

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TETRAETİLEN GLİKOL YAN ZİNCİR TAŞIYAN ÖZGÜN Zn
(II) FTALOSİYANİN MOLEKÜLÜNÜN RATLARDA DENEYSEL
TÜMÖR MODELİNDE FOTOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMED RAŞİD AYKOTA

DANIŞMAN

PROF.DR. BURHAN KABAY

DENİZLİ 2014

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TETRAETİLEN GLİKOL YAN ZİNCİR TAŞIYAN ÖZGÜN Zn
(II) FTALOSİYANİN MOLEKÜLÜNÜN RATLARDA DENEYSEL
TÜMÖR MODELİNDE FOTOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMED RAŞİD AYKOTA

DANIŞMAN

PROF.DR. BURHAN KABAY

BU ÇALIŞMA PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ'NİN 10.01.2012 TARİH VE 01 SAYILI 2012TPF004
NUMARALI KARARI İLE DESTEKLENMİŞTİR.

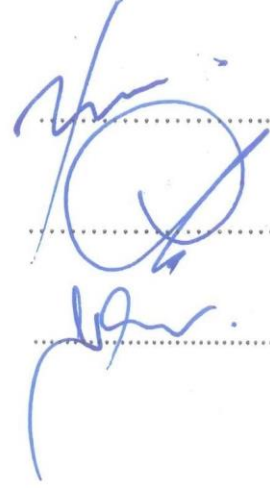
DENİZLİ 2014

Prof.Dr. Burhan Kabay danışmanlığında Dr. Muhammed Raşid Aykota tarafından yapılan 'Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün Zn (II) ftalosiyanın molekülünün ratlarda deneysel tümör modelinde fototoksisitesinin incelenmesi' başlıklı tez çalışması 23.12.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN:PROF.DR. BURHAN KABAY

ÜYE: PROF.DR. AKIN ÖZDEN

ÜYE: YARD. DOÇ.DR. HALİL ERBİŞ



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

23.12.2014

Prof.Dr. Hasan HERKEN
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve mesleki gelişimime olan katkılarından dolayı değerli tez hocam sayın Prof.Dr. Burhan Kabay'a, cerrahi disiplini öğrendiğim Prof.Dr. Uğur Sungurtekin hocama, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Prof.Dr. Akın Özden ve Prof. Dr.Ergün Erdem hocama ayrıca anabilim dalı başkanım Prof.Dr. H. Çağatay Aydın hocama; deney yapılması, uygulaması ve bu projenin hazırlanmasında emeği geçen Yard. Doç.Dr Halil Erbiş'e ve Biyomedikal Mühendisliği öğretim üyesi Yard. Doç.Dr Nilgün Erkal Kabay'a; Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Fabienne Doumolin'e, ağabeylerim Yard. Doç.Dr Murat Özban ve Yard. Doç.Dr. Onur Birsen'e ve asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Dr. Muhammed Raşid Aykota

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR VE SİMGELER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
RESİMLER DİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XII
1.GİRİŞ	XIV
2.GENEL BİLGİLER	1
2.1 Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu	2
2.2 Ftalosiyaninlerin Katalaz-benzeri Oksidasyon Reaksiyonları	2
2.3 Ftalosiyaninlerin Peroksidaz-benzeri Oksidasyon Reaksiyonları	3
2.4 Deneysel Tümör Modelleri	3
2.4.1 Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller	3
2.4.2 Tansplante Edilebilen Tümör Modelleri	3
2.4.3 Tümör Xenograftı Modeli	4
2.4.4 Transgenik, Knockout veya Kimerik Modeller	4
2.5 FDT Klinik Uygulamaları.....	4

	Sayfa No
3.GEREÇ VE YÖNTEM	6
3.1 Anestezi	7
3.2 Tümör Modeli	9
3.3 Deney Grupları	10
3.4 Analizler	11
3.5 İstatistiksel değerlendirme	11
4.BULGULAR	12
5.TARTIŞMA	18
6.SONUÇ	28
KAYNAKLAR	29

KISALTMALAR VE SİMGELER

FDT: Fotodinamik tedavi

TEG-Pc: Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan ftalosiyenin

nm: Nanometre

ng: Nanogram

mg: Miligram

ml: Mililitre

SOD: Süperoksit Dismutaz

GSH: Glutatyon

GSHPx: Glutatyon peroksidaz

CAT: Katalaz

MPO: Miyeloperoksidaz

MDA: Malondealdehit

Zn: Çinko

DNA: Deoksiribonükleik asit

ATP: Adenozintrifosfat

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

ALA: Aminolevulinik asit

H&E: Hemotoksilen eosin

λ: Dalga Boyu

J/cm²: Jule/santimetrekare

Al: Alüminyum

Ga: Galyum

dk: Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Tümör dokusunda <i>SOD</i> aktivitesinin gruplara göre dağılımı	12
Şekil 2. Tümör dokusunda <i>GSH</i> düzeylerinin gruplara göre dağılımı	13
Şekil 3. Tümör dokusunda <i>GSHPx</i> düzeylerinin gruplara göre dağılımı	14
Şekil 4. Tümör dokusunda <i>CAT</i> aktivitesinin gruplara göre dağılımı	15
Şekil 5. Tümör dokusunda <i>MDA</i> düzeyinin gruplara göre dağılımı	16
Şekil 6. Tümör dokusunda <i>MPO</i> düzeyinin gruplara göre dağılımı	17

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. TEG-Pc 0,12mg/ml çözeltisi ve rat sırtında Walker 256 hücre hattı ekimi ile oluşturulan tümör	6
Resim 2. Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün Zn (II) ftalosiyenin molekülü (TEG-Pc)	7
Resim 3. İmplantasyon için diseke edilen tümöral doku, sağ üst köşede malign tümör dokusunun mikroskopik görüntüsü(H&E, x200)	8
Resim 4. Dört hafta sonra implante edilen tümörün gelişimi	9
Resim 5. TEG-Pc enjeksiyonu sonrası tümöre ışık uygulanması, $\lambda=650$ nm, 10 Doz= 50 J/cm²	10

ÖZET

Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün Zn (II) ftalosiyanın molekülünün ratlarda deneysel tümör modelinde fototoksitesinin incelenmesi

Dr.Muhammed Raşid Aykota

Günümüzde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan üç ana yöntem ameliyat, kemoterapi ve radyoterapidir. Bu üç ana kanser tedavi yöntemine alternatif olabilecek olan fotodinamik terapi [photodynamic therapy (PDT)(FDT)] Amerika, Almanya, Japonya, İngiltere, Fransa, Hollanda, Kanada gibi ülkelerde sağlık kurumları tarafından çeşitli kanser tedavi yöntemleri için onaylanmıştır.

FDT, ışığaduyarlı ilacın (photosensitizer) hastaya damar yoluyla verilmesini (veya topikal olarak uygulanmasını) takiben bu ilacın tümörlü dokuda birikmesinin ardından, belli dalga boyundaki ışık ile uyarılarak tümörü yok etme prensibine dayanır. Yüksek dalga boyunda (yaklaşık 700 nm civarında) absorpsiyon yapmaları, yüksek triplethal kuantum verimleri (quantum yield), triplet halde kalma sürelerinin uzun olması (life time) ve etkili bir şekilde singlet oksijen oluşturabilme kapasiteleri nedeniyle ftalosiyanın bileşikleri fotodinamik terapi ile kanser tedavisinde kullanılabilir hedef moleküllerdir.

