



Potasyum İyodür Kullanımının PC-3 Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Anti-Kanser FDT Uygulamalarına Etkisi

Effect of Potassium Iodide Use on Anti-Cancer PDT Applications on PC-3 Prostate Cancer Cells

Merve YÜNLÜ₁, Mustafa Kemal RUHİ₂,
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü₁, Biyomedikal
Mühendisliği Enstitüsü₂
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi₁, Boğaziçi
Üniversitesi₂
İzmir, Türkiye₁, İstanbul, Türkiye₂
merveyunlu85@gmail.com₁,
kemal.ruhi@boun.edu.tr₂

Günnur ONAK₃, Nermin TOPALOĞLU₄
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
gunnur.onak@ikc.edu.tr₃
nermin.topaloglu@ikc.edu.tr₄

Özetçe— Fotodinamik terapi (FDT) kanser tedavisinde umut vaat eden alternatif bir yöntemdir. FDT mekanizması ana bileşenleri olan moleküler oksijen, ışık ve fotosensitizanın birbiriyle etkileşime girmesi sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine dayanır. Bu etkileşimlerle terapötik yaklaşımlar elde edilebilir. FDT'nin etkisinin yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli ajanlar etkisini arttırmak amaçlı araştırılmaktadır. Bu çalışmada Potasyum İyodür (KI), PC-3 hücre hattında FDT'nin antikanser etkinliğini arttırmak için bir güçlendirici madde olarak kullanılmıştır. Işık kaynağı 655 nm dalga boyunda diyet lazer olup çıkış gücü olarak 200 mW, enerji dozları olarak da 0.5, 5, 10 ve 20 J/cm² araştırılmıştır. Fotosensitizan olarak farklı konsantrasyonlarda toluidin mavisi orto (TBO) (0.5 µM, 5 µM, 50 µM ve 100 µM) kullanılmıştır. Uygulamalardan sonra hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiştir. FDT'nin KI ile kombinasyonunda en etkili sonuç hücre canlılığında %78 oranında azalma olarak elde edilmiştir. Ancak, bu sonuç fotodinamik terapi uygulamalarının geliştirilmesini desteklememektedir, çünkü benzer kanser hücresi ölümü oranları KI kullanılmadan da elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler — Fotodinamik tedavi, anti-kanser, Toluidin Mavisi Orto, 655-nm, Potasyum İyodür.

Abstract— Photodynamic therapy (PDT) is a promising alternative method in the treatment of cancer. The mechanism of PDT is based on the

production of reactive oxygen species (ROS) as a result of the interaction of the main components of molecular oxygen, light and photosensitizer. Therapeutic approaches can be achieved through these interactions. In cases where the effect of PDT is insufficient, various agents are being investigated to increase the effect. In this study, Potassium Iodide (KI) was used as an enhancer to increase the anticancer activity of PDT in the PC-3 cell line. The light source was diode laser at 655 nm wavelength and its output power was 200 mW, and energy doses were 0.5, 5, 10 and 20 J/cm². Different concentrations of toluidine blue ortho (TBO) (0.5 µM, 5 µM, 50 µM, and 100 µM) were used as a photosensitizer. Cell viability was assessed by MTT analysis after applications. The most effective result in a combination of PDT with KI was obtained as a 78% reduction in cell viability. However, this result does not support the development of photodynamic therapy applications, because similar cancer cell death rates were obtained without the use of KI.

Keywords — Photodynamic therapy, anti-cancer, Toluidine Blue Ortho, 655-nm, Potassium Iodide

I. GİRİŞ

İnsan vücudu üzerinde oldukça tahrip edici hastalıklardan biri olan kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ve çoğalmasıdır [1]. Kanser vücudtaki farklı hücrelerde ortaya çıkabildiğinden dolayı çeşitli kanser türleri vardır [2]. Akciğer, meme ve pankreas gibi en sık görülen kanser türlerinden olan prostat

kanseri anormal prostat bezi büyümesiyle ortaya çıkar [2,3,4]. Erkeklerde ikinci en yaygın kanser tipi olan prostat kanserinin tedavisi için kanser ameliyatı, radyoterapi ve kemoterapi gibi çeşitli geleneksel terapötik yaklaşımlar vardır [5,6]. Ne yazık ki, bu geleneksel tedavilerin ağrı, enfeksiyon, halsizlik, cilt problemleri ve saç dökülmesi gibi birçok olumsuz yan etkileri vardır [1,2]. Tüm bu yan etkileri en aza indirmek için yeni kanser tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Bunlardan biri yeni bir tedavi yaklaşımı olan fotodinamik terapidir.

Fotodinamik Terapi (FDT) bakteriyel enfeksiyonları ve kanseri tedavi etmek için kullanılan yeni bir yöntemdir [7]. FDT'nin üç ana bileşeni vardır; fotosensitizan (ışığa duyarlı ilaç), ışık ve moleküler oksijen. FDT, kanser hücrelerini reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması ile yok eder [8]. Fotosensitizan uygun bir ışıkla uyarıldığında, ROS oluşturmak için moleküler oksijen ile reaksiyona girer [9]. Bu reaksiyonlar hücre içi makromoleküllerde (lipitler, proteinler, nükleik asitler) oksidatif hasara neden olur ve bu reaksiyonların gerçekleştiği yerde hücre ölümü görülür [9,10]. Reaktif oksijen türlerinden biri olan singlet oksijen, kanser hücreleri de dahil olmak üzere hücreleri öldüren yüksek derecede sitotoksik bir ajandır [11] ve fotodinamik terapide önemli bir rolü vardır [12,13].

Toluidin Mavisi Orto (TBO) anti-kanser fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensitizan olarak kullanılmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir [2]. Ayrıca, FDT'nin etkinliğini arttırmak için çeşitli farklı stratejiler de hala araştırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı inorganik tuzların kullanımının, hücre ölümünü sağlayan singlet oksijen üretilirken anti-mikrobiyal FDT etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmalarda inorganik tuz olarak çoğunlukla potasyum iyodür (KI) kullanılmıştır [9, 14, 15]. KI ve fotosensitizan çözeltisinin karışımı, ışığa maruz kalma sırasında ROS ve KI etkileşimi ile biyosidal reaktif iyot türlerinin (I^2 ve / veya I^3^-) veya peroksiyodid ($HOOI_2^-$) üretimine neden olur, böylece mikrobiyal hücreler tahrip edilebilir [9, 12, 14, 15]. Bu araştırmalar inorganik tuzların antibakteriyel FDT uygulamalarında sağladığı başarı gibi antikanser FDT uygulamalarında da etkili olup olmayacağı konusunu gündeme getirmiştir.

Bu çalışmada, TBO ile birlikte PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerinde uygulanan ve etkili bulunan antikanser FDT uygulamasında potasyum iyodürün yaratacağı etki araştırılmıştır.

II. YÖNTEM

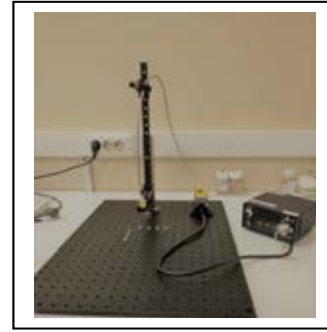
A. Hücre Kültürü

Bu çalışmada PC-3 hücre hattı *in vitro* prostat kanseri modeli olarak kullanılmıştır. PC-3 hücreleri,

%10 Fetal Sığır Serumu (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin ile desteklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde T-75 hücre kültürü flasklarında kültürlenmiştir. %80-90 oranında konfluent durumuna ulaşan hücreler, %0.25 tripsin EDTA çözeltisi ile ayrılmıştır. Hücreler istenen yoğunluğa (1×10^4 hücre/kuyucuk) göre 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Hücre ekiminden sonra her bir plaka 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 oranında nemli bir atmosferde inkübatörde inkübe edilmiştir.

B. Lazer Cihazı Düzenegi

Bu çalışmada ışık kaynağı olarak sürekli dalga modunda 655 nm diyot lazer sistemi kullanılmıştır. Çıkış gücü bir güç ölçer ile 200 mW'a ayarlanmıştır. Optimum enerji dozunu bulmak için 4 farklı enerji dozu (0.5, 5, 10 ve 20 J/cm^2) incelenmiştir.



Şekil 1. 655 nm diyot lazer sistemi.

C. Fotosensitizan

Bu çalışmada, Toluidin Mavisi Orto (TBO) fotosensitizan olarak kullanılmıştır. Moleküler ağırlığı 305.83 g/mol olan toz halindeki TBO 4 farklı konsantrasyonda (0.5, 5, 50 ve $100 \mu\text{M}$) hazırlanıp araştırılmıştır 24 saatlik hücre inkübasyonundan sonra besiyerleri tedavi grubu için her kuyucuktan çekilmiştir. Hücreler bir kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa TBO çözeltisi ilave edilmiştir ve nemlendirilmiş atmosferde 37°C ve %5 CO_2 ile 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

D. Potasyum İyodür

KI çözeltisi damıtılmış su içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Bu çözelti farklı konsantrasyonlardaki TBO çözeltisi ile karıştırılmıştır: $0.5 \mu\text{M}$ TBO + 100 mM KI, $5 \mu\text{M}$ TBO + 100 mM KI, $50 \mu\text{M}$ TBO + 100 mM KI ve $100 \mu\text{M}$ TBO + 100 mM KI. Bu gruplar hazırlanırken TBO ve KI konsantrasyonları seyreltme nedeniyle çift konsantrasyon olarak hazırlanmış ve bu çözeltiler eşit hacimde karıştırılmıştır.

E. Deneysel Uygulamalar

Deneysel uygulamalar için 5 farklı grup oluşturulmuştur ve bunlardan bir tanesi kontrol grubudur. Kontrol grubuna ışık uygulaması ya da ilaç

tedavisi uygulanmamıştır. Sadece TBO grubunda (0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 100 μ M) hücelere sadece TBO uygulanmıştır. Sadece lazer grubunda (0.5 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm², 20 J/cm²) hücelere sadece lazer ışığı uygulanmıştır. FDT grubu hücelere hem lazer ışığının uygulandığı gruptur. FDT+KI grubu hücelere TBO ve lazer uygulaması ile birlikte KI uygulandığı gruptur.

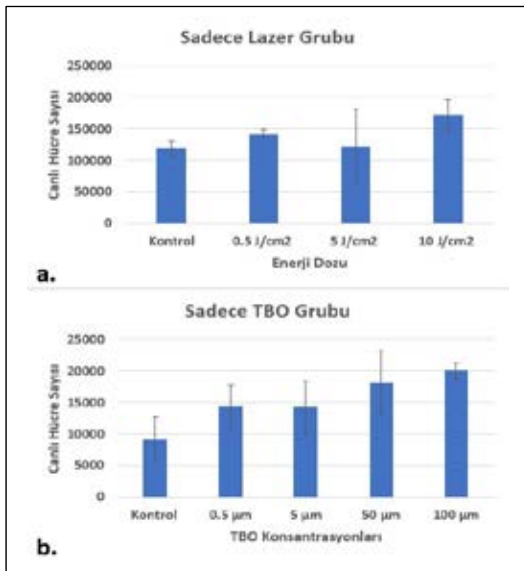
Uygulamalardan hemen sonra, hücre canlılığının değerlendirilmesi için hücelere MTT çözeltisi eklenmiştir. 2 saat inkübasyondan sonra her bir kuyucuktan MTT çözeltisi çekilerek ve her bir kuyucuğa 100 μ l DMSO ilave edilmiştir. Optik yoğunluk (OD) 570 nm dalgaboyunda bir mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

F. İstatistiksel Analiz

Deney gruplarını kontrol gruplarıyla ikili olarak karşılaştırmak amacıyla iki uçlu Student's *t*-test kullanılarak deneyler sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İstatistiksel farklılık $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiştir.

III. SONUÇLAR

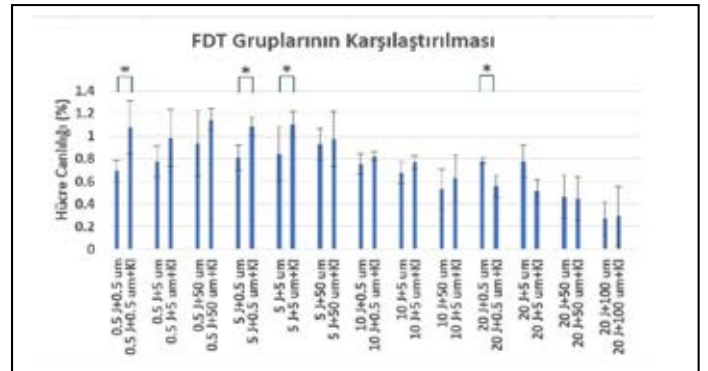
Yapılan deneyler sonucunda kanser hücrelerinde farklı enerji dozlarında sadece lazer ışığının herhangi bir fototoksik etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 2a). Farklı konsantrasyonlardaki sadece TBO'nun kanser hücrelerinde karanlıkta sitotoksik bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 2b).



Şekil 2. a. Farklı enerji dozlarının prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkinliği b. Farklı TBO konsantrasyonlarının prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkinliği.

Bununla birlikte, kanser hücrelerine PDT gruplarında 0.5-100 μ M arasında değişen farklı TBO konsantrasyonları ile 0.5-20 J/cm² arasında değişen farklı enerji dozları birlikte uygulandığında prostat

kanseri hücrelerinde ciddi hücre ölümü meydana gelmiştir. Daha sonra KI ile birlikte FDT uygulaması gerçekleştirilmiş olup, KI'nın FDT'nin aktivitesini arttırmadığı görülmüştür (Şekil 3). Aksine 0.5, 5 10 J/cm² enerji dozunun uygulandığı FDT gruplarında hücre canlılığı KI eklendikten sonra artmıştır. Sadece 20 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı FDT gruplarında KI ilavesi bir miktar daha fazla hücre ölümünün gerçekleşmesine sebep olmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. 0.5 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² ve 20 J/cm² enerji dozları, 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında TBO uygulanarak gerçekleştirilen FDT Grupları ile 100 mM KI eklendiği FDT gruplarının karşılaştırılması.

KI'süz ve KI ile elde edilen etkili FDT sonuçları arasında yapılan karşılaştırmada Tablo 1'de görüldüğü üzere herhangi bir FDT grubunda hücre canlılığının azalmasında KI ciddi bir potansiyel etki sağlamamıştır.

Tablo 1. Hücre canlılığının azalmasında en etkili FDT gruplarında KI'nın gerçekleştirdiği etkinin yüzde olarak ifadesi.

Hücre canlılığının azalmasında en etkili FDT uygulamaları	KI'süz hücre canlılığındaki yüzdelik değişim	KI ile hücre canlılığındaki yüzdelik değişim
0.5 J/cm ² +0.5 μ M	25% azalma	11% artış
5 J/cm ² +0.5 μ M	30% azalma	12% artış
10 J/cm ² +50 μ M	50% azalma	40% azalma
20 J/cm ² +100 μ M	80% azalma	78% azalma

IV. TARTIŞMA

Şu ana kadar gerçekleştirilmiş bir çok çalışmada antimikrobiyal FDT uygulamalarında potasyum iyodürün kuvvetlendirici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ghaffari ve grubu TBO-FDT ve KI kombinasyonunun *Enterococcus faecalis* üzerindeki etkilerini incelemişlerdir ve dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir [7]. Deneyler 635 nm diyot lazer ve üç farklı enerji dozu (6.8, 13.6 ve 40.9 J/cm²) kullanılarak yapılmıştır. KI'nın güçlendirici etkisi için en etkili sonuç, 13.6 J/cm² ışık enerji dozu, 100 μ M TBO konsantrasyonu ve 100 mM KI konsantrasyonunun kombinasyonu ile görülmüştür.



Bu kombinasyon bakteri hücreindeki azalmayı %50'den %91.5'e çıkarmıştır. Cagan ve grubu [14], klorin e6 (Ce6)-FDT ve KI kombinasyonunun *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki etkisini incelemiş ve dikkate değer sonuçlar elde etmiştir. Deneyler 655 nm diyot lazer ile 10 J/cm² enerji dozunda ışık, 2.5 µM Ce6 ve 100 mM KI kullanılarak yapılmıştır ve bakteri hücre sayısındaki azalma %75'ten %100'e çıkarılmıştır. Bu uygulamalar bu araştırma için bir temel olarak kullanılmıştır ve KI'nın FDT'nin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini arttırmada başarılı olup olamayacağı araştırılmıştır. Bu nedenle FDT'nin etkinliği 100 mM KI kullanılarak artırılmaya çalışılmıştır. Farklı enerji dozları, farklı konsantrasyonlarda TBO 100 mM KI ile birleştirildiğinde antikanser FDT uygulamalarında kanser hücrelerinin ölümünü arttırmak açısından KI'nın adjuvan etkisinin olmadığını göstermiştir. FDT-KI ile kombinasyonunun en etkili sonucu, hücre canlılığının %78 oranında azalması olmuştur ve bu etki 20J/cm² enerji dozu ile 100 µM TBO konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Ancak, bu sonuç fotodinamik terapi uygulamalarının geliştirilmesini desteklememektedir, çünkü aynı doz ve konsantrasyonlarda daha yüksek kanser hücreleri ölümü oranları KI kullanılmadan da elde edilmiştir. KI'nın bakteri hücre yapısı ve kanser hücre yapısı üzerindeki farklı etkisinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu farklı etki ökaryotik hücreden farklı olarak bakteri yapısındaki hücre duvarının varlığından kaynaklanabilir. Fotosensitizan ve potasyum iyodürün sinerjistik etkisi, bakteriyel hücre duvarında farklı bir şekilde reaksiyona girmiş ve antimikrobiyal fotodinamik terapinin gelişmesine neden olmuş olabilir.

BİLGİLENDİRME

Bu çalışma İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Optik ve Lazer Uygulamaları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup Boğaziçi Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü, Biyofotonik Laboratuvarı tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmalar sırasında verdiği desteklerden dolayı Prof. Dr. Murat Gülsoy'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

[1] Baykara, O., "Current Modalities in Treatment of Cancer.", Balıkesir Health Sciences Journal, 5(3), 154-165, 2016.

[2] Merve Yünlü, "Improvement of the Effect of Photodynamic Therapy with Toluidine Blue Ortho on PC-3 Prostate Cancer Cell Line.", The Bachelor of Science, Faculty of Engineering And Architecture, Izmir Kâtip Çelebi University, Turkey, 2019.

[3] Cooper, G. M., & Hausman, R. E., "The cell: A molecular approach", Fourth Edition, Washington, D.C.: ASM Press, 720-721, 2007.

[4] Heide Schatten, "Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer", Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, 2, 2018.

[5] Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari RC., Ghafoor A., Feuer EJ., Thun MJ., "Cancer Statics", Department of Epidemiology and Research Surveillance, American Cancer Society, Atlanta, GA, USA. CA Cancer J Clin., 55(4):259, 2005.

[6] Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, A., "Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies", Cancers, 3(3), 3279-3330, 2011.

[7] Ghaffari, S., Sarp, A. S., Gulsoy, M., & Ruhi, M. K., "A comparative analysis of aPDI effect of phenothiazinium dyes in presence of inorganic salt as potentiator", Light-Based Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, 2018.

[8] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK., "Photodynamic therapy for cancer", Nat Rev Cancer, 3(5):380-7, 2003.

[9] Hamblin, M. R., "Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts", Expert Review of Anti-infective Therapy, 15(11), 1059-1069, 2017.

[10] Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Wańczyk, M., . . . Golab, J., "Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer", Molecules, 16(5), 4140-4164, 2011.

[11] Brown, S. B., Brown, E. A., & Walker, I., "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment", The Lancet Oncology, 5(8), 497-508, 2004.

[12] Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., & Hamblin, M. R., "Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(9), 5203-5212, 2015.

[13] Derosa, M., "Photosensitized singlet oxygen and its applications", Coordination Chemistry Reviews, 233-234, 351-371, 2002.

[14] Cagan, M., Kolkiran, A., & Topaloglu, N. "The effect of ethanol on photoinactivation of pseudomonas aeruginosa with chlorin e6 as an adjuvant therapy." Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 2017.

[15] Wen, X., Zhang, X., Szweczyk, G., El-Hussein, A., Huang, Y. Y., Sarna, T., & Hamblin, M. R., "Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by rose bengal in vitro and in vivo studies." Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(7), 2017.