



İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Metilen Mavisi Aracılı Fotodinamik Terapi(FDT) Methylene Blue-Related Photodynamic Therapy (PDT) In Human Colon Cancer Cells

Ayla EREN ÖZDEMİR ve Büşra GÜNOĞLU

Sakarya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO

Biyomedikal Mühendisliği Yüksek Lisans Programı, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Sakarya, Türkiye

aylae@sakarya.edu.tr, busra.gunoglu@ogr.sakarya.edu.tr

Özetçe —Kanser, günümüzde tedavisi bulunamamış bir hastalıktır. Kolorektal kanser (CRC), dünyadaki en yaygın kanserlerden biridir. Erken tam için taramadaki gelişmelere rağmen, kolorektal kanser, kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Kanserinin erken safhasında takip, ilaç kullanımı, diğer safhalarında ise cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu kanser tedavileri hastayı çok yıpratmakta ve ciddi yan etkiler oluşturmaktadır. Fotodinamik tedavi kanser tedavisinde kullanılan, yan etkisi az olan bir tedavi yöntemidir. Fotosensitizanın kanserli dokuda birikmesi ve dokunun ışıkla uyarılmasıyla fotokimyasal reaksiyonlar başlar. Bu reaksiyonlar sonucunda kanserli hücrelerin ölümü gerçekleşir. FDT'nin temel prensibi bu mekanizmaya dayanır. Diğer kanser tedavilerinde olduğu gibi yan etkileri yoktur. Bununla beraber sadece kanserli hücreyi seçebilme avantajına sahiptir. Bu çalışmada, in vitro olarak HT-29 kolon kanseri üzerinde metilen mavisi (MB) aracılı fotodinamik terapinin etkileri araştırılmıştır. FDT sonunda kontrol grubu ile tedavi grubu karşılaştırıldığında %80 oranında ölüm gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler—Fotodinamik terapi, metilen mavisi, kolon kanseri.

Abstract—Cancer is a disease that has never been treated yet. Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer in the World. Despite advances in screening for early diagnosis, colorectal cancer is one of the leading causes of cancer deaths. Drug is used in the early stage of cancer and patient follow-up is performed. Photochemical reactions begin by the accumulation of photosensitizers in the cancerous tissue when induced by light stimulation. As a result of these reactions, cancer cells become apoptosis. There are no side effects as in other cancer treatments. Photodynamic therapy has the advantage of being able to select cancerous cell without harming other tissues. In this study, the effects of methylene blue on HT-29 colon cancer cells were investigated. At the end of the study, control group and treatment group were compared. The mortality rate was 80%.

Keywords—Photodynamic therapy, methylene blue, colon cancer.

I. GİRİŞ

Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türü dağılımında kolon kanseri üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya çapında kansere bağlı ölümün dördüncü nedeni olduğundan, önemli bir halk sağlığı sorunudur [1][2]. Günümüzde kolorektal kanser için kullanılan geleneksel tedaviler cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapidir. Cerrahi rezeksiyon kolorektal kanser için standart ve en etkili tedavi yöntemi olarak bilinir ve 5 yıllık genel sağkalım oranı yaklaşık % 65'dir. Ancak, cerrahi müdahalede yüksek riskler görülebilir. Geleneksel tedavilerin kısıtlılıkları nedeniyle, çevredeki normal hücrelere zarar vermeden ve bağırsak duvarının delinme olasılığını en aza indirmeden kanser hücrelerinin yok edilmesini artırma umuduyla yeni tedavi stratejileri araştırılmaktadır [3]. Bu terapötik stratejilerden biri, çeşitli kanser türleri için umut verici bir tedavi olan fotodinamik tedavidir (PDT/FDT). FDT, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmak için ışıkla aktive olan molekül (fotosensitizan, Fs), fotosensitizana uygun dalga boyundaki ışık ve oksijen arasındaki etkileşimleri kullanarak hücrenin ölümü prensibine dayanır. FDT sonrası tümör dokusunun nekrozu hızlı ve geri döndürülemez bir işlem olup, sonuçta tedavi edilen kişiyi tedavi edebilir veya tümör büyümesini yavaşlatabilir. Bu etkilere, fotodinamik reaksiyonlar üzerine üretilen oksijen radikalleri veya tekli oksijen yol açar [4]. FDT de kullanılan fotosensitizanın kanser hücrelerine spesifik olarak tutunması ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümörlü bölgeyi yok etmesi, bu tedavi yönteminin en önemli avantajlarından biri olmasıyla birlikte; kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi yönteminin yarattığı yan etkileri minimuma indirmesi bakımından da büyük avantaj sağlar. Guoqing Ouyang ve ark. kolon kanseri hücre hattında porfirin IX aracılı bir FDT gerçekleştirmişlerdir. Farklı enerji yoğunlukları ve farklı fotosensitizan konsantrasyonlarını kontrol ederek çalışma yapmışlardır. Çalışmada 4 µg/mL fotosensitizan ve 5 J/cm² ışık dozunda FDT gerçekleştirmişlerdir. Deney sonunda %41.6 apoptotik ölüm yüzdesi kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir [5].

FDT'de birçok fotosensitizan kullanılmaktadır. Özellikle tıbbi tedaviler için MB, 5-aminolevulinic acid (5-ALA),



verteporfin, protoporfirin-IX kullanılmaktadır. Metilen mavisi (MB) 550-700 nm bölgesinde güçlü bir absorpsiyon bandına sahiptir; aynı zamanda ucuzdur ve yıllarca klinik uygulamalarda güvenle kullanılmaktadır. 660 nm'de yüksek ışık emilimi ile iyi bilinen bir boya olan metilen mavisi, tek başına oksijen üretme kabiliyeti ve çeşitli hastalıklara karşı klinik uygulamalarda kanıtlanmış fotodinamik aktivitesi nedeniyle FDT'de etkilidir [6][7]. MB-FDT'de MB'nin çeşitli hücre hatlarında apoptozisi indüklediği [8], MB-FDT'nin neden olduğu apoptoz mekanizmalarının mevcut anlayışının sınırlı olduğu belgelenmiştir. Günümüzde MB-FDT ile ilişkili apoptozis mekanizmaları arasında DNA hasarı, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve mitokondriyal hasar bulunmaktadır [9]. MB-FDT'nin neden olduğu apoptoz mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, kanser terapisi stratejilerini bilgilendirmeye yardımcı olacaktır. Günümüzde FDT'de ışık kaynağı olarak en çok lazer kullanılmaktadır. Lazer ışık kaynaklarının fiber optik kablolar aracılığıyla istenilen bölgeye kolayca taşınması ve FDT sürecinde tekrar edilen tedavilerin uygulanması bakımından tercih edilebilir kalmaktadır. Yüksek güç ve kısa süre gerektiren FDT uygulamalarında doku da büyük oranda termal hasar meydana gelebilmektedir. Bununla birlikte ışığın doku içindeki penetrasyonunun düşük olması da FDT uygulamalarında karşılaşılan bir başka sorundur. Özellikle karşılaşılan bu sorunlarda lazer ve LED (Light Emitting Diod) sistemlerinin sürekli dalga (CW), süper atım, patlamalı atım ışınlama modları ile aşılabilmektedir. Bu çalışmada, insan kolon kanseri hücrelerinde FDT'nin neden olduğu apoptozda MB'nin rolü araştırılmıştır.

II. MATERYAL VE METOD

HT-29 hücreleri laboratuvar ortamında kültüre edilmiştir. Görüntüler laboratuvarımızda bulunan floresan mikroskop ile görüntülenmiş olup, deney sonu hücre sayımı mikroskop altında görüntülenerek yapılmıştır. Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan LAXCELL T3000 PDT LASER sistemi tarafından deney gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 1.5 watt optik çıkış gücüne sahip 635 nm ışına yapan lazer cihazı (BioOptics), sıcaklık kontrol ünitesi ile stabil bir çıkış üretebilmektedir. Deney öncesinde çıkış gücü Thorlabs power-metre ile ölçülerek hücrelere uygulanmıştır.



Şekil 1: LAXCELL T3000 PDT LASER sistemi

A. Hücre Kültürü

HT-29 hücrelerinin uygun şartlarda büyümesi için hücre kültürü yapılmıştır. 20 mililitrelik (mL) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde; PSG-B (Penisilin/Streptomisin Glutaminli) %1'i, FBS (Fetal Bovine Serum) %10'u ve 10 mikrolitre (μ L) kanser hücresi eklenerek



Şekil 2: Lazer cihazının modları

hazırlanmıştır. Normal şartlar altında bir hafta büyüme bırakılmıştır.

B. Fotosensitizan

%1'lik metilen mavisi çözeltisi hazırlanmıştır ve karanlık ortamda bırakılmıştır.

C. Fotodinamik Tedavi

Hücreler floresan mikroskop altında incelenmiştir; yeterli büyüklüğe ve sayıya ($\approx 10^4$) ulaştığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ve tedavi grubu olmak üzere iki grup hazırlanmıştır. Kontrol grubunu oluşturmak için 2000 μ L HT-29 hücresi petri kabına eklenmiştir. Tedavi grubunu oluşturmak için de 2000 μ L HT-29 hücresi ve ardından 20 μ L fotosensitizan petri kabına eklenmiştir. Daha sonra lazer sistemi hazırlanmıştır. Cihaz kalibrasyonu ve etkili bir deneyin olması için karanlık bir ortam hazırlanmıştır. Lazer çalıştırılırken kalibre edilmiştir. İstenilen gücü tam ayarlamak için array sensör ile kontrol edilip, ölçümler alınmıştır. İstenilen güç değeri kontrol edildikten sonra cihaz devamlı modda, 16 mW/cm² güç oranında, 188 saniye olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemden sonra 2 saat, 6 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat süre aralıklarıyla tedavi grubuna lazer uygulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süre içerisinde kontrol grubu sabit sıcaklık ve karanlık ortamda hiçbir işlem uygulanmadan bekletilmiştir. Deney sonunda (72 saat, son işlemden sonra) ölü ve canlı hücre sayımı thoma lamı ile floresan mikroskop altında incelenmiştir. Thoma lamında sayım sonucu;

$$A \times SF \times 10.000 \quad (1)$$

formülü ile hesaplanmaktadır. Burada A, 16 büyük karede sayılan hücre adedi iken SF ise seyreltme oranıdır. Bu çalışmada yoğun bir seyreltme uygulanmamıştır. 10.000 ise 0,1 mm³' deki sayım sonucunu 1 mL' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir.

III. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

MB aracılı FDT'nin kolon kanseri hücrelerinde in vitro etkisi ışık kaynağı lazer kullanılarak değerlendirildi. Çalışmada elde edilen sonuçlar hiç bir işleme tabi tutulmayan kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Thoma lamında yapılan sayım sonucunda \approx



Şekil 3: Değerlerin ayarlanması



Şekil 4: Lazerin hücreye uygulanışı

4×10^6 hücre olduğu gözlenmiştir. 72 saatlik süre sonunda kontrol grubunda hücre ölümleri oluşabilmektedir. Literatürdeki genel bilgilere bakıldığında kendiliğinden gerçekleşen hücre ölümlerinin göz ardı edilebileceği düşünülmektedir. 72 saat sonunda 635 nm 'de 16 mW/cm^2 güç yoğunluğundaki ışına ile $3.2 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$ hücre ölümü gözlenmiştir. İstatistik sonucuna göre tüm deney gruplarıyla kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur. Yapılan FDT çalışmasının yaklaşık %80 oranında hücre canlılığını yok ettiği görülmektedir. Diğer yandan 24, 48 ve 72 saatlik deney gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Buna göre tedavinin etkinliği zamana bağlı olarak değişmemiştir. Bu sonuçlar lazer kullanan MB aracılı FDT'nin kolon kanseri hücreleri için etkili bir tedavi olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinde en etkili dalga boyunu araştırmak, lazer ışık kaynağının diğer kanser hücre hatlarında etkili olup olmadığını teyit etmek için birçok ilave çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu yapılan ön çalışma, FDT'nin kolon kanseri üzerindeki etkisinin teyit edilmesi ve literatür bilgilerine uygunluğunun gözlemlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş olup diğer çalışma basamaklarına da ön ayak olmuştur. Bir sonraki çalışmada daha iyi sonuçlar alabilmek adına grup sayısının artırılması gerekmektedir. FDT sonucu meydana gelen hücre ölümünün apoptoz ya da nekroz ile olup olmadığını anlayabilmek ve daha net sayım alabilmek için özel boyaların

kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Hücre sayımında insan hatalarının olmaması ve daha nicel sonuçların alınması için mikroskopik görüntüleme sistemi ile daha detaylı bilgiye sahip olunması planlanmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda da bir ileri basamağa gidilerek in vivo çalışmaların yapılmasına da ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, lazer kullanılan MB-FDT'nin in vitro olarak kolon kanseri hücre hattında tümör hücresinin ölümünü indüklediğini gösterildi. Bulgular, kolon kanseri hastaları için yeni bir tedavi modalitesine ışık tutmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya olan katkılarından dolayı Ebru Aksoy'a teşekkür ederiz. Cihaz desteği, ölçüm ve kalibrasyon çalışmalarına katkı sağlayan Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Laboratuvarı'nda emek veren herkese teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. (Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>, Erişim Tarihi:13.08.2018)
- [2] P. Favoriti, G. Carbone, M. Greco, F. Pirozzi, R.E. Pirozzi, F. Corcione, "Worldwide burden of colorectal cancer: a review", 2016.
- [3] A. Kawczyk-Krupka, A.M. Bugaj, W. Latos, K. Zaremba, K. Wawrzyniec, A. Sieron, "Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials", Vol.12,545-553, 2015
- [4] S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S.I. Ogura, A. Ikeda, et al., "Current states and future views in photodynamic therapy", Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 12:46-7, 2011
- [5] G. Ouyanga, L. Xiong, Z.Liua, B. Lamb, B. Buib, L. Mab, X. Chena, P. Zhoua, K. Wang, Z. Zhanga, H. Huangd, X. Miaoa, W. Chen, Y. Wena, "Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells", Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 21, 396-403, 2018.
- [6] S.K. Bisland, C. Chien, B.C. Wilson and S. Burch, "Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis", Photochem Photobiol Sci 5: 31-38, 2006.
- [7] M. Wagner, E.R. Suarez, T.R. Theodoro, C.D. Machado Filho, M.F. Gama, J.P. Tardivo, F.M. Paschoal and M.A. PinhaL, "Metilen mavisi photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases", Clin Exp Dermatol 37: 527-533, 2012
- [8] D.J. Ball, Y. Luo, D. Kessel, J. Griffiths, S.B. Brown and D.I. Vernon, "The induction of apoptosis by a positively charged metilen mavisi derivative", J Photochem Photobiol B 42: 159-163, 1998
- [9] B.B. Noodt, G.H. Rodal, M. Wainwright, Q. Peng, R. Horobin, J.M. Nesland and K. Berg, "Apoptosis induction by different pathways with metilen mavisi derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells", Int J Cancer 75: 941-948, 1988.
- [10] T. Rodrigues, L.P. de França, C. Kawai, P.A. de Faria, K.C. MugnoL, F.M. Braga, I.L. Tersariol, S.S. Smaili and I.L. Nantes, "Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome C exposed to singlet oxygen", J Biol Chem 282: 25577-25587, 2007.