

Over Kanserine Yönelik Fotodinamik Terapi Temelli Kombinasyon Terapi Uygulaması

Photodynamic Therapy Based Combination Therapy Application for Ovarian Cancer

S. Sibel ERDEM^{1,2}

Vildan AKGUL OBEIDIN^{2,3}, Rabia Edibe PARLAR³, Ubeydullah ŞAHİN¹

1. İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

2. Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul, Türkiye

3. İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Kanser, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en ölümcül hastalıkların başında gelmektedir. Kanser, lokal, minimum yan etkiyle ve hedefe yönelik olarak tedavisi hasta için büyük önem taşımaktadır. Fotodinamik Terapi (FDT), lokal, fotokimya dayalı ve yan etkisi minimum olan bir tedavi yöntemidir. Özetle FDT, ışıqla aktive olan ilaç (fotosensitizer), ışıqla ve oksijenin birleşmesi sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin ve/veya tekil (singlet) oksijenin hücrede bir dizi zincir reaksiyon başlatarak hücre ölümüne sebep olması prensibine dayanır. Oksijen, ışıqla ve fotosensitizer tek başına herhangi bir toksik etki göstermeyip, ancak bir araya geldiklerinde başlayan fotokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan sitotoksikite sebebiyle hedeflenen hücrenin ölümü gerçekleşir. FDT'nin en önemli bileşeni hücre içinde, ışıqla enerjisini kimyasal enerjiye dönüştüren araç olan fotosensitizerdir. FDT'nin etkinliği farklı tedavi modelleri ile birleştirilerek artırılabilir. Kanser gibi dejeneratif hastalıkların genellikle birden fazla patolojik mekanizma içerdiklerini ve bu hastalıklarla tek tedavi yöntemiyle savaşmanın yeterli olmayacağını akıldta tutmak gerekir. Bu nedenle iki ya da daha fazla tedavi yönteminin eş zamanlı olarak kullanılması başarıyı artırmaktadır. Kombinasyon terapinin amacı kullanılan tedavi yöntemleri ve/veya ilaç ile hücredeki farklı sinyal yollarını dolayısı ile farklı hücre hasarı yollarını hedef alarak birden fazla mekanizmayı aktive ederek kanser hücrelerinin yok edilmesi ihtimalini artırmaktır. Bu bilgilerin ışığında FDT ve kemoterapiden oluşan yeni kombinasyon terapinin SKOV-3 over kanser hücre hattında etkisi araştırıldı. Özgün, suda çözünürlüğü yüksek fotosensitizer ile klinikte sıklıkla kemoterapi ilacı olarak kullanılan Irinotekan kullanıldı. FDT ve kemoterapiden oluşan kombinasyon terapinin uygulanan tedavinin sırasına bağlı olarak çok büyük değişiklik gösterdiği görüldü. Örneğin, FDT'nin önce uygulandığı durumda belirli ilaç dozlarında güçlü antagonist etki görüldü. Öte yandan, aynı ilaç konsantrasyonlarında yalnızca uygulama sırası değiştirilerek sinerjik etkinin elde edilebileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: fotodinamik terapi, over kanseri, SKOV-3, kombinasyon terapi, toksisite, ROS, irinotekan

ABSTRACT

Cancer is one of the most leading causes of death in Turkey as well as in the world. It is very critical to cure the cancer via targeted therapy that is locally applied and shows minimum side effects for patient's life quality. Photodynamic therapy (PDT) is a local, photochemistry based treatment, which has minimum side effects. In brief, PDT is a result of a combination of photosensitizer, a drug that is activated by light, light and oxygen that generates free radicals and/or singlet oxygen and starts series of reactions in cell and eventually cause cell death. While light, oxygen and photosensitizer has no cytotoxic effect alone, combination of three starts all photochemical reactions and as a result cytotoxicity is generated in the tissue. Photosensitizer, converting light energy to the chemical energy in the cell, is the most critical component of PDT. One way to improve effectiveness of PDT is to combine it with different treatment modalities. Cancer and other degenerative diseases involve several pathological mechanisms and require multiple treatment methods such as combination therapies. A combination therapy targets to bring together current therapies and/or drugs to act upon different cellular signaling pathways/ cell damage pathways thus activating various mechanisms in the cell increasing the success rate of the treatment. In the light of these information, a new combination therapy, based on PDT and chemotherapy, has been investigated towards SKOV-3 over cancer cell line. A novel and water-soluble photosensitizer and a chemotherapy drug called Irinotecan that is been used in clinic were employed. Our results showed that outcome of the combination therapy, which is composed of PDT and chemotherapy, highly depends on the order of the treatment. For instance, when PDT applied first, strong antagonism is observed at certain drug concentrations. On the other hand, synergism is observed using the same drug concentrations yet by only changing the order of the treatment.

Keywords: photodynamic therapy, ovarian cancer, SKOV-3, combination therapy, photosensitizer, toxicity, ROS, irinotecan

İletişim Bilgileri

Sorumlu Yazar: Yrd. Doç. Dr. S. Sibel ERDEM

Yazışma Adresi: İstanbul Medipol Üniv., Uluslararası Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-posta: serdem@medipol.edu.tr

Tel: +90 444 85 44, **Fax:** +90 (212) 531 75 55

Makale Geliş Tarihi: 30.06.2017

Makale Kabul Tarihi: 18.08.2017

DOI: http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.324853

Teşekkür;

İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi Dekanlığı'na maddi desteklerinden ötürü teşekkür ederiz.

