılan PS'nin büyük kısmı tümör hücresinde birikecektir [100]. Buna göre LD₉₀ şartları göz önüne alındığında, çalışmada kullanılan Pc molekülleri içerisinde en etkin olan PcB'dir. PcC'nin fotodinamik etkisi ise PcB'den düşük, ancak PcA'dan yüksektir. PcD ve PcE ise fototoksik etki oluşturmadığından, PDT'de kullanılabilir özelliğe sahip değildir. Bundan sonraki

Çalışmalarda, PcA, B ve C'nin fototoksik etkinliklerinin *in vivo*'da, hayvan tümörleri üzerinde incelenmesi hedeflenmektedir. *İn vivo* araştırmalar, *in vitro* alışmalar ile PDT'de kullanılma potansiyeli olduğu belirlenen PcA, B ve C'nin tümör seçiciliği konusunda da bilgilendirici olacaktır.

Tez alışması sonunda radyoterapiye ve kemoterapiye dirençli olduğu bilinen mezotelyoma hücrelerinin [93, 111], PDT'ye de dirençli olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmada kullanılan iki mezotelyoma hücre serisinin (SPC111 ve SPC212) PDT'ye verdikleri cevap farklıdır. SPC212 hücreleri ile karşılaştırıldığında, SPC111 hücre serisinde PDT'ye dirençliliği arttıran mekanizmaların gen profilleri düzeyinde araştırılması, MPM tedavisinde yeni bir açılım yaratabilir.

5. KAYNAKLAR

1. Franks, L.M. (1997) What is cancer: In introduction to cellular and molecular biology of cancer (Franks, L.M. and Teich, N.M., eds.), 3. Baskı, Oxford University Press, New York.
2. Cellular medicine in cancer. Erişim;
http://www.drrathresearch.org/lab_research/cancer.html
3. Cancer is curable. Erişim;
<http://www.canceriscurable.org>
4. Kanser ikinci ölüm nedeni. Erişim;
<http://www.thehealthnews.org/tr/news/07/01/4/kanser.html>
5. Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S. Holland, J.F., and Frei III, E., (2003) Cancer Medicine, 6. Baskı, Hamilton (Canada): BC Decker Inc.
6. Advantages of PhotoDynamic Therapy (PDT). Erişim;
<http://omlc.ogi.edu/pdt/articles/PDTadvantages.html>
7. Ryan, J., A., Introduction to Animal Cell Culture, Technical Bulletin. Corning Incorporated Life Sciences. Erişim;
<http://www.corning.com>
8. Photodynamic cancer therapy. Erişim;
<http://www.scienceinafrica.co.za/2001/july/pdt.htm>
9. Hopper, C. (2000) Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 1:212-219.
10. Medical encyclopedia, Cancer. Erişim;
<http://www.answers.com/topic/cancer>
11. Debatin, K.M. (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 53(3):153-9.
12. Juzeniene A. and 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.
13. History of cancer. Erişim;
<http://www.mesothelioma-cancers.org/History%20of%20Cancer.html>
14. The history of cancer. Erişim;
http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer1.htm

15. The history of cancer. Erişim;
<http://www.cancer.org>].
16. Houghton, J.M., Morozov, A., Smirnova, I., and Wang, T.,C. (2007) Stem cells and cancer. *Seminars in Cancer Biology* .17; 191–203.
17. White, L., A. Lecture 1: Introduction to cancer biochemistry of cancer. Erişim;
<http://www.cook.rutgers.edu/~dbm/lecture1cancer.pdf>
18. Macdonald, F., Ford, H.,J., and Casson, A.,G. (2004) *Molecular Biology of Cancer*, 2. Baskı, BIOS Scientific Publ. Londra; New York.
19. Altungöz, O. ve Atabey, N. *Kanser moleküler biyolojisinde genel kavramlar*, Bölüm 1 , *Kanserler*. Erişim;
<http://web2.deu.edu.tr>
20. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science ; New York and London.
21. <http://www2.scitech.sussex.ac.uk>
22. Lewin, B. (1999) *Genes* 7, Oxford University Press, USA.
23. Jesse D., Michele, M., Parker, T., Fultz, K.,E., R., Ignatenko, N.A., ve Gerner, E.W. (2003) *Molecular biology of cancer* (Editör: Donald, J., A.), *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 6. Baskı, Bölüm 5:Chemotherapeutic Agents, John Wiley & Sons, Inc.
24. Currey, C., J. *Cellular Organization of the Body*. Erişim;
<http://medinfo.ufl.edu/pa/chuck/summer/histology.pdf>
25. *Inside the Cell*, National Institute of General Medical Sciences. Erişim;
<http://publications.nigms.nih.gov/insidethecell/>,
26. Bishop, J. M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 235–248.
27. Yang, Z., Ro, S. and Likelihood, B., R. (2003) Models of somatic mutation and codon substitution in cancer genetics. *Genetics*, 165: 695–705.
28. Köktürk, N., Kırışoğlu, C., E., ve Öztürk, C. (2003) *Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi*. *Solunum* 5(3): 139-145.
29. Haber, D., A. (2002) *Molecular genetics of cancer: tumor suppressor genes*. Erişim;
http://www.medscape.com/viewarticle/534488_print
30. Ekmekci, A. *Kanser*. Erişim;
<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm>
31. Noguchi, E. The cell cycle and checkpoint controls : Toward understanding of genome maintenance mechanisms. Erişim; <http://homepage.mac.com/enognog/Noguchi%20Lab.html>