Bu çalışma ile özgün bir ftalosiyanın molekülünün(TEG-Pc) ratlarda deneysel tümör modelindeki fototoksitesi incelendi. Bu amaçla, Walker 256 karsinoma hücre hattı 4 Wistar cinsi ratın sırtına enjekte edildi. Dört hafta sonunda oluşan tümör deney ve kontrol gruplarında kullanılmak için eksize edildi. Deney ve kontrol gruplarındaki hayvanlara 1 mm³ hacminde parçalara ayrılarak implante edildi. Deney gruplarındaki 48 rat tümör büyüklüğü 1 cm³ e ulaşmaya kadar standart laboratuvar şartlarında tutuldu. Fotodinamik tedavi uygulanacak 12 rata tedavi öncesi 2,5 mg/kg dozunda intraperitoneal(i.p) fotosensitizer madde enjeksiyonu yapıldı. Fototoksik etki oluşturmak için 650 nm dalga boyunda, 50 J/cm² gücünde lazer ışık kaynağı, 15 dk süre ile tümör üzerine uygulandı. Oksidatif hasarın belirlenmesi için, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve serbest radikal oluşumu analizleri yapıldı.

FDT ile 6. Saatte tümör dokusunda kontrol gruplarına göre *Süperoksit Dismutaz(SOD)* ve *Glutasyon Peroksidaz(GSHPx)* aktivitesinde anlamlı artış olduğu bulundu. *Glutasyon(GSH)* düzeylerinin ise 6. saatte baskılandığı görüldü. *Katalaz(CAT)* düzeylerinde kontrol gruplarına göre anlamlı değişiklik gözlenmedi. Hücrel oksidatif stresin göstergesi olan *Myeloperoksidaz(MPO)* düzeyleri FDT ile 6. saatte anlamlı artış gösterdi. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan *Malondealdehit(MDA)* düzeylerinde ise gruplar arasında değişiklik bulunmadı.

TEG-Pc'nin *in vivo* etkin bir fotosensitizer olduğu görülmüştür. TEG-Pc ile uygulanan FDT tümöral biyomoleküllerde ve antioksidatif sistemlerde değişikliklere neden olmuştur. Bu değişiklikler sonucu tümör hasarı olabileceği öngörülmüştür. Umut veren bir yöntem olan FDT ile kanser tedavisi alanında daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

ABSTRACT

Phototoxic effects of novel tetraethyleneglycol-substituted Zn (II) phtalocyanine derivatives in tumor bearing rats

Dr.Muhammed Raşid Aykota

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative cancer treatment, which is based on the administration of a type II-photosensitizer and the local generation of singlet oxygen at the tumor site by irradiation with light of appropriate wavelenghts. The oxidative effects of a novel tetraethyleneglycol-substituted Zn(II) phtalocyanine derivative (TEG-Pc) with laser irradiation were evaluated in Wistar rats with Walker 256 carcinoma.

Walker 256 carcinoma cells (ATCC, CCL-18) were implanted to the dorsum of four rats (1×10^6 cells per rat). After 4 weeks of growth, tumor bearing rats were used for *in vivo* tumor propagation. Small fragments of Walker 256 tumors were subcutaneously transplanted to recipient experimental rats in the right thigh under anesthesia for *in vivo* tumor propagation. Tumor bearing rats were used for PDT studies when the mean tumor volume reached 1 cm^3 .

The animals were laser-irradiated ($\lambda=650 \text{ nm}$, $D = 50 \text{ J/cm}^2$; 15 min) 2 h after intraperitoneal administration of 2,5 mg/kg body weight of Pc. Animals were killed after 2 and 6h. Tumor samples were obtained for the presence of free radicals, to study activities of antioxidant enzymes and lipid peroxides after photodynamic therapy with TEG-Pc. Control and sham groups were prepared according to experimental setup.

In tumors PDT produced strong induction of *Superoxide dismutase (SOD)* and *Glutathione peroxidase (GSHPx)* 6h after the treatment ($p<0,05$).

The tissue activity of *Catalase (CAT)* was roughly unchanged after PDT ($p>0,05$). *Glutathione (GSH)* function in the cellular detoxification of potentially oxygen-related toxic products. *GSH* significantly depleted 6h after PDT ($p<0,05$).

Oxidative stress as reflected by *Myeloperoxidase (MPO)* levels after PDT was significantly increased ($p<0,05$) 2 and 6h after the treatment. *Malondealdehyde*

(MDA), which is an indicator of lipid peroxidation, was unchanged between the groups ($p > 0,05$)

This novel chemical is an efficient photosensitizer *in vivo*. PDT with TEG-Pc caused ROS (Reactive oxygen species) production in a tumor model. TEG-Pc induced oxidative changes of biomolecules and alteration of anti-oxidative systems. Tumor cell destruction could be a consequence of these alterations.

1.GİRİŞ

Teknolojik ürünler sınıfına giren metallsiz ve metalli ftalosiyanimler günümüzde çok önem kazanmıştır. Ftalosiyanimler periferal ve non-periferal pozisyondaki substitüe gruplar sayesinde gaz ve kimyasal sensör, sıvı kristal, non-lineeroptik ve fotodinamik terapi (PDT,FDT) alanlarında geniş bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Son yıllarda üzerine çok çalışılan uygulama alanlarından birisi de ftalosiyanim bileşiklerinin fotodinamik terapide fotosensitizer olarak kullanılmalarıdır. Bu bileşiklerin yüksek dalga boyundaki ışığı absorplayabilmeleri (yaklaşık 700nm civarında), yüksek triplet hal kuantum verimlerine (yield) ve triplet halde uzun ömürlere (life time) sahip olmaları, ışık kullanılmadığı zaman herhangi bir toksik etkilerinin olmaması bu maddelerin fotodinamik terapide etkin olarak kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Özellikle vücut sıvısı içerisine direkt olarak verilebildiği için suda çözünebilen ftalosiyanimlerin sentezlenmesi fotodinamik terapi uygulamaları açısından çok önemlidir. Ancak, fotosensitizer moleküllerinin hücre duvarından geçebilmeleri için aynı zamanda organik çözücüler (genellikle oktanol) içerisinde de çözünür olması gerekmektedir. Suda çözünebilme özelliği gösteren sınırlı sayıda ftalosiyanim bileşiği literatürde mevcuttur. Ancak bu bileşikler genellikle su içerisinde çözüldüklerinde agregasyon yapmaktadırlar.

Bu proje için klik reaksiyonları kullanılarak hem suda hem de organik çözücüler içerisinde çözülebilen aynı zamanda agregasyon yapmayan ftalosiyanim fotosensitizerleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu moleküllerin *in vitro* fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Kanser tedavisinde potansiyel uygulama alanı olabileceğini düşündüğümüz bu moleküllerin *in vivo* anti kanser özelliklerini bu çalışma ile araştırmayı planladık.

Bu çalışma için temel aldığımız yayın, projenin araştırmacılarından Doç. Dr Fabienne Dumoulin ve ekibinin çalışmasıdır[1]. Bu çalışmada Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün ftalosiyanim molekülü sentezlenmiştir. Bu molekülün fotokimyasal ve fotofiziksel özellikleri araştırılmıştır. Kullanılacak olan molekül görünür kırmızı ışık spektrumunda maksimum absorbands göstermektedir (677-720 nm) ve bu aralıkta singlet oksijen oluşturmaktadır. Bu değerler fotodinamik tedavi

alışmaları için oldukça uygun ve potansiyel klinik uygulamaların olabileceği değerlerdir.