GİRİŞ

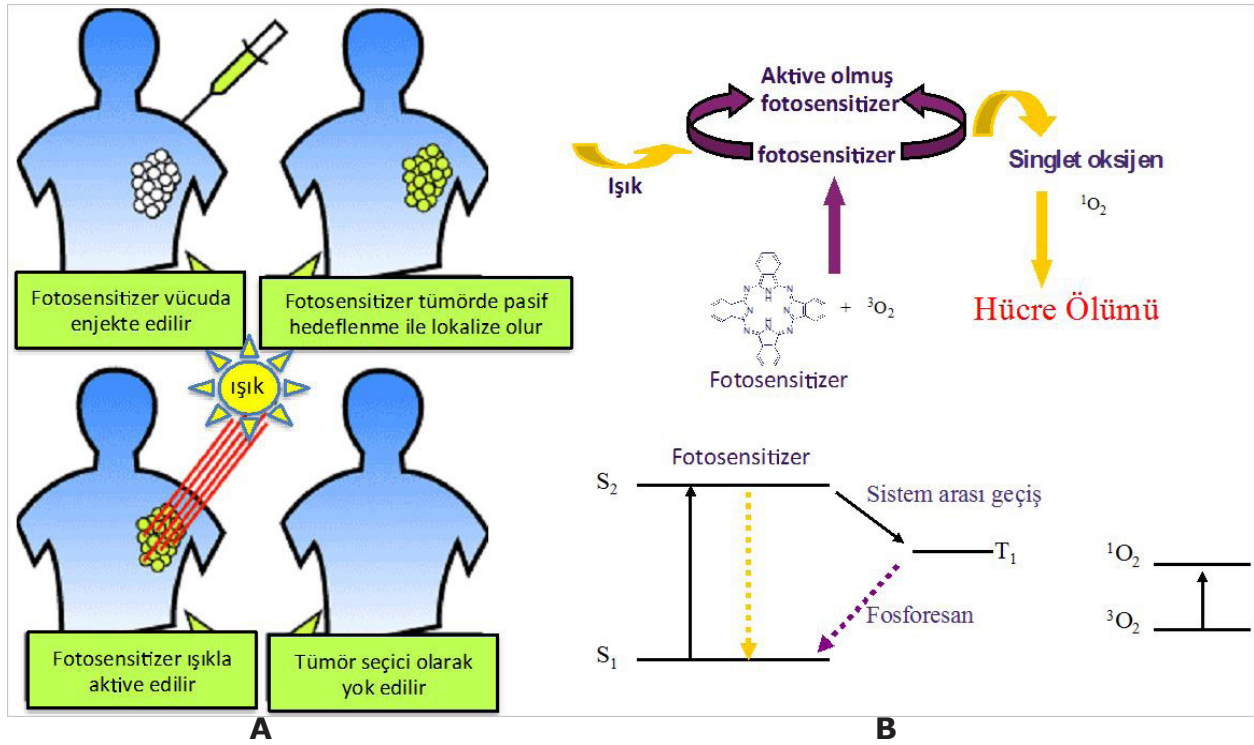
Son yıllarda kanserle ilgili bilimsel araştırmaların ve kansere karşı geliştirilen ilaçların sayısının hızla artmasına rağmen dünya halen farklı kanser türlerinin sebep olduğu milyonlarca ölüme şahitlik etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2012 yılında, dünyada kanserden hayatını kaybedenlerin sayısını 8.2 milyon, yeni kanserli vaka sayısını 14.1 milyon ve tanıdan itibaren son 5 yıl içinde kanserli vaka sayısını da 32.6 milyon olarak açıkladı (1). Bu rakamlara paralel olarak, ülkemizde de kanser vakaları ve kanserin sebep olduğu ölümler hızla artmaktadır. Sağlık Bakanlığı tarafından açıklanan rakamlara göre Türkiye'deki kanser görülme olasılığı 221.5/100000'dir (2). Kanser, bugün Türkiye'de ölüm oranlarında ikinci sırada yer alırken önümüzdeki senelerde nüfusun yaşlanması ile birlikte bu oranın ilk sıraya çıkacağı öngörülmektedir (2). Kanser türleri arasında over kanseri kadınlarda beşinci en sık görülen kanser türü olup, jinekolojik malin tümörlerin en ölümcül olanıdır. Yumurtalık kanserinde metastaz yüksek olasılık olduğundan erken tanı tedavinin başarılı olması açısından oldukça önemlidir. Örneğin, hastalık faz I safhasında teşhis edildiğinde hastanın 5 yıllık sağkalım oranı %90'ı geçerken, teşhis konduğunda kanser faz III ve ya faz IV safhasında ise sağ kalım oranı %20'nin altına düşmektedir (3). Geç kalınmış tanı ve metastazın yanı sıra kanserin tedavisinin bu denli zor olmasının en önemli sebeplerinden biri de, kanser hücrelerinin sürekli mutasyonu sonucu kemoterapi ilaçlarına karşı geliştirdikleri dirençtir. Bunun yansıya, sistematik bir tedavi yöntemi olan kemoterapinin yan etkileri hastanın yaşam kalitesini çok fazla düşürmekte, hastayı hem psikolojik hem de fizyolojik olarak yıpratmaktadır. Bu sebeple, minimum yan etkiyle maksimum fayda sağlanan yeni tedavi yöntemlerinin hızla geliştirilmesi gerekmektedir.

Kombinasyon terapi iki ya da daha fazla tedavi yönteminin eş zamanlı olarak kullanılması esasına dayanır (4). Kombinasyon Terapinin amacı kullanılan tedavi yöntemleri ve/veya ilaç ile hücredeki farklı sinyal yollarını/hücre hasarı yollarını hedef alarak birden fazla mekanizmayı aktive ederek kanser hücrelerinin yok edilmesi ihtimali arttırmaktır (4). Kanser tedavisinde de diğer medikal disiplinlerde olduğu gibi birden fazla ilaçla/terapiyle hastalığı hedef almak tedavinin başarısını arttırabilmektedir. Ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi kanserin geleneksel tedavi yöntemleridir fakat ameliyat dışındakilerin seçiciliği olmadığından, kullanılan ilaçlar sağlıklı hücre ile kanser hücrelerini ayırt etmeksizin ikisinde de aynı etkiyi gösterirler. Sağlıklı hücrelerin de hasar görmesi sonucu bu tedavi yöntemlerinin hastanın yaşam kalitesini etkileyen hatta bazı durumlarda tedavinin tamamlanmasına engel olan çok ciddi yan etkileri vardır. Bunun yanı sıra, kanser gibi dejeneratif hastalıklar genellikle birden fazla patolojik mekanizma içerdiklerinden bu hastalıklarla tek tedavi yöntemiyle savaşmak yeterli olmamaktadır. Bu sebepler kanserin tedavisi için farklı yöntemlerin kombine edilerek kullanılmasına ve geliştirilmesine yol açmıştır.

Yan etkisi minimum ve lokal tedavi yöntemi olan Fotodinamik Terapi (FDT)'nin kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, cerrahi gibi farklı tedavi yöntemleri ile kombine edilerek hem daha etkili sonuçlar elde edilmesi hem de kullanılan ilaçların yan etkilerinin azalması hedeflenmiştir. FDT'nin kullanıldığı kombinasyon terapilerden şimdiye kadar olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Özetle FDT, ışıkla aktive olan ilaç (fotosensitizer), ışık ve oksijenin birleşmesi sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin ve/veya tekil (singlet) oksijenin hücrede bir dizi zincir reaksiyon başlatarak apoptoza, nekroza ya da otofajiye sebep olması prensibine dayanır. Işık (genellikle 600-800 nm arası fotosensitizerin absorpsiyon spektrumu ile örtüşen dalga boyunda seçilir), oksijen ve fotosensitizer tek başına herhangi bir toksik etki göstermeyip, ancak bir araya geldiklerinde başlayan fotokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan sitotoksikite sebebiyle hedeflenen hücrenin ölümü gerçekleşir.

Mikro düzeydeki ya da metastaza uğramış tümörlerde, geleneksel cerrahi müdahaleler maalesef başarılı olamamaktadır. Kemoterapötik/radyoterapötik yaklaşımların ise ise şiddetli yan etkileri tedaviye dezavantaj sağlamaktadır. Ayrıca, ilaçlara direnç kazanan kanser hücrelerinin hastalığın tekrarında da büyük katkısı bulunmaktadır. FDT'nin geleneksel kanser tedavilerine göre birçok avantajı bulunmaktadır: Non-invazif ve lokal bir tedavi yöntemi olup birden fazla dozda tekrarlanabilir. Kanser hücrelerinin FDT'ye karşı direnç oluşturma riski de yoktur (5). FDT, kanserin yanı sıra dermatoloji, kalp damar hastalıkları ve göz hastalıklarının (Yaşa bağlı makula dejenerasyonu) tedavisinde de kullanılmaktadır. ABD, Almanya, Japonya, İngiltere, Fransa, Hollanda ve Kanada FDT'nin klinikte kullanılması için onay vermiştir (6). FDT, ışıkla aktive olan molekülün (fotosensitizer), oksijen varlığında ve uygun dalga boyundaki ışıkla aktivasyonu sonucu ortaya çıkan bir dizi fotokimyasal/fotofiziksel reaksiyonlara bağlı hücre ölümü prensibine dayanır. Klinikteki uygulamasında, fotosensitizer hastaya sistematik olarak enjekte edilip veya topikal olarak uygulanıp bir süre beklenerek (5 dakika ile 96 saat arasında) tümörlü bölgede lokalize olmasına fırsat verilir (Şekil 1a) (7). Görünür ışık yardımıyla (genellikle uzun dalga boylu kırmızı ışık kullanılır) aktive edilen fotosensitizer hücrede bir dizi fotokimyasal reaksiyonlar başlatarak hücre ölümüne sebep olur (Şekil 1b).

FDT'nin etkisi uyarılmış haldeki kararsız halde bulunan fotosensitizerin yapısındaki fazla enerjiyi farklı tip mekanizmalar aracılığı ile etraftaki moleküllere transfer etmesiyle gerçekleşir. İlk senaryoda fotosensitizer enerjisini bir proton/elektrona transfer ederek reaktif oksijen türleri (ROS) (hidrojen peroksit, superoksit, hidroksil radikali gibi) oluşturabilir. Diğer olasılık ise, fotosensitizerin enerjisini doğrudan moleküler oksijene transfer ederek tekil oksijen oluşturmaktır (8). Hücre ölümünde her iki olasılığında ortak etkisi olduğu bilinmekle birlikte, hangi senaryonun baskın olarak hücreyi ölüme götürdüğü kullanılan fotosensitizer, oksijen ve substrat



Şekil 1 a-b: Fotodinamik terapinin uygulaması (a) (7) ve Fotodinamik Terapinin basitleştirilmiş mekanizması (b) (8).

konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (9). Fotosensitizerin aktivasyonu ile oluşan tekil oksijen ve/veya hidroksil radikalleri çok reaktif olup oldukça kısa ömre (0,04 mikro saniye) sahiptirler. Dolayısı ile çok küçük alanda (0,02 μm) etkilidirler (10). Bu parametler FDT'nin lokal bir tedavi olduğu göstermektedir.

FDT'nin over kanseri üzerindeki farklı hücre hatlarında çalışmaları umut verici olmakla birlikte tek doz FDT ile çok yüksek oranlarda mortalite elde edilemediği görülmüştür (11-15). FDT'nin cerrahi, hipertermi, immunoterapi veya kemoterapi ile kombinasyon terapi çalışmalarının in vitro ve in vivo deneylerle tek tedavi yöntemine kıyasla daha başarılı olduğu saptanmıştır (16-18). Bu durum FDT'nin farklı tedavi yöntemleri ile birleştirilerek geliştirilecek yeni kombinasyon terapi çalışmalarının gerekli ve umut verici olduğunu göstermektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan özgün ftalosiyenin, laboratuvarımızda hazırlanarak FDT testleri bizim tarafımızdan yapılmıştır (19).

Hücre Kültürü Deneyleri

KOV-4 insan over kanser hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100U/ml Penisilin/Streptomisin içeren McCoy's 5A ile %5 CO_2 'li nemlendirilmiş ortamda 37°C 'de kültür edildi. Üç günde bir kültür besiyeri tazelendi.

Ftalosiyenin Karanlık Toksisite Tayini (19)

SKOV-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilip hücrelerin 24 saat

boyunca yapışması beklendi. Hücreler, 10 μM ile 100 μM arasında 5 farklı konsantrasyonda besiyeri içinde hazırlanan ftalosiyenin ile her bir kuyuya 200 μL eklenerek 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubu olarak, bir kuyu sadece hücre besiyeri ile inkübe edildi. Tüm gruplar üçlü tekrar halinde yapıldı. Ortamdan uzaklaştırılan ftalosiyenin ardından, her kuyuya 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda 0.1 μL 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromit (MTT) içeren hücre besiyerinden 200 μL eklendi ve 37°C 'de 3 saat inkübe edildi. Ortamdan uzaklaştırılan MTT çözeltisinin ardından her bir kuyuya 200 μL DMSO eklenip 300 rpm'de 20 dakika çalkalanarak canlı hücreler tarafından oluşan formazanın çözülmesi sağlandı ve 570 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümü plaka ölçer ile yapıldı.

Ftalosiyenin Fototoksisite Tayini (19)

SKOV-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilip hücrelerin 24 saat boyunca yapışması beklendi. 1 μM ile 100 μM konsantrasyon aralığında altı farklı konsantrasyonda hücre besiyeri kullanılarak hazırlanan ftalosiyenin çözeltisi her bir kuyuya 200 μL eklenerek 24 saat boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol grubu olarak, bir kuyu sadece hücre besiyeri ile inkübe edilirken pozitif kontrol grubu %0.25 Triton-X ile inkübe edildi. Üçüncü kontrol grubu ise, sadece hücre besiyeri ile inkübe edilerek diğer gruplarla birlikte aynı dozdaki ışığa maruz bırakılan grup olarak belirlendi. Tüm gruplar üçlü tekrar halinde yapıldı. 24 saat inkübasyonun ardından hücre ortamları taze besiyeri ile değiştirilerek 5 J'lük ışık şiddeti ile FDT uygulandı. Ortamdan uzaklaştırılan ftalosiyenin çözeltisinin ardından her bir kuyuya 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda 0.1 μL 3-(4,5-dimetil

tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) içeren besiyerinden 200 µL eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Ortamdan uzaklaştırılan MTT çözeltisinin ardından her bir kuyuya 200 µL DMSO eklenip 300 rpm'de 20 dakika çalkalanarak canlı hücreler tarafından oluşan formazanın çözülmesi sağlandı ve 570 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümü plaka ölçer ile yapıldı. IC50 değerleri hesaplanırken, %0,25 Triton-X ile muamele edilen hücrelerin sağkalım oranı %0, hücre besiyeri ile muamele edilen hücrelerin sağ kalım oranı da %100 kabul edilip, diğer değerler kontrol değerlerine göre normalize edilmiştir (12).

Irinotekan'ın Toksikite Tayini

SKOV-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilip hücrelerin 24 saat boyunca yapışması beklenildi. 1 µM ile 100 µM konsantrasyon aralığında altı farklı konsantrasyonda hücre besiyeri kullanılarak hazırlanan irinotekan çözeltisi her bir kuyuya 200 µL eklenerek 24 saat boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol grubu olarak, bir kuyu sadece hücre besiyeri ile inkübe edilirken pozitif kontrol grubu %0,25 Triton-X ile inkübe edildi. Üçüncü kontrol grubu ise, sadece hücre besiyeri ile inkübe edilerek diğer gruplarla birlikte aynı dozdaki ışığa maruz bırakılan grup olarak belirlendi. Tüm gruplar üçlü tekrar halinde yapıldı. Ortamdan uzaklaştırılan irinotekan çözeltisinin ardından her bir kuyuya 5 µg/mL konsantrasyonunda 0.1 µL 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) içeren besiyerinden 200 µL eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Ortamdan uzaklaştırılan MTT çözeltisinin ardından her bir kuyuya 200 µL DMSO eklenip 300 rpm'de 20 dakika çalkalanarak canlı hücreler tarafından oluşan formazanın çözülmesi sağlandı ve 570 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümü plaka ölçer ile yapıldı. IC50 değerleri hesaplanırken, %0,25 Triton-X ile muamele edilen hücrelerin sağkalım oranı %0, hücre besiyeri ile muamele edilen hücrelerin sağ kalım oranı da %100 kabul edilip, diğer değerler kontrol değerlerine göre normalize edilmiştir (12). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre canlılığının kabul edilebilir şekilde değişmediği görülerek aynı işlemler irinotekan çözeltisinin 50-500 µM arasında hazırlanıp uygulanmasıyla tekrar edilmiş ve IC50 değeri hesaplanmıştır.

Kombinasyon Terapi

Kombinasyon terapi sıraya bağlı olarak 3 farklı deney planı ile uygulandı: 1) Ftalosiyanin önce, 2) irinotekan önce, 3) eş zamanlı uygulama. Her 3 uygulama için de öncelikle belirlenen IC50 değerleri X olarak kabul edilerek, sabit katsayılar ile bir doz aralığı belirlendi; 0.125X - 0.25X - 0.5X - X - 1.5X - 2X - 2.5X.

Her üç deney planı için de öncelikle SKOV-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilip hücrelerin 24 saat boyunca yapışması beklenmiş ve ardından belirtilen konsantrasyon aralığında yedi farklı konsantrasyonda

hücre besiyeri kullanılarak hazırlanan çözeltiler her bir kuyuya 200 µL eklenerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak, bir kuyu sadece hücre besiyeri ile inkübe edilirken pozitif kontrol grubu %0,25 Triton-X ile inkübe edildi. Tüm gruplar üçlü tekrar halinde yapıldı.

Ftalosiyaninin önce uygulandığı deney planında, belirlenen konsantrasyon aralığında yedi farklı konsantrasyonda hücre besiyeri kullanılarak hazırlanan ftalosiyanin çözeltisi 24 saat inkübasyonun ardından hücre ortamları taze besiyeri ile değiştirilerek 5 J'lük ışık şiddeti ile FDT uygulandı. Ortamdan uzaklaştırılan ftalosiyanin çözeltisinin ardından her bir kuyuya irinotekan ile hazırlanmış besiyerleri ilave edildi, burada önemli nokta her kuyuya aynı katsayı ile hazırlanmış dozların uygulanmasıdır. Hücrelerin irinotekan çözeltisi ile 24 saat inkübasyonunun ardından daha önceki rutin prosedür takip edilerek MTT analizleri gerçekleştirildi.

Irinotekan'ın önce uygulandığı deney planında ise, hücrelere öncelikle belirtilen katsayılar ile besiyeri kullanılarak hazırlanmış irinotekan çözeltisi ile 24 saat muamele edildi. Ardından irinotekan içeren besiyeri, yine aynı kuyuda aynı katsayı ile hazırlanmış ftalosiyanin çözeltisi ile değiştirilerek 24 saat 37°C 'de inkübe edildi. Ardından hücre ortamları taze besiyeri ile değiştirilerek 5 J'lük ışık şiddeti ile FDT uygulandı. Hücrelerin 24 saat inkübasyonunun ardından daha önceki rutin prosedür takip edilerek MTT analizleri gerçekleştirildi.

Son olarak eş zamanlı uygulanan kombinasyon terapi için de aynı işlemler uygulandı. Ancak bu durumda her iki ilaç da aynı anda uygulandı. Burada diğer iki uygulamadan farklı olarak ilaçlar aynı anda verildiği için konsantrasyonlar her kuyu için belirlenen konsantrasyonların iki katı şeklinde hazırlanarak 100'er µL şeklinde uygulanmıştır. Hücrelerin 24 saat inkübasyonunun ardından hücre ortamları taze besiyeri ile değiştirilerek 5 J'lük ışık şiddeti ile FDT uygulandı. Hücrelerin 24 saat inkübasyonunun ardından daha önceki rutin prosedür takip edilerek MTT analizleri gerçekleştirildi.

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'nin DCF ile Analizi

Çalışma yalnızca ftalosiyanin, yalnızca irinotekan ve analizler sonucunda sonucu potansiyel olarak en verimli uygulama olan irinotekan önce uygulanmasını esas alan kombinasyon terapisinin ROS oluşumuna etkisini araştırmaya yönelik olarak 3 plaka şeklinde tasarlandı. SKOV-3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilip hücrelerin fenol kırmızısı (phenol red) ve FBS (fetal sıgır serumu) içermeyen besiyeri ile 24 saat boyunca yapışması beklenildi. Ardından ROS Deteksiyon Kiti (ab113851 DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, Abcam), üreticinin talimatları uygulanarak 10X lik çalışma çözeltisi ile 1X lik çalışma çözeltisi hazırlanarak alikotlandı. Kitin içerisinde bulunan DCFDA çözeltisi üreticinin yüzeye tutunan (adherent) hücreler için tavsiyesine göre 30 µM konsantrasyonunda hazırlandı.

24 saat bekletilerek yüzeye tutunan hücrelerin besiyeri çekilerek 100 er μL çalışma çözeltisi ile yıkandı.

Ardından 100 er μL 30 μM DCFDA çözeltisi ile 1 saat 37°C de karanlık ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol grubu olarak, bir kuyu sadece hücre besiyeri ile inkübe edilirken pozitif kontrol grubu ise %75 ve %50 lik H_2O_2 çözeltisi ile inkübe edildi. Tekrardan çalışma solüsyonu ile yıkanan hücrelere deney planına uygun olarak sıraya bağlı kombinasyon terapi uygulandı. Plaka okuyucu ile üretici firmanın önerdiği değerler kullanılarak (Ex. 485 nm Em. 535 nm) okuma yapıldı.

BULGULAR

Yapısına dört adet karboksilik asit eklenerek sudaki çözünürlüğü yüksek oranda arttırılan özgün ftalosiyanın FDT’de kullanılmak üzere uzun dalga boyunda absorpsiyon yapan (690 nm) fotosensitizer olarak geliştirildi (Şekil 2) (19). Fotosensitizerin, 24 saatlik inkübasyon ardından SKOV-3 hücrelerine karşı 100 μM ’a kadar toksisite göstermediği ancak 5J şiddetindeki ışıkla aktive edildiğinde ise konsantrasyonla doğru orantılı olarak fototoksitesinde artış olduğu görüldü. Yapılan detaylı testler sonucu IC50 değeri 79 μM olarak belirlenmiştir (18).

Bir önceki çalışmamızda elde edilen bu veriler, FDT ve kemoterapiden oluşan yeni kombinasyon terapi uygulaması için temel oluşturmuştur. Günümüzde kolon, akciğer ve over kanserinin kemoterapi ile tedavisinde sıkça kullanılan Irinotekan’ın SKOV-3 hücre hattında 24 saat inkübasyon sonucunda IC50 değeri 330 μM olarak belirlendi (Şekil 3). Her iki ilaç için ayrı ayrı elde edilen IC50 değerleri kullanılarak kombinasyon terapi çalışmaları yapıldı.

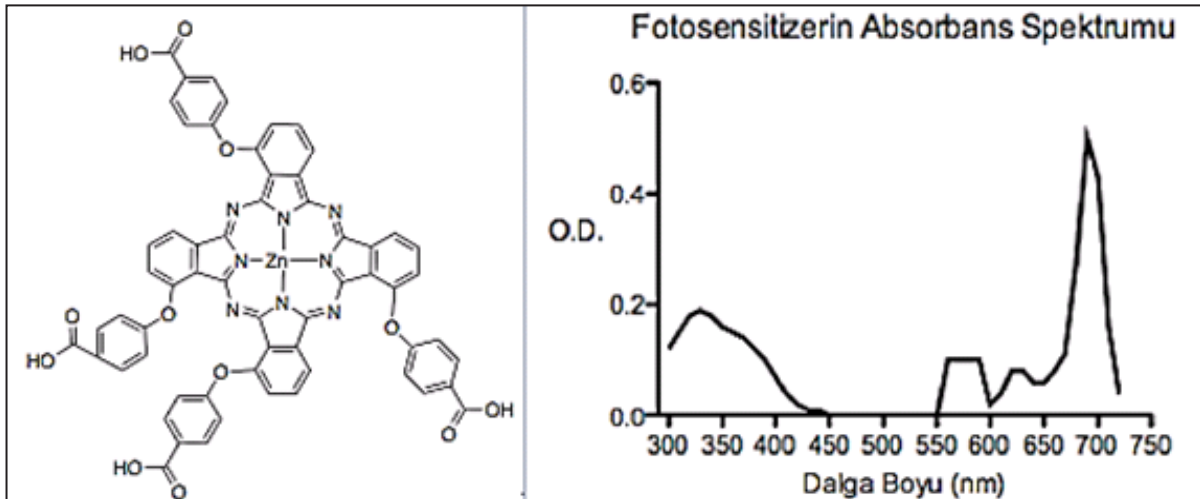
Kombinasyon terapide, uygulanan FDT ve kemoterapinin sıraya bağlı etkisini incelemek için üç farklı deney grubu oluşturuldu: İlk deney grubunda ilk olarak kemoterapi ardından FDT, ikinci grupta önce FDT daha sonra kemoterapi, üçüncü grupta ise her iki yöntem eş zamanlı olarak uygulandı.

Her deney grubu için hücrelerin canlılığı ayrı ayrı test edildi (Şekil 4).

Farklı kombinasyon terapi uygulamalarında kullanılan ilaç dozlarında ve iki ilaç/tedavi yöntemi arasında sinerjik ya da antagonist bir etki olup olmadığı sinerjik etkinin etkileşim indeksinin (CI) izobologram metodu kullanılarak hesaplanması ile bulundu. Bunun için izobologram metodunu temel alarak geliştirilmiş bir yazılım olan CompuSyn programından faydalandı (20). Kombinasyon terapinin etkisi, izobologram metot kullanılarak analiz edildiğinde FDT’nin önce uygulandığı grupta hem teorik hem de deneysel hesaplar sonucunda tüm ilaç dozlarında iki ilaç/yöntem arasında kuvvetli antagonist etki olduğu görüldü. SKOV-3 hücrelerinin Irinotekan (kemoterapi) ve ftalosiyanın (FDT) ile aynı anda inkübe edilerek FDT yapıldığı grupta, en düşük iki konsantrasyon değerinde sinerjik etki, diğer tüm yüksek dozlarda ise antagonist etki görüldü. Irinotekan’ın ilk, PDT’nin ikinci olarak uygulandığı kombinasyon terapide ise teorik hesaplamalarda birden fazla konsantrasyon değerinde sinerjik etkiye rastlandı. (Tablo 1) Ayrıca, deneysel sonuçlarda da teorik hesaplamalara paralel olarak sinerjik etki olduğu görüldü. ROS analizleri doğrultusunda ftalosiyanın ve kombinasyon terapinin uygulandığı gruplarda konsantrasyonlar arasında anlamlı bir farklılık görülmemekteyken, yalnızca Irinotekan’ın uygulandığı grupta 0.5X konsantrasyona kadar lineer bir artış ve sonrasında ise stabile olmuş ROS değerleri bulunmuştur (Şekil 5).

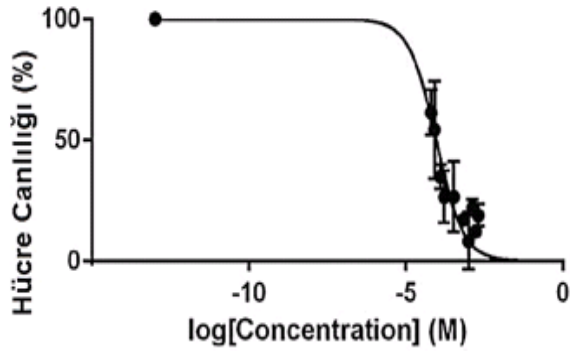
TARTIŞMA

Başarılı bir kombinasyon terapinin temelinde birbirinden farklı mekanizmada etki gösteren birden fazla ilaç kullanmak bulunmaktadır. Böylece farklı sinyal yollarının aktivasyonu/deaktivasyonu sonucu hücre ölümünün maksimuma ulaşması hedeflenir. Bu prensip göz önüne alınarak, topoisomera I enzim inhibitörü Irinotekan ile hücre içinde ROS ve/veya tekil oksijen üretimi esasına dayanan FDT kombinasyon terapinin bileşenleri olarak seçilmiştir. In vitro çalışmalar epitelyal over kanserine ait SKOV-3 hücre hattında yapılmıştır. Bu hücre hattının metastaz yapan birçok over kanserinde görüldüğü, tümör nekroz faktörüne ve farklı kemoterapi ilaçlarına (cis-platin ve doxorubicin) direnç gösterdiği bilinmektedir. Uygulanan kombinasyon terapinin yüksek dirençli SKOV-3 hücre hattındaki



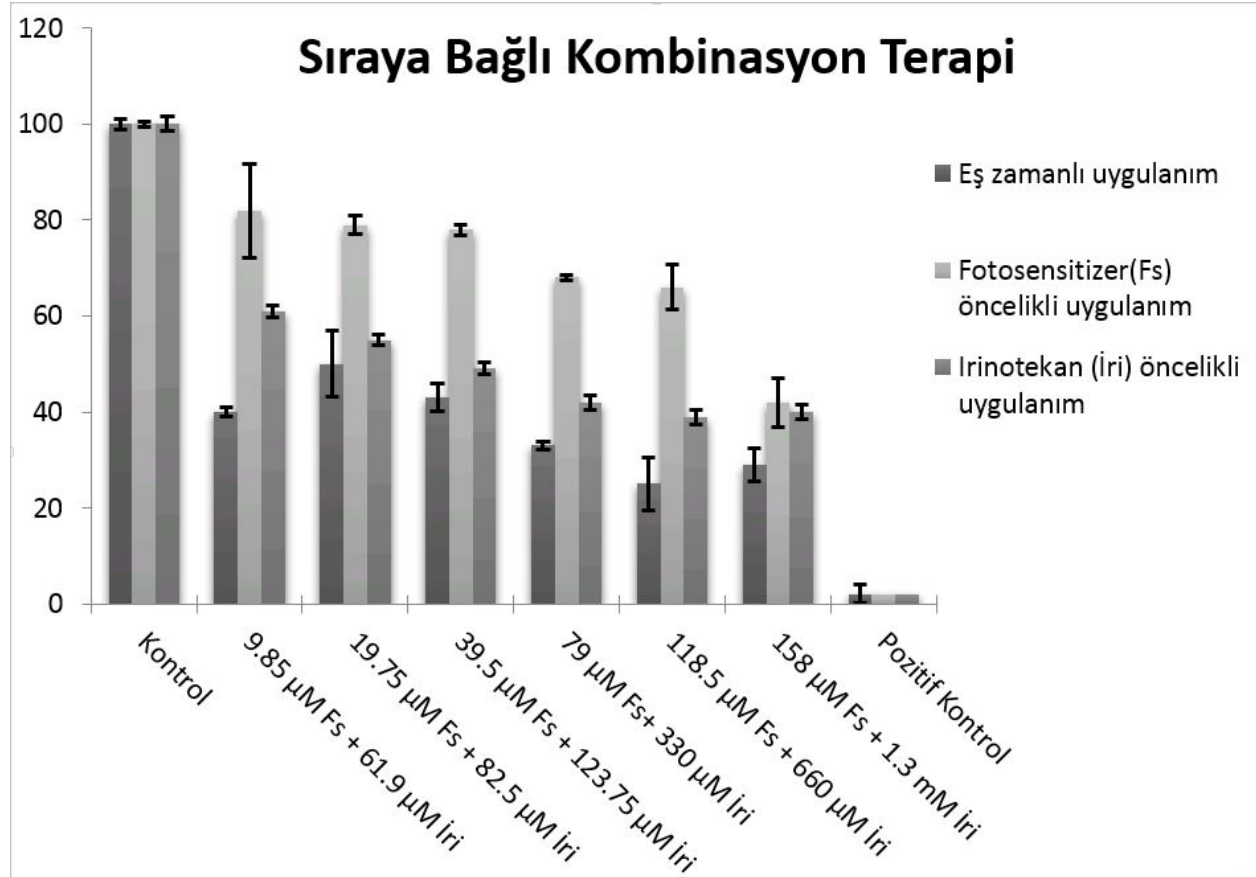
Şekil 2: Fotosensitizer olarak geliştirilen özgün ftalosiyanın yapısı ve absorbens spektrumu.

etkisinin incelenmesi için ilk bileşen olarak suda yüksek çözünürlüğü olan (fotosensitizerin biyolojik sistemde istenilen dokuya transferi için önemli) ve seçilen hücre hattında karanlıkta $100 \mu\text{M}$ 'a kadar toksisite göstermeyip uzun dalga boyunda (690 nm, şekil 2) absorpsiyon yapan fotosensitizer seçilmiştir (Şekil 2). FDT'de kullanılan ışığın dalga boyu ile ışığın ulaştığı dokunun derinliği doğru orantılı olduğundan uzun yakın kızıl ötesi absorpsiyon yapan fotosensitizerin kullanılması avantaj sağlamaktadır. Seçilen ftalosiyaninin 5J şiddetinde ışıkla aktive edildiğinde toksisite sonucu hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür. IC₅₀ değeri $79 \mu\text{M}$ olarak belirlenen ftalosiyaninin IC₅₀ değerini ışık dozu- nu arttırarak biraz daha düşük değerlere çekmenin mümkün olacağını düşünmekteyiz. Kombinasyon terapinin bir diğer bileşeni olarak seçilen kemoterapi ilacı Irinotekan'ın bağışıklık sistemini düşürme, bulantı, anemi, ishal, saç ve kilo kaybı gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır.



Şekil 3: Irinotekan'ın SKOV-3 hücre hattında sitotoksitesisi.

Geliştirilmeye çalışılan in vitro kombinasyon terapi ile, Irinotekan'ı minimum konsantrasyonda kullanarak hem tedavinin verimini arttırmak hem de yan etkileri minimuma düşürmek hedeflenmektedir. Uygulanan kombinasyon terapide, tüm deney gruplarında her iki ilacın konsantrasyonu IC₅₀ değerlerinin katları şeklinde olup birbirlerine oranı 1:3.4 olacak şekilde hazırlandı. Sıraya bağlı yapılan kombinasyon terapide, uygulanan yöntemlerin sırasının tedavinin sonucuna çok büyük etken olduğu görüldü. Hem teorik hem deneysel sonuçların birbirine paralel olması, yapılan üç farklı deney grubunda deneysel sonuçlara göre en başarılı, teorik sonuçlar göz önüne alındığında da en umut verici neticenin Irinotekan'ın ilk uygulandığı grup olduğu belirlendi. Bu ayırım yapılırken etkileşim indeks (kombinasyon indeks, CI) değerleri göz önüne alındı (Tablo 1). CI>1 ise antagonist, CI=1 ise ekleyici, CI<1 ise sinerjik etki olduğu bilinmektedir (20). CI değeri 1'den ne kadar küçükse, iki ilaç/tedavi yöntemi arasında o kadar güçlü sinerjizm bulunmaktadır. Öte yandan, CI değeri 1'den uzaklaştıkça, iki ilaç/yöntem arasındaki antagonist etki doğru orantılı olarak artmaktadır. Hem teorik hesaplamalar da hem de deneysel sonuçlarda görüldüğü gibi, fotosensitizerin ilk olarak uygulandığı deney grubunda iki ilacın birbirine antagonist etki yaptığı ve bu sıralamanın kombinasyon terapi için uygun olmadığına karar verildi. Her iki ilacın da aynı anda uygulandığı durumda ise, uygulanan dozlarda iki ilaç arasında sinerjik etkinin olduğu iki doz belirlendi (Tablo 1). Ancak, teorik hesaplamalar dikkate alındığında, bu iki ilaç arasında çok düşük sinerjik etkinin olduğu buna bağlı hücre ölümünün de %20'yi geçmediği görüldü (Tablo 2).



Şekil 4: Sıraya Bağlı Kombinasyon Terapinin Hücre Canlılığı Analizleri.

Tablo 1: Sıraya bağlı kombinasyon terapinin deneysel kombinasyon indeks ve hücre hasarı sonuçları.

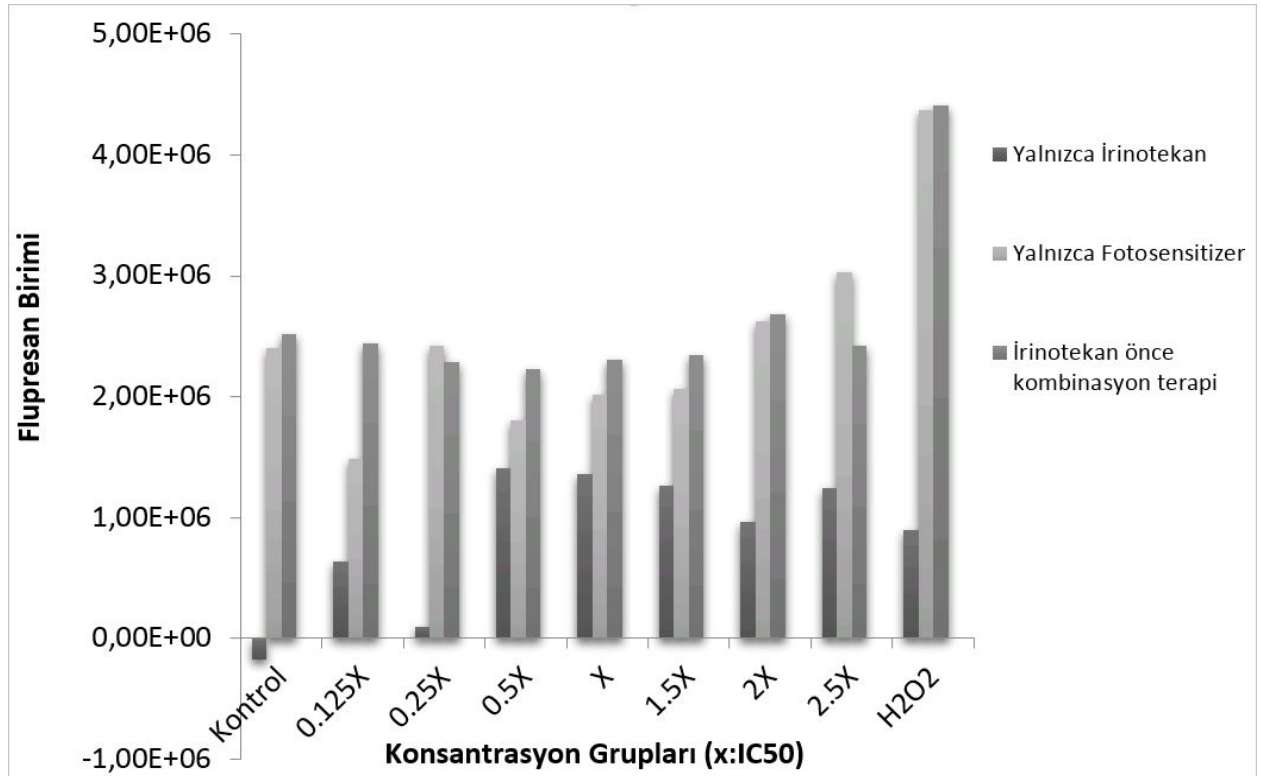
	Fs (µM)	Iri (µM)	Fa (%) ^a	Fa (%) ^b	Fa (%) ^c	CI ^a	CI ^b	CI ^c
1 (0.125X)	9.88	61.9	54	58	71	7.32	5.55	2.12
2 (0.25X)	19.75	82.5	60	34	75	3.85	24.9	1.21
3 (0.5X)	39.5	123.7	61	32	67	2.69	22.1	1.74
4 (X)	79	330	58	22	57	2.21	38.4	2.37
5 (1.5X)	118.5	660	51	21	43	1.78	21.6	3.15
6(2X)	158	1320	45	18	50	1.36	15.6	0.96
7 (2.5X)	197.5	1650	39	18	40	0.98	7.8	0.98

Iri: İrinotekan; Fs: Fotosensitizer Fa %a: İrinotekan'ın önce uygulanması sonucu canlılığını yitiren hücrelerin % miktarı. Fa %b: Fotosensitizerin önce uygulanması sonucu canlılığını yitiren hücrelerin % miktarı. Fa %c: İrinotekan'ın ve Fotosensitizerin eş zamanlı uygulanması sonucu canlılığını yitiren hücrelerin % miktarı. CIa : İrinotekan'ın önce uygulanması sonucu Etkileşim İndeksi (kombinasyon indeks). CIb : Fotosensitizerin önce uygulanması sonucu Etkileşim İndeksi. CIc: İrinotekan ve Fotosensitizerin eş zamanlı uygulanması sonucu Etkileşim İndeksi.

Tablo 2: Sıraya bağlı kombinasyon terapinin teorik kombinasyon indeks ve hücre hasarı sonuçları.

Konsantrasyon	Fa (%) ^a	CI ^a	Fa (%) ^c	CI ^c
0.62 nM Fs + 2.13 nM Iri	5	0.0103	5	1.015
10.32 nM Fs+ 35.08 nM İri	10	0.033	10	0.9436
58.6 nM Fs + 199.3 nM İri	15	0.7192	15	0.9537
0.22 µM Fs + 0.74 µM İri	20	0.1332	20	0.9902
0.63 µM Fs + 2.2 µM İri	25	0.2256	25	1.0405
1.64 µM Fs + 5.57 µM İri	30	0.3622	30	1.0002
3.85 µM Fs + 13.1 µM İri	35	0.5619	35	1.1684
8.6 µM Fs + 29.2 µM İri	40	0.8539	40	1.2451
18.6 µM Fs + 63 µM İri	45	1.2829	45	1.3314

Iri: İrinotekan; Fs: Fotosensitizer Fa %a: İrinotekan'ın önce uygulanması sonucu canlılığını yitiren hücrelerin % miktarı. CIa :İrinotekan'ın önce uygulanması sonucu Etkileşim İndeksi. Fa %c: İrinotekan ve Fotosensitizerin eş zamanlı uygulanması sonucu canlılığını yitiren hücrelerin % miktarı. CIc :İrinotekan ve Fotosensitizerin eş zamanlı uygulanması sonucu Etkileşim İndeksi.

**Şekil 5:** İlaçların tek başlarına uygulanması ve kombinasyon terapi sonucu oluşan ROS tayini.

Bu nedenle, deneysel verilerin de teorik verilere paralellik gösterdiği, ve sinerjik etkinin İrinotekan'ın ilk önce uygulandığı kombinasyon terapi seçeneğinin daha umut verici olduğu düşünüldü. Yalnızca sıralamanın değiştirilmesi ile bazı durumlarda kuvvetli antagonizmin sinerjizime dönüştüğü görüldü. Teorik hesaplamalarda da görüldüğü gibi, İrinotekan'ın ilk uygulandığı grupta, 8 konsantrasyon değerinde sinerjik etki görülmektedir (Tablo 2).

Sinerjik etkinin olduğu en yüksek hücre hasarının (%40) 29.2 μ M İrinotekan ve 8.6 μ M fotosensitizer kullanılarak elde edilebileceği teorik hesaplamalar sonucu görüldü. Öte yandan, aynı konsantrasyon değerlerinde ilaçlar ayrı ayrı uygulandıklarında ise hücre ölümünün sırasıyla %15 ve %18 olduğu belirlendi. gösterildi. ROS oluşumunun özellikle fotosensitizerin bulunduğu durumlarda konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermemesi fotosensitizerin FDT'de tekil oksijen üretimi üzerinden etkili olduğuna işaret etmektedir.

Tüm veriler, kombinasyon terapinin teorik dataya göre optimize edilip, hem kullanılacak olan İrinotekan'ın dozunu azaltarak yan etkilerini minimuma indirmenin hem de hücre ölümünü maksime etmenin mümkün olacağını göstermektedir. Ayrıca, uygulanan terapinin etkisini, kullanılan ışığın şiddetini artırarak ve/veya fotosensitizerin hücre içine alınımını ilaç taşıma sistemleri kullanılarak indüklemenin kombinasyon terapiye de olumlu katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Who Healty Organization. Cancer. 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. 12 Haziran 2017 tarihinde erişildi.
2. Başaran, B. B., C. Güler, Z. Eryılmaz, G. K. Yentur, E. Pulgat. T.C. Sağlık Bakanlığı İstatistikleri Yıllığı. 2012. Ankara: T. C. Sağlık Bakanlığı.
3. Mir, Y., Elrington, S. A., & Hasan, T. A new nanoconstruct for epidermal growth factor receptor-targeted photo-immunotherapy of ovarian cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013; 9(7), 1114-1122.
4. Postiglione, I., Chiaviello, A., Palumbo, G. Enhancing Photodynamic Therapy Efficacy by Combination Therapy: Dated, Current and Oncoming Strategies. *Cancers*. 2011; 3(2), 2597-2629.
5. Wilson, B. C., & Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in medicine and biology*. 2008; 53(9), R61.
6. Zheng H. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2005; 4, 283.
7. <http://www.moderncancerhospital.com/cancer-treatments/photodynamic-therapy/> Türkçeleştirilmiştir. 26 Haziran 2017 tarihinde erişildi
8. Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S. I., Ikeda, A., John, T. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2011; 12(1), 46-67.
9. Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(7), 535-545.
10. Moan, J., Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*. 1991; 53, 549-553.
11. Hahn, S. M., Putt, M. E., Metz, J., Shin, D. B., Rickter, E., Menon, C., Busch, T. M. Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(18), 5464-5470.
12. DeLaney, T. F., Smith, P. D., Thomas, G. F., Tochner, Z. A., Sindelar, W. F., Pass, H. I., and Mitchell, J. B. A light-diffusing device for intraoperative photodynamic therapy in the peritoneal or pleural cavity. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1991; 9(5), 361-366.
13. Hendren, S.K., Hahn, S.M., Spitz, F.R., Bauer, T.W., Rubin, S.C., Zhu, T., et al. Phase II trial of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Ann Surg Oncol*. 2001; 8, 65 – 71.
14. Wierrani, F., Fiedler, D., Grin, W., Henry, M., Dienes, E., Gharahbaghi, K., Grünberger, W. Clinical effect of mesotetrahydroxyphenylchlorine based photodynamic therapy in recurrent carcinoma of the ovary: preliminary results. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1997; 104(3), 376-378.
15. Goff, B.A., Blake, J., Bamberg, M.P., Hasan, T. Treatment of ovarian cancer with photodynamic therapy and immunoconjugates in a murine ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 1996; 74, 1194-1198.
16. Rizvi, I., Celli, J.P., Evans, C. L., Abu-Yousif, A.Y., Muzikansky, A., Pogue, B.P., Finkelstein, D., Hasan, T. Synergistic Enhancement of Carboplatin Efficacy with Photodynamic Therapy in a Threedimensional Model for Micrometastatic Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 2010; 70, 22, 9319-9328
17. Kim, Y.W., Bae, S.M., Battogtokh, G., Bang, H.J., Ahn, W.S. Synergistic anti-tumor effects of combination of photodynamic therapy and arsenic compound in cervical cancer cells: in vivo and in vitro studies. *PLOS One*. 2012; 7(6): e38583
18. Wei, X.Q., Ma, H.Q., Liu, A.H., Zhang Y.Z. Synergistic anticancer activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in combination with low-dose cisplatin on Hela cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013; 14 (5), 3023-8.
19. Erdem, S. S., Parlar, E. R., Obeidin, V. A. ve Şahin, U. Skov-3 over kanseri hücre hattında fotodinamik terapi uygulaması. *Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 2017; basım aşamasında
20. Chou, T.C., and Talalay, P. Quantitative analysis of dose effect relationship: The combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul*. 1984; 22, 27-55.