32. Atabey, N., Hücre Farklılaşması ve Programlanmış Hücre Ölümü. Erişim; http://web.deu.edu.tr/saglikbil/ders_sunumlari/hucre.pdf
33. The Eukaryotic Cell Cycle. Erişim; www.biochem.ubc.ca/coursematerials/410ISsept14notes.pdf
34. Ulukaya, E. Hücre siklusu ve apoptozis. Erişim; biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf
35. Kearns, W., G. and Liu, J., M. (2001) Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Current Genomics*, 2: 171-180.
36. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., S., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000) *Molecular cell biology*, 4. Baskı, Freeman, W., H. and Company, 41 Madisohn Avenue, New York.
37. Dönmez, M. (2005) Larinksin yassı epitel hücreli karsinomlarında p16 ekspresyonu ve HPV ile ilişkisi, Uzmanlık tezi. Erişim; www.istanbulsaglik.gov.tr.
38. Cell- Cycle Control and Cell Death. Erişim; [tu-cottbus.de/.../Biologie/scripte_engl/ecb_praesent/Chapter 18.pdf](http://tu-cottbus.de/.../Biologie/scripte_engl/ecb_praesent/Chapter%2018.pdf)
39. Smits, V.A. and Medema, R.H. (2001) Checking out the G2/M transition. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1519, 1-12.
40. Novák B., Sible, J., C., and Tyson, J., J. (2002) Cell Cycle checkpoints. *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group. Journal articles. Erişim; www.els.net.
41. Funk, J., O., (2005) Cell cycle checkpoint genes and cancer. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. Erişim; www.els.net
42. Johnson, D., G. and Walker, C., L. (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295–312
43. Wu, C., L., Kirley, S., D., Xiao, H., Chuang, Y., Chung, D. C., Zukerberg, L. R. (2001) Cables enhances cdk2 tyrosine 15 phosphorylation by wee1, inhibits cell growth, and is lost in many human colon and squamous cancers. *Cancer Res.* 61: 7325-7332
44. Edinger, A., L. and Thompson, C., B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. Volume 16, Issue 6, pp. 663-669.
45. Hekim, N. (2003) Apoptosis, Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. s.115-140.

46. Öniz, H. (2004) Apoptoz: Ölmeye Yatmak. SSK Tepecik Hastanesi Derg. 14(1):1-20.
47. Thompson, C., B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science; 267: 1456-62.
48. Cooper, G., M., (1994) The cell. Programmed cell death. Chapter 14. Washington: ASM Pres.
49. Cooper, G., M., (2000) The cell: a molecular approach. 2. Baskı, Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
50. Erdoğan, B., B. ve Uzaslan, E., K. (2003) Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi; 4: 165-174.
51. Wu, M., Ding, H., and Fisher, H., D. (2001) Apoptosis: molecular mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. Erişim; www.els.net.
52. Regulation of apoptosis in the female reproductive system, Chapter 2. Review of the literature, Common mechanisms of apoptosis. Erişim; <http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267425.html>
53. Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The Fas death factor. Science, 267: 1449-56.
54. Lowe, S.W. and Lin, A.W. (2000) Apoptosis in Cancer. Carcinogenesis, vol.21, no.3, pp.485-495.
55. Apoptosis. Erişim; <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html#CTL>
56. Oleinick, N., L., Morris, R., L., and Belichenko, I. (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where ,why, and how. Photochem Photobiol Sci. 1 :1-21.
57. Nicoletti, I., Mannucci, R., Migliorati, G., Riccardi, C., and Grignani, F. Common methods for measuring apoptotic cell death by flow cytometry. Erişim; <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/amfc/data/page3.htm>
58. Yılmaz, M., T. (2004) Flow sitometri ve tıpta kullanımı. Flow Sitometrinin Kullanım Alanları (Deniz, G., Yılmaz, T. ve Yıllar, G., ed.), İstanbul.
59. Jungi, T., Franchini, M., Schweizer, M., and Hamza, E. Flow cytometry. Erişim; http://www.ivv.unibe.ch/immunol/Lehre/D11_FLOZY02_rev2.pdf
60. Introduction. Erişim; <http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/cytometry/Training/Intro-to-Flow-Cytometry-notes.pdf>
61. Introduction to flow cytometry: A learning guide. Erişim;

<http://info.med.yale.edu/immuno/cytometry/docs/pdf/introduction.pdf>

62. Gazioğlu, S. (2004) Flow sitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi. Flow sitometri ve tıpta kullanımı (Deniz, G., Yılmaz, T., Yıllar, G., ed.), İstanbul.
63. Ulukaya, E. Apoptozis ders notları. Erişim;
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
64. Bonnett, R. (2000). Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. Gordon and Breach Science Publishing.
65. Moan, J. and Peng, Q. (2003) An outline history of PDT. Photodynamic Therapy Patrice T., Ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
66. Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2003) Photodynamic therapy for cancer. Nature. Vol.3
67. Moor, A.C.E., Ortel, B., and Hasan, T. (2003) Mechanism of Photodynamic Therapy. Photodynamic Therapy Patrice T., Ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
68. Luksiene, Z. (2003) Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. MEDICINA, 39 tomas, Nr. 12.
69. Brown, S., B., Brown, A., E., and Walker, I. (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. Oncology. Vol 5.
70. Stepp, H. (2003) Principles of clinical photodynamic therapy. ACTA Endoscopica. Vol.33.
71. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, and Jakub G (2005) Direct tumor damage mech of photodynamic therapy. Acta Biochim Polon. Vol. 52, 339–352.
72. Wilson, B., (2003) Photodynamic Therapy. Technologies and Biophysical Techniques for PDT. Photodynamic Therapy Patrice T., Ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
73. Bader, O. and Lui, H. Laser Safety and the Eye: Hidden Hazards and Practical Pearls. Erişim;
<http://www.dermatology.org/laser/eyesafety.html>
74. Boyle, R., W. and Dolphin, D. (1996) Structure and distribution relationships of photodynamic sensitizers. Photochem. Photobiol., 64, 469-485.
75. Moan, J. and Peng, Q. (2003) Sensitizers in photodynamic Therapy. Photodynamic Therapy (Patrice T., ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
76. Chan, W., Zuk, M., Ben-Hur, E. (1998) Phthalocyanines, in Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers (Moser, J.G., ed.), Harward Academic Publishers.

77. Moan, J. and Peng, Q. (2003). Sensitizers for PDT: Phthalocyanines. Photodynamic Therapy (Patrice T., ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
78. Hasan, T., Moor, A.C.E., and Ortel, B. (2000) Photodynamic Therapy of Cancer. Cancer Medicine, B.C. Decker Inc., Hamilton, London.
79. Reddi, E. (1997) Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. Journal of Photochemistry and Photobiology Biology; 37 189-195.
80. Moor, A.C.E., Ortel, B., and Hasan, T. (2003) Mechanism of Photodynamic Therapy. Photodynamic Therapy (Patrice T., ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.
81. Polo, L., Valduga, G., Jori, G., and Reddi, E. (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 34 10–23.
82. Moor, A., C., E. (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology Biology. 57 1–13.
83. Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., and Krammer, B. (2003) The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. Med. Laser Appl. 18: 7–19.
84. Almeida, R., D., Manadas, B., J., Carvalho, A., P., and Duarte, C., B. (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. Biochim Biophys Acta. 1704 :59-86.
85. Information on Cervical Cancer Causes, Symptoms and Treatment. Erişim; http://www.healthnewsflash.com/conditions/cervix_cancer.php
86. Rich, W., M. Cancer of the cervix. Erişim; <http://www.gynecancer.com/cervix.html>
87. Rahim ağzı kanseri. Erişim; http://www.kadinsagligi.com/index.php?option=com_content&task=view&id=108&Itemid=139
88. Serviks kanseri (Rahim ağzı kanseri). Erişim; http://www.onkolojim.com/serviks_kanseri.html
89. Akhan, S., E. (2007) Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri. ANKEM Derg. 21(Ek 2):96-98.
90. <http://www.cbu.edu/~jvarrian/122/122photons.doc>.
91. Uslu, T. (2003) Serviks hastalıkları ve neoplazileri. Erişim; http://www.dejog.com/Serviks_hastaliklari_ve_neoplazileri_dosyalar/frame.htm
92. Serviks kanseri. Erişim; <http://www.thehealthnews.org/tr/special/kadin/hastalik/serviks.kanseri.htm>
93. Mesleki Akciğer Hastalıklarda prognoz, tedavi, izlem, Toraks Dergisi, Erişim;

<http://www.toraks.org.tr/kisokulu.php?pid=45&sayfa=3>

94. Atabey, N. ve Altungöz, O. Jinekolojik Kanserlerin Moleküler Biyolojisi. Erişim; <http://www.dejog.com/Blm2W.htm#Jinkanmolbio>.
95. Human Papilloma virus. Erişim; <http://www.burclab.com/bulten/hpv.pdf>
96. Burd, E., M. (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan., p. 1–17.
97. Burns, J. and Maitland, N. Human papillomaviruses and cancer. Erişim; http://www.sgm.ac.uk/pubs/micro_today/pdf/080503.pdf
98. Doorbar, J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110, 525–541
99. Leão, J., C., Campisi, G., Pereira, J., R., D., and Carvalho, A., A., T. (2005) HPV infection and malignancy: Current understanding and future perspectives. *Rev. de Clín. Pesq. Odontol.*, v.1, n.1, jul.
100. Juzeniene, A. and 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.
101. Özvaran, M., K. (2004) Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* , Cilt 5, Sayı 2, Sayfalar 110-115.
102. Şenyiğit, A., Coşkunsel, M., Topçu, F., Işık, R., ve Babayiğit, C. (2000) Malignant pleural mesothelioma: Evaluation of clinical, radiological and histological Features in 136 cases. *Tuberk Toraks.* 48(1): 26-34.
103. Daniel, H., Serman, L., R., K., and Albelda, S., M. (1999) Advances in the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma, *CHEST*; 116:504–520.
104. Pekçolaklar, A. Plevra maligniteleri ve cerrahi tedavileri. Erişim; <http://www.goguscerrahisi.com/plevmag.pdf>.
105. Malignant Pleural Mesothelioma (MPM). Erişim; <http://www.mesotheliomacontrol.com/mesothelioma-types/pleural.html>
106. Neri, M., et. al. (2005) Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure. *Mutation Research* 592 36–44.
107. Mezotelyoma nedir: Sebep ten tedaviye. Erişim; www.bursamahe.com/habermah/Mezotlyomanedir.doc
108. Zangemeister-Wittke, U. and Hopkins-Donaldson, S. (2005) Apoptosis regulation and drug resistance in malignant pleural mesothelioma. *Lung*

Cancer, 49S1 ,S105 —S108.

109. Whitson, B., A. and Kratzke, R., A. (2006) Molecular pathways in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Letters*, 239 183–1899.
110. Hahn, S., M., Smith, R., P., and Friedberg, J. (2001) Photodynamic Therapy for Mesothelioma. *Current Treatment Options in Oncology*, 2:375-383)
111. Turna, A. Mesotelyoma. Erişim;
<http://www.goguscerrahisi.com/mak/Mak032.html>
112. Zhang, J., Cao, E., Li, J., Zhang, T., and Ma, W. (1998) Photodynamic effects of hypocrell in A on three human malignant cell lines by inducing apoptotic cell death. *Journal of Photochemistry and Photobiology* . 43 106-111
113. Juarranz, A., Espada, J., Stockert, J., C., Villanueva1, A., Polo, S., Dominguez, V., and Canete, M. (2001) Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, α -Actinin and keratin of HeLa cells, *Photochemistry and Photobiology*, 73(3): 283–289
114. Panzarini, E., Tenuzzo, B., Palazzo, F., Chionna, A., and Dini, L. (2006) Apoptosis induction and mitochondria alteration in human, HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 83 39–47.
115. Ding, X., Xub, Q., Liua, F., Zhou, P., Gua, Y., Zenga, J., Anb, J., Daia, W., and Lia, X. (2004) Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Letters* 216 43–54.
116. Yang, H., Wu, T., Zhang, M., and Zhang, Z. (2001) A novel photosensitizer, 2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin B (2-BA-2-DMHB)- its photodynamic effects on HeLa cells :efficacy and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1540 22-31.
117. Oda, K., Ogura, S., and Okura, I. (2000) Preparation of a water-soluble fluorinated zinc phthalocyanine and its effect for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 59 20–25.
118. Vantieghema, A., Assefaa, Z., Vandenabeeled, P., Declercqd, W., Courtoisb, S., Vandenheede, J., R., Merlevedea, W., Wittec, P., and Agostinisa, P. (1998) Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis: Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Letters* 440 19-24

119. McCarron, P., A., Donnelly, R., F., Gilmore, B., F., Woolfson, A., D., McClelland, R., Zawislak, A., and Price, J., H. (2004) Phototoxicity of 5 Aminolevulinic Acid in the HeLa Cell Line as an Indicative Measure of Photodynamic Effect After Topical Administration to Gynecological Lesions of Intraepithelial Form. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 10.
120. Hahn, S., M., Smith, R., P., and Friedberg, J. (2001) Photodynamic Therapy for Mesothelioma. *Current Treatment Options in Oncology*, 2:375–383
121. Moghissi, K. and Dixon, K. (2005) Photodynamic therapy in the management of malignant pleural mesothelioma: A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 135—147.
122. Yong-Gang, Q., Xiu-Ping, Z., Jian, L. and Zheng, H. (2006) Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chinese Medical Journal*; 119(10):845-857.
123. Serman, D., H., Kaiser, L., R., and Albelda, S., M. (1999) Advances in the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *CHEST*; 116:504–520.
124. Saydan N, Salicio V, Cappelli-Gotzos B, and Gotzos V. (2001) Expression of calretinin in human mesothelioma cell lines and cell cycle analysis by flow cytometry. *Anticancer Res. Jan-Feb;21(1A):181-8.*
125. Freshney, R.I., (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3. Baski. Wiley-Liss. New York. USA.
126. Counting Cells with a Hemocytometer: Protocol. Erişim; <http://www.mnstate.edu/provost/CountingCellsHemocytometer.pdf>
127. The CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega. Erişim; www.promega.com
128. Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J., C., and Arnaud, P. (2002) Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* 25(12) 1600-1603
129. Non-coherent light sources for PDT. Erişim; <http://www.lumacare.com>
130. ApoStat Intracellular Caspase Detection (FITC-VD-FMK). Erişim; www.rndsystems.com/pdf/fmk012.pdf
131. Dougherty, T., J. (1993) Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 58,

- 895–900.
132. Dougherty, T., J., Gomer, C., J., Henderson, B., W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., and Peng, Q. (1998) Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 889–902.
 133. Atilla, D., Saydan, N., Durmuş, M., Gürek, A., G., Khan, T., Rück, A., Walt, H., Nyokong, T. and Ahsen, V. (2007) Synthesis and photodynamic potential of tetra- and octa-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 186 298–307.
 134. Atilla, D., Durmuş, M., Gürek, A., Ahsen, V., and Nyokong, T. (2007) Synthesis, photophysical and photochemical properties of poly(oxyethylene) substituted zinc phthalocyanines. *Dalton Trans.*, 1235-12.
 135. Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., and Ried, T. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research*, 59, 141-150,
 136. Human Cervical Adenocarcinoma Cells: HeLa Line. Erişim; <http://micro.magnet.fsu.edu>
 137. American Type Culture Collection. Erişim; www.atcc.org
 138. Bai, L., Wang, J., Yin, X., and Dong, Z. (2003) Analysis of apoptosis; Basic principles and procedures. *Essentials of Apoptosis* (Ming, X., Dong, Z., eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey.
 139. Brancalion, L. and Moseley, H. (2002) Laser and Non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 17:173–186
 140. Copyright © 2005 Lippincott Williams & Wilkins. Instructor's Resource CD-ROM to Accompany Porth's Pathophysiology: Concepts of Altered Health States, Seventh Edition.
 141. Flow Cytometry Software Workshop: 2000. Erişim; <http://jcsmr.anu.edu.au/facslab/analysis.html>
 142. Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C. and Kroemer, G. (2004) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death and Differentiation* 11, 591–595.
 143. Apoptosis. Erişim; <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html>