Bu molekülün sulu ozeltelerde agregasyon oluşturmadıkları ve plazma proteinlerine zayıf olarak bağlandığı gösterilmiştir. Bu zellikler nedeniyle *in vitro* fotositotoksisite çalışmaları yapılmış ve bu çalışma için kullanılacak olan molekülün belirgin fotositotoksisite gösterdiği belirlenmiştir. Yayında da önerildiği gibi bu sonuçlar *in vivo* bir çalışmayı hak etmektedir. Bu nedenle de sunmuş olduğumuz çalışma hazırlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Ftalosiyanimler yetmiş yılı aşkın süredir bilinmektedirler. Bu bileşikler üzerine foto biyoloji ve medikal çalışmalar dahil çok çeşitli uygulamalarda ileri malzeme ürünü olarak araştırmalar yapılmıştır [2,3]. Ftalosiyanimlerin karakteristik absorpsiyon spektrumları 350nm’lerde görülen Soret bandı ve 675nm’lerde görülen kuvvetli Q bandıdır. Porfirinlere göre kırmızıya kayan ftalosiyanimlerin Q bandı absorpsiyonları porfirinlerinkine kıyasla yaklaşık iki kat büyüklüktedir. Bu spektral karakteristikleri ftalosiyanimlerin ikinci nesil fotosensitizer olarak düşünülmesini sağlamıştır ve günümüzde Fotodinamik Terapi (FDT) uygulamalarında geniş şekilde kullanılmaktadır. Ftalosiyanimlerin fotofiziksel özellikleri merkez metalinin varlığına ve türüne çok bağlıdır. Kabukları dolu diyamanyetik iyonlar (Zn^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+}) ftalosiyanim komplekslerinin singlet oksijen verimleri yüksektir. Siyah toksisiteyi düşük olması fotosensitizer olarak kullanılmasının diğer bir nedenidir.

Ftalosiyanim komplekslerinin genel fotosensitizer süstituentlerin türüne ve metal seçimine bağlıdır [4-6].

Periferal konumdaki N-donör gruplar içeren ve bunların kuaternerleştirilmesi ile katyonik yapılara dönüşen porfirin, porfirazin ve ftalosiyanim yapısındaki moleküller, medikal biyoloji, ileri teknolojik malzemeler ve kanser terapisi gibi güncel alanlarda çok yönlü çalışılan malzemelerdir. Özellikle medikal ve biyolojik uygulamalarının yanı sıra endüstriyel alanda ve tekstil boyalarının oluşturduğu çevre kirliliğinin yok edilmesi konusunda da üzerinde çalışılan önemli malzemeler olmuşlardır. Ayrıca periferal konumda bulunan tetra ve okta N donör grup içeren moleküllerin gerek molekül içi gerekse moleküller arası yaptığı koordinasyonlar neticesinde de ilginç özelliklere sahip metallo-oligomer yapılarına ulaşılmıştır.

Özellikle okta katyonik yapıda sentezlenen bu büyük moleküller biyoloji ve tıp alanındaki kayda değer uygulamaları ile de dikkatleri üzerlerine çekmişlerdir. Gerek DNA’ya bağlanabilme ve gerekse singlet oksijen üretimi sayesinde tıpta alternatif tedavi edici malzemeler olarak kullanılmaktadır.

Substitüe olmamış ftalosiyanimler çok kararlılırlar; organik solventlerde çözünmezler. Dolayısıyla halkaya ilave edilen fonksiyonel gruplar bu bileşiklerin

özelliklerini değiştirmektedir. Benzen halkalarındaki hacimli, polar, bazik grupların bulunması moleküle çözünürlük getirir. Buna ilave olarak pek çok metale bağlanabilmesi de bu tür yapıların çeşitliliğini arttırmaktadır. Eklenen fonksiyonel gruplar, ftalosiyanimlerle porfirazinlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini de etkilemektedir. Yükseltgen maddelere karşı stabilitesi arttırılarak, bazı pratik kullanımlara büyük önem kazandırmaktadır. Suda çözünürlük ve organik solventlerdeki çözünürlük, fotodinamik özelliklerinin incelenmesine imkân sağlamıştır. Literatürde simetrik, asimetric ftalosiyanimlerin sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır. Suda çözünür ftalosiyanimlerin ve porfirazinlerin biyolojik alanda gösterdiği özellikler günümüzde önem kazanmıştır [7-13].

2.1 Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu

Serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar. Polidoymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir [22].

2.2 Ftalosiyanimlerin Katalaz-benzeri Oksidasyon Reaksiyonları

Waldmeier ve Sigel, Hidrojen peroksit (H_2O_2)'in bozunmasında Fe(III)tetrasülfoftalosiyanimin ($FePc(SO_3Na)_4$) katalitik aktivitesinin mekanizması ve kinetik özellikleri ile ilgili çalışmışlardır [23]. Shiari ve çalışma arkadaşları Fe(III)-, Co(II)-polikarboksiftalosiyanim ($Fe-,CoPc(COOH)_n$, $n=2,4,8$) ve bunların polimerlerinin katalizör olarak H_2O_2 'nin bozunmasını sağladıklarını rapor etmişlerdir. Oktakarboksiftalosiyanatodemir(III) bileşiği ($n=8$, $FePc(COOH)_8$) etkili bir katalizördür ve diğer metalli ftalosiyanimler ($CoPc(COOH)_8$ ve $CuPc(COOH)_8$) ve hemin ile karşılaştırıldığında 26 kat daha hızlı katalitik etki gösterdiği ortaya konmuştur [24-26].

2.3 Ftalosiyanın Peroksidaz-benzeri Oksidasyon Reaksiyonları

Guaicol'ün peroksidaz benzeri oksidasyonu H_2O_2 varlığında $FePc(COOH)_8$ ve $FePc(COOH)_8$ -polielektroliti ile çalışılmıştır [27]. O_2 veya H_2O_2 varlığında $FePc(COOH)_8$ ile yapılan oksidasyon çalışmalarında H_2O_2 varlığında yapılan oksidasyonda maksimum oksidasyon hızı, H_2O_2 olmaksızın yapılan oksidasyona göre yaklaşık 1000 kat daha hızlı olduğu görülmüştür [27].

2.4 Deneysel Tümör Modelleri

Deneysel kanser araştırmalarında kimyasal karsinojenler ile kendiliğinden oluşan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Bu modeller her araştırma biriminde kolaylıkla üretilebilen, özellikleri iyi tanımlanmış, saklanabilen, uygulanması da diğer modellere göre daha kolay olan yöntemlerdir. Son kırk yıl içinde ksenograft çalışmaları ve son yıllarda ise transgenik hayvan üretiminde hızlı gelişmeler olması ile bilimsel amaçlı hayvan üretim alanı bir ticari sektör haline almıştır. Bu nedenle çeşitli tümör modelleri istenilen amaca uygun olarak seçilebilmektedir. [28-30].

2.4.1 Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller

Çeşitli kimyasal ajanlar deney hayvanlarına değişik yollarla verilerek (intraperitoneal, intravenöz, subkutan gibi) farklı özelliklerde tümör modelleri oluşturulabilir. 3-Metilkloroantren,7,12-Dimetilbanzantren (DMBA), Dimetilhidrazin, MX furanone ile birlikte N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin(MNNG) lösemi, kolon ve mide kanseri oluşturmak için kullanılan kimyasallardandır. Bu modellerde kullanılan karsinojenler uygun şartlarda saklanmalıdır. Hem araştırmacıya hem de çevredeki kişilere potansiyel tehdit oluşturabilir. [29].

2.4.2 Transplante Edilebilen Tümör Modelleri

Solid tümörler hücre süspansiyonlarının inokülasyonu ile elde edilirler. İnoküle edilen tümörler kökenlendikleri tümörlere erken oluşum fazları açısından oldukça benzerlik gösterirler. İyi karakterize edilmiş ve üretilebilir özelliktedirler. İlaç çalışmalarında tercih edilmektedirler. Bu yöntemle pek çok tümör modeli

kolaylıkla oluşturulabilmektedir. Bizim çalışmamızda spontan rat meme kanserinden elde edilen Walker 256 hücre hattı kullanılarak tümör modeli oluşturulmuştur. Benzer şekilde Wilms tümörü, Akciğer tümörü, Pankreas tümörü gibi modeller kolaylıkla oluşturulabilir. [30].

2.4.3 Tümör Xenograftı Modeli

İmmün sistemi hasara uğratılmış farelere uygulanabilen bir yöntemdir. Timektomi, steroidler ve radyasyon yada genetik yöntemlerle bu tür fareler üretilebilmektedir. Genetik olarak timus bezi olmayan bu fareler “nude”(tüysüz) olarak adlandırılır. İlk kez 1969 yılında tesadüfen albino fare üretimi esnasında elde edilmişlerdir. Bu fareler doku nakil çalışmaları ve insan tümör xenograft modelleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tümör xenogreftleri hayvanlara ortotopik yada heterotopik olarak nakledilebilir. Subkutan implantasyon, insan tümörünün nude fareye naklinde öncelikle tercih edilmektedir. Hem basit hemde tümörün veriliş yolu kolaydır. İlaç araştırma geliştirme çalışmalarında *in vivo* testlerde kullanılmaktadır.

Nude farelerle yapılan renal hücre karsinomu, pankreas kanseri, beyin tümörü, kolon ve akciğer kanserleri potansiyel ortotopik model kullanım alanlarıdır. Akciğer tümör modelinde ortotopik uygulamalar ön plana çıkmaktadır. [31].

2.4.4 Transgenik, Knockout veya Kimerik Modeller

Transgenik hayvan bir gen enjekte edilmiş fertilize bir yumurtadan elde edilir. NF-1, c-fos, N-myc gibi onkogenler verilerek transgenik fareler karsinogenez gelişimi için takip edilir. Hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan modellerdir. Örneğin meme ve lenfoid tümörlere neden olan ras oluşum kademelerinde, *Farnesil Transferaz* inhibitörlerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Çeşitli laboratuarlarda transgenik ve knockout fareler üretilmekte ve bu hayvanlar bir ürün olarak bütün dünyaya sunulmaktadır. [31].

2.5 FDT Klinik Uygulamaları

FDT çalışmaları 19.yy başında Raab ve Finsen 'in çalışmaları ile başlamıştır. Eosin boyası ve güneş ışığı kullanılarak cilt rahatsızlıkları iyileştirilmeye çalışılmış(bazal hücreli karsinom) ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu zamandan

günümüze fotosensitizerler alanında ilerlemeler kaydedilmiş ve hemato porfirin türevleri kullanılmıştır. Bunlar içinde ilk kez Photofrin® adı ile 1970 li yıllarda ticari olarak kullanılmıştır.[32] Daha sonra aminolevulinik asit(Levulan®), etiletiopurpurin(Purlytin®), verteporfin(Visudyn®) gibi türevler de sentezlenmiştir. Floresan, lazer ve led sistemlerinin gelişmesi ile birlikte FDT uygulamaları ve araştırmaları çeşitlilik kazanmıştır. Fotodinamik tedavide kullanılan sensitizan ajanlar porfirinler, porfirin prekürsörleri, klorinler, ftalosiyeninler, porfisinler, metilen mavisi gibi çeşitli boya türevleridir. Fotodinamik terapi çeşitli dermatolojik endikasyonlar, göz hastalıkları ve kanser tedavisinde uygulama alanı bulmuştur. En etkili olduğu endikasyonlar Aktinik keratoz, Bowen hastalığı, Skuamoz hücreli karsinom ve Bazal hücreli karsinomlardır. Son yıllarda ALA'nın kıl foliküllerine affinite göstermesinin tespitinden sonra Hirsutizm, Alopesi Areata ve Akne Vulgaris gibi dermatozlarda da kullanımı başlamıştır. Cilt hastalıkları dışında mesane, özefagus, akciğer, baş boyun kanserleri alanında da başarılı çalışmalar bildirilmiştir. Göz hastalıkları alanında ise makuler dejenarasyonun tedavisinde kullanım alanı bulmuştur. Gelecekte koroner arter hastalıkları, enfeksiyon hastalıkları ve hematolojik kanserlerin tedavisinde potansiyel kullanım alanı vardır. [32-35].

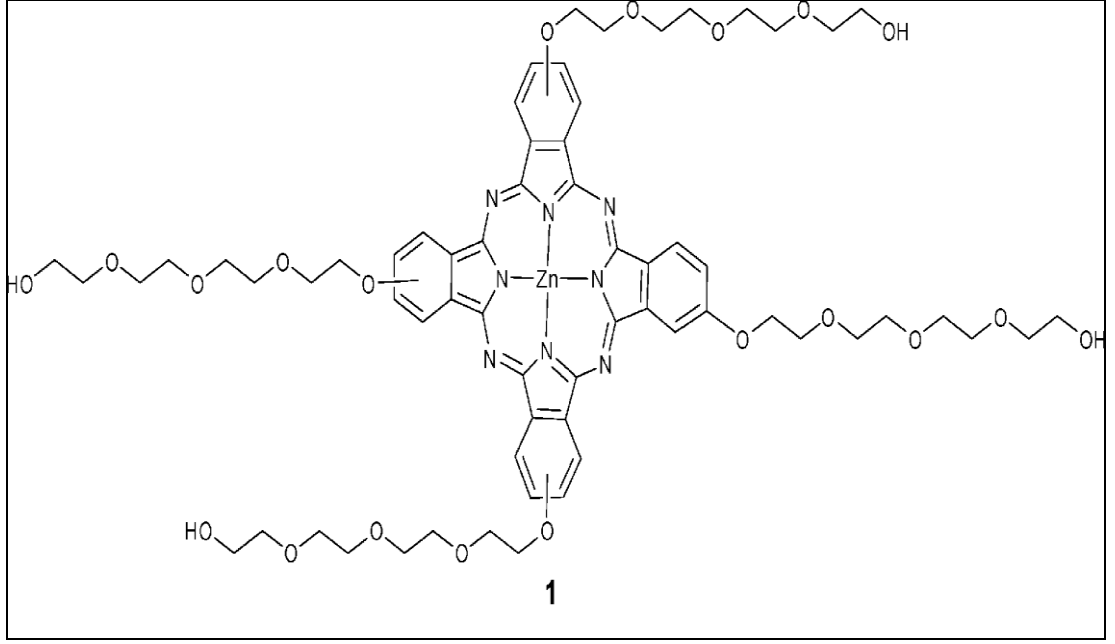
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonununun 10.01.2012 tarih ve 01 sayılı 2012TPF004 numaralı onayı alınarak 52 adet Wistar cinsi ratlar(**Resim 1.**) üzerinde yapılmıştır. Hayvanların bakımı ve izlemi Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde yapılmış ve deney protokolü süresince su ve yiyeceğe erişimleri kısıtlanmamıştır.

Çalışmada kullanılacak olan fotosensitizör molekül TEG-Pc(**Resim 1.**) Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Fabienne Doumolin tarafından sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Molekülün *in vitro* fototoksik özellikleri daha önceden belirlenmiştir.



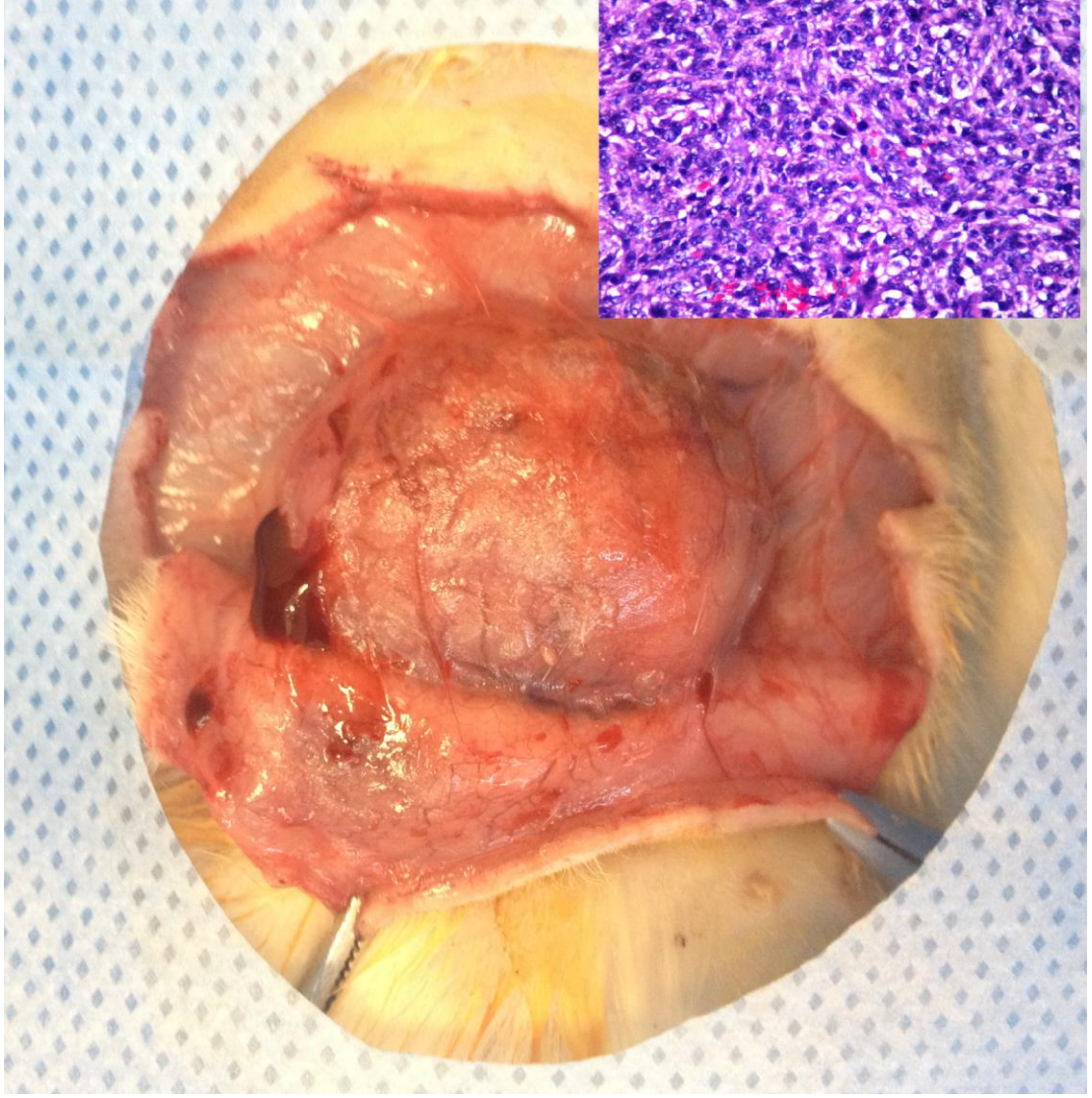
Resim 1. TEG-Pc 0,12 mg/ml çözeltisi ve rat sırtında Walker 256 hücre hattı ekimi ile oluşturulan tümör



Resim.2 Tetraetilen glikol yan zinc taşıyan özgün Zn (II) ftalosiyanin molekülü (TEG-Pc)

3.1 Anestezi

Xlazine (10mg/kg-Rompun®) ve ketamin(90mg/kg-Ketalar®) karışımı tek ciltaltı enjeksiyonla uygulanmıştır.



Resim 3. İmplantasyon için diseke edilen tümöral doku, sağ üst köşede malign tümör dokusunun mikroskobik görüntüsü(H&E, x200)



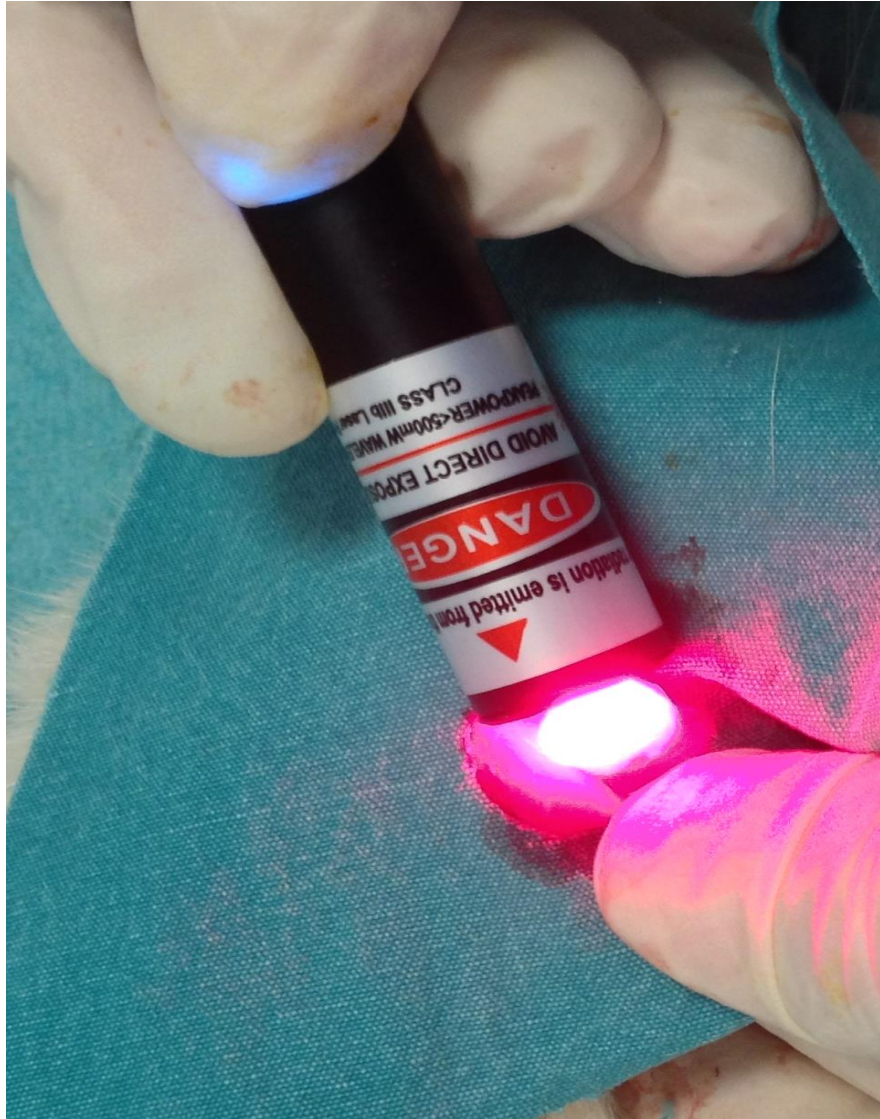
Resim 4. Dört hafta sonra implante edilen tümörün gelişimi

3.2 Tümör Modeli

Walker 256 meme kanser hücre hattı (ATCC, CCL-38) dört erkek Wistar rata subkutan olarak ekildi ve tümör büyüklüğü 1 cm^3 olana kadar rat standart laboratuvar şartlarında tutuldu (**Resim 1.**). Yeterli tümör hacmine ulaşıldıktan sonra bu tümör eksize edilerek 1 mm^3 hacminde parçalara ayrılarak deney grubunu oluşturacak 48 rata subkutan (s.c) implante edildi (**Resim 2.**). Tümör implante edilen ratlar, tümör hacmi 1 cm^3 olana kadar 4-6 hafta süre ile standart laboratuvar şartlarında tutuldu.

3.3 Deney Grupları

Çalışma için ratlar 4 gruba ayrıldı. Tümör implante edilen birinci gruptaki(sham) 12 adet rata yalnızca intraperitoneal 2 ml. serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. İkinci gruptaki 12 adet rata TEG-Pc 2,5 mg/kg dozunda intraperitoneal enjekte edildi. Üçüncü gruptaki 12 adet rata tümör üzerindeki cilt tıraş edilerek 15 dk. süre ile ışık tedavisi uygulandı ($\lambda=650$ nm, Doz= 50 J/cm² süre=15 dk). Dördüncü gruptaki (tedavi grubu) 12 adet rata kontrol gruplarındaki gibi TEG-Pc enjeksiyonu ve ışık uygulaması yapıldı.



Resim 5. TEG-Pc enjeksiyonu sonrası tümöre ışık uygulanması,

$\lambda=650$ nm, Doz= 50 J/cm²

3.4 Analizler

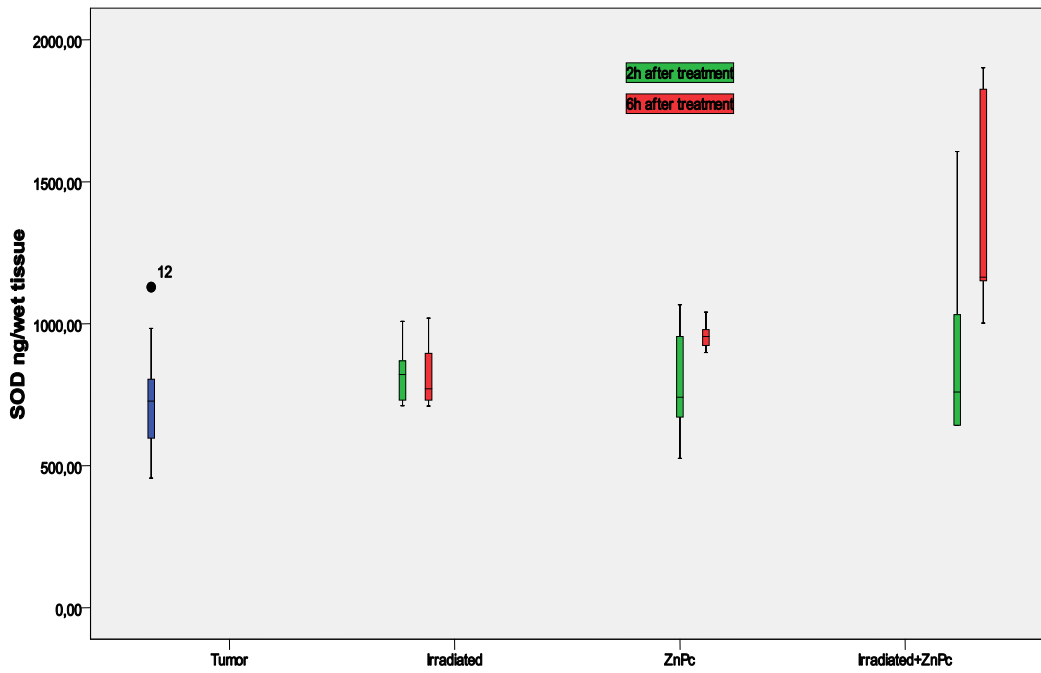
Tüm gruptaki tümör dokuları 2. ve 6. Saatlerde eksize edildi. Tümör dokuları *Malondealdehit(MDA)*, *myeloperoksidaz(MPO)* antioksidan enzim aktiviteleri (*süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, glutatyon peroksidaz*) ölçümleri için sıvı azot içinde dondurularak saklandı.

3.5 İstatistiksel değerlendirme

Bulgular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS Statistics for Windows 17,0 (Chicago, IL, USA) yazılımı ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile analiz edilmiştir. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

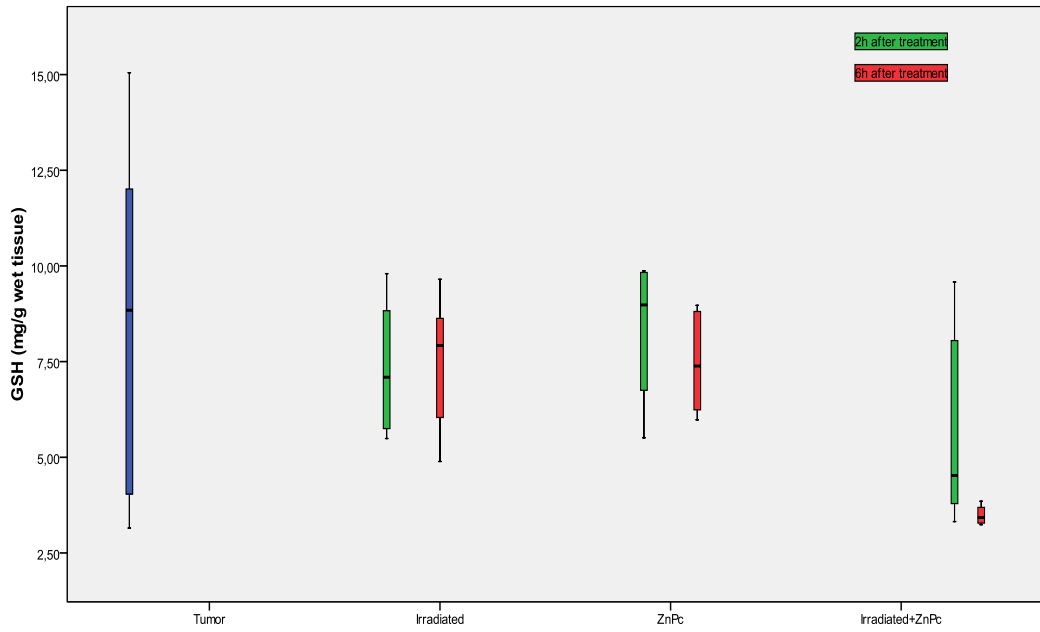
4. BULGULAR

FDT tümörlerde 6. saatte kuvvetli *Süperoksit Dismutaz (SOD)* induksiyonuna neden olmuştur. Sham grubunda enzim aktivitesi $726,35 \pm 196$ ng/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $1367,90 \pm 389$ ng/gr yaş doku olarak bulunmuştur ($p=0,0001$). Tedavi sonrası 2. saatte ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 1).



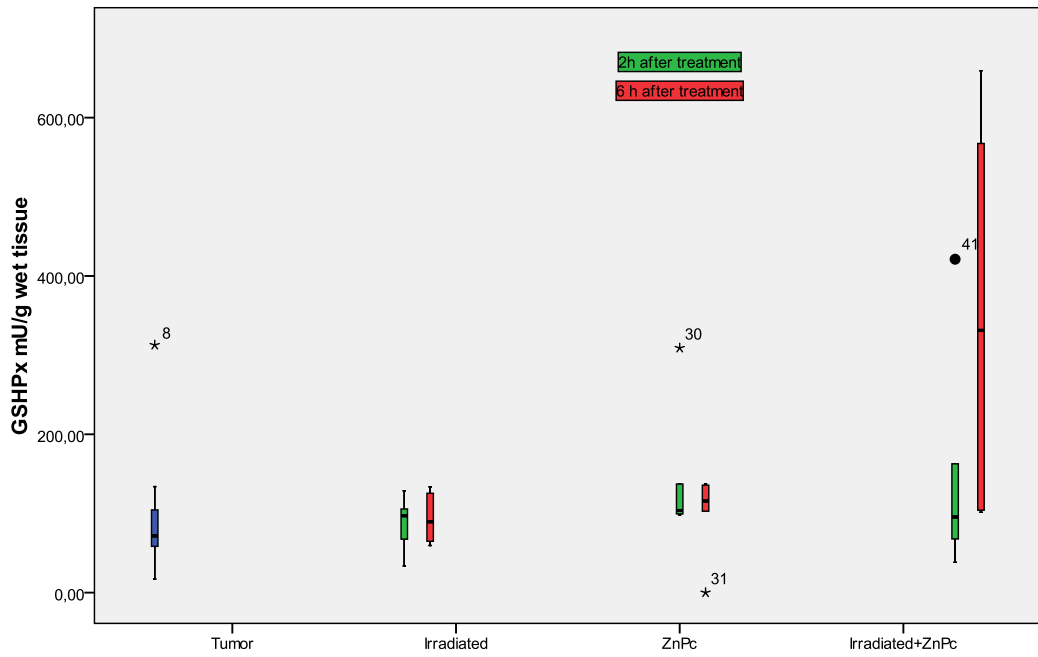
Şekil 1. Tümör dokusunda *SOD* aktivitesinin gruplara göre dağılımı

FDT tümörlerde 6. saatte *Glutasyon (GSH)* tükenmesine neden olmuştur. Sham grubunda *GSH* seviyesi $8,67 \pm 4,2$ mg/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $3,48 \pm 0,24$ mg/gr yaş doku olarak bulunmuştur ($p=0,006$). Tedavi sonrası 2. saatte ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (**Şekil 2**).



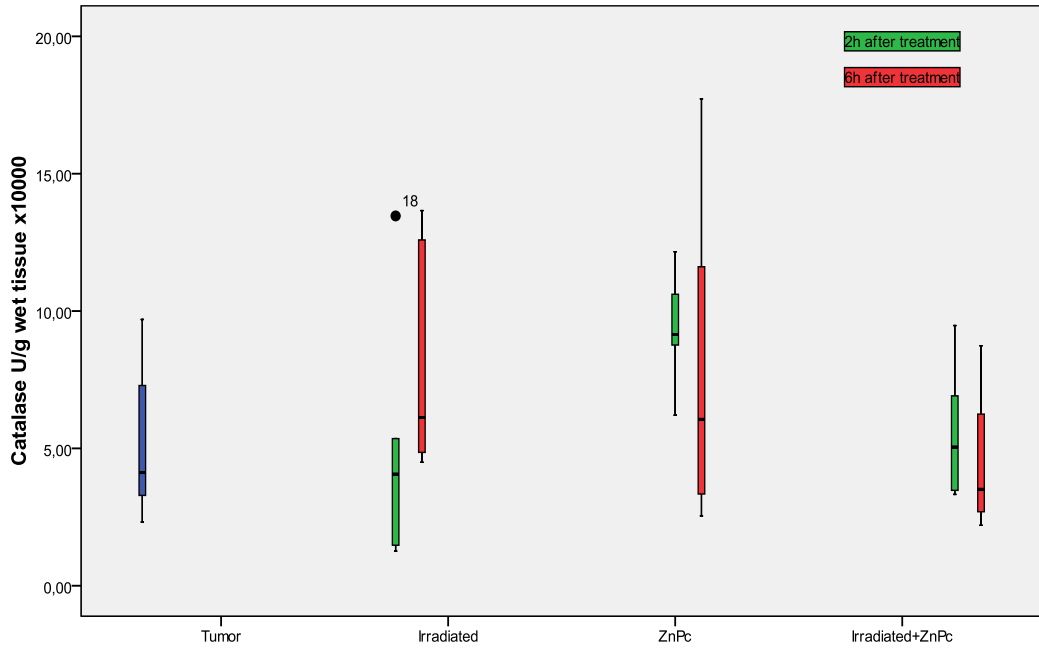
Şekil 2. Tümör dokusunda *GSH* düzeylerinin gruplara göre dağılımı

FDT tümörlerde 6. saatte *Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)* induksiyonuna neden olmuştur. Sham grubunda *GSHPx* seviyesi $93,62 \pm 75,57$ mU/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $349,19 \pm 243,05$ mU/gr yaş doku olarak bulunmuştur ($p=0,001$). Tedavi sonrası 2. saatte ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 3).



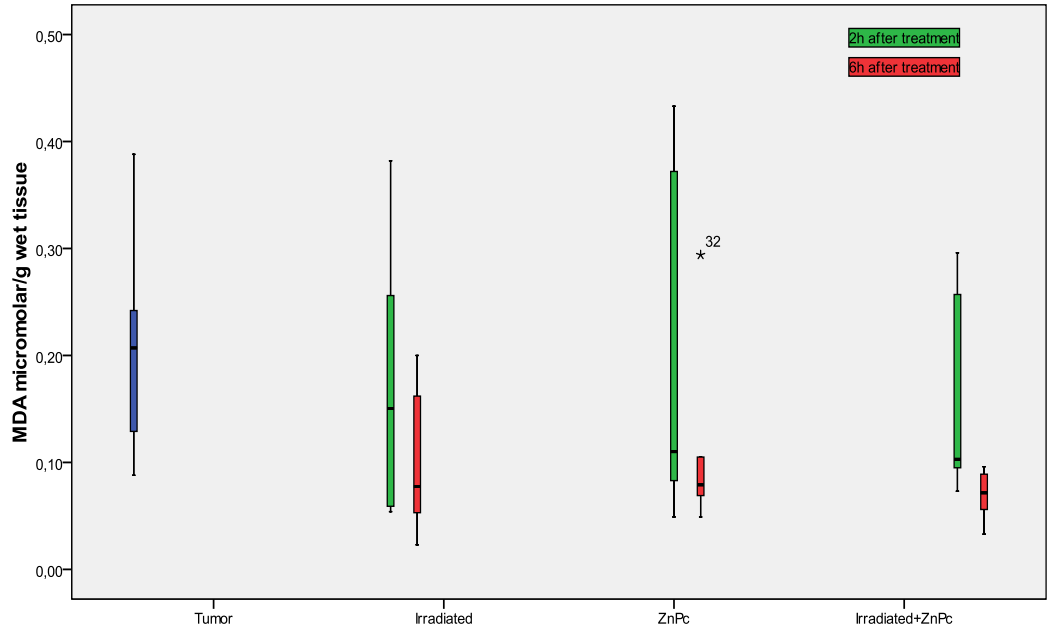
Şekil 3. Tümör dokusunda *GSHPx* düzeylerinin gruplara göre dağılımı

FDT tümörlerde *Katalaz* (*CAT*) aktivitesine etki etmemiştir. Sham grubunda *CAT* aktivitesi $5,20 \pm 2,54$ U/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $4,48 \pm 2,55$ U/gr yaş doku olarak bulunmuştur ($p=1,0$). (Şekil 4).



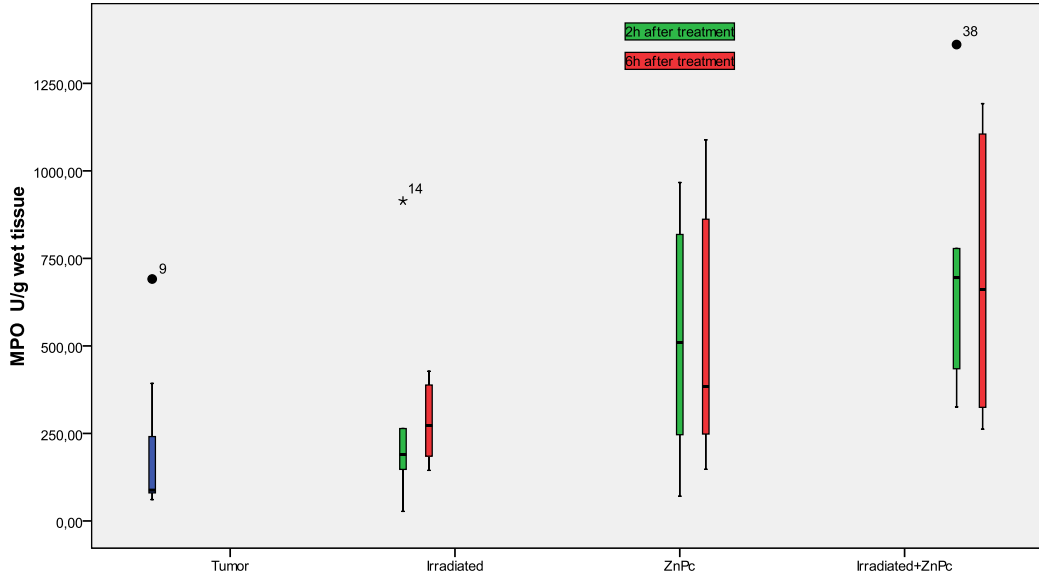
Şekil 4. Tümör dokusunda *CAT* aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan *Malondealdehit (MDA)* düzeyleri FDT ile değişiklik göstermemiştir ($p=0,14$). Sham grubunda *MDA* düzeyi $0,21\pm 0,1$ mikromol/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $0,7\pm 0,02$ mikromol/gr yaş doku olarak bulunmuştur ($p=0,79$). (şekil 5).



şekil 5. Tümör dokusunda *MDA* düzeyinin gruba göre dağılımı

Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi oksidatif stresin bir göstergesidir. FDT tümörlerde 6. saatte *MPO* aktivitesinde artışa neden olmuştur. Sham grubunda *MPO* seviyesi $188,90 \pm 55,05$ U/gr yaş doku iken tedavi grubunda 6. saatte $701,08 \pm 164,90$ U/gr yaş doku olarak bulunmuştur. ($p=0,025$) Tedavi sonrası 2. saatte ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (**Şekil 6**).



Şekil 6. Tümör dokusunda *MPO* düzeyinin gruplara göre dağılımı

5. TARTIŞMA

Çağımızın vebası olarak görülen kanser, en çok ölüme sebep olan hastalıkların başında gelmektedir. Bu hastalığın tanı ve tedavisinde teknolojinin getirdiği yenilikler doğrultusunda, her geçen gün umut verici gelişmeler yaşanmaktadır. Kanser tanımı kısaca hücrelerin istem dışı ve gereğinden fazla kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır. Genel olarak sınıflarsak iyi ve kötü huylu olmak üzere iki tür kanser vardır. İnsan vücudunun hemen hemen tüm organlarında görülebilmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ana yöntemler cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve alternatif tıp yöntemleridir. Başlıca kullanılan bu tedavi yöntemlerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ancak yinede erken teşhis edilen kötü huylu kanser hastalarında, bu yöntemlerin birçoğu iyi sonuçlar vermektedir. Kanserli dokunun tümü ya da bir kısmı ameliyatla alınabilir. Büyük bir ameliyat geçiren kişilerin iyileşmeleri haftalar ya da aylar sürebildiği gibi ameliyat sonrası olası komplikasyonlar olabilir. Cerrahi müdahale sonrası hastaya gerekli görülürse kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanabilir.

Kemoterapi, normal hücrelere olası en az zararı vererek, kanserli hücreleri öldürebilen bir ilaç tedavisi yöntemidir. [14] Mide bulantısı, kusma, saç dökülmesi, halsizlik gibi birçok yan etkileri vardır. Radyoterapi ışınla (x-ışını) tedavi yöntemidir. Vücudun içinden ve dışından ışınlama olarak ikiye ayrılır. Dıştan tedavide, x ışınları bir makineden doğrudan kanserli organa ve çevresindeki dokuya yönlendirilir. İçten tedavide ise, içine radyoaktif madde konulan kapsüller kişinin vücut boşluğuna, tümörün üzerine ya da çevresine yerleştirilir. Bazı hastalarda radyoterapiden sonra yorgunluk, deride kızarıklık ya da yanma hissi, mide bulantısı, kusma, ishal gibi yan etkiler görülebilir.

Bizim çalışmamızda bahsedilen Fotodinamik Tedavi yöntemi ise günümüz teknolojisinin ürettiği çok yeni bir yöntemdir ve henüz gelişimini tamamlamamıştır.

Bu üç ana kanser tedavi yöntemine alternatif olabilecek olan fotodinamik terapi [photodynamic therapy(PDT)] Amerika, Almanya, Japonya, İngiltere, Fransa, Hollanda, Kanada ülkelerde sağlık kurumu tarafından birçok kanser tedavi uygulamaları için onaylanmıştır [15]. FDT 1960'ların başında şekillenmeye başlamış, 1980'lerin başında Amerikan Yiyecek ve İlaç Kurulu'nun [Food and Drug Administration (FDA)] hematoporphyrin (HyD) türevi olan Photofrin isimli ilacın klinik uygulamalarına onay vermesiyle birçok kanserin tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır [16,17]

FDT, ışığa duyarlı ilacın (photosensitizer) hastaya damar yoluyla verilmesini (veya topikal olarak uygulanmasını) takiben bu ilacın tümörlü dokuda birikmesinin ardından, belli dalga boyundaki ışık ile uyarılarak tümörü yok etmesi prensibine dayanır. Basitçe fotosensitizer (fotoduyarlaştırıcı) bir bileşik, belirli bir ışık gücünden etkilenen ve çoğunlukla organik olan bileşiklerdir. Bu bileşikler, ışıkla etkileştiğinde uyarılır ve uyarıldıktan sonra eski haline dönüşte açığa çıkan enerji, singlet oksijen dediğimiz bir oksijen türünü aktive eder. İşte fotodinamik terapi için gerekli olan bu singlet oksijendir. Bununla ilgili kanser tedavisinde birçok klinik çalışma mevcuttur. **Bizim çalışmamızda da kanser hücrelerine seçicilik sağlanarak biyolojik etkinin arttığı gösterilmiştir.**

FDT şuanda gelişimini tamamlamış bir yöntem değildir. Özellikle deri ve yüzeysel kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. İç organlardaki kanser tedavileri için öncül fotosensitizer bileşiklerin tasarımına ve sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tedavi yönteminde ışığı fiberoptik kablolarla mide, akciğer ve kalın bağırsak gibi organlara göndermek mümkün olsa da fotodinamik tedavi en çok ışığın rahatlıkla yönlendirilebildiği cilt kanserlerinde sıklıkla kullanılabilir. Şu aşamada en çok amaçlanan ve istenilen şey fotosensitizer bileşiğin kanserli hücreye direkt olarak ulaşması ve diğer önemli organ kanserlerinde kullanılabilmesi için daha uzun süreli uyarılma ve daha uzun süreli singlet oksijen konsantrasyonuna sahip bileşikler elde edilmesidir.

Belki şuan için değil; ama gelecekte kanser tedavisinde en çok kullanılan tedavi yöntemlerinden biride fotodinamik terapi (FDT) olacaktır. Kaposi

sarkomu, bazal hücreli karsinom, deri metastazları, akciğer squamoz hücreli karsinomu, meme ve deri kanseri metastazları, malign melanoma, Paget hastalığı, gibi malign süreçlerde klinik uygulamaları mevcuttur. Kanser dışında aktinik keratoz, mukozis fungoides, epilasyon, macula dejenerasyonu gibi alanlarda klinik uygulamaları mevcuttur.

Kaposi sarkomu tedavisinde radyoterapi bilinen etkin bir tedavi şeklidir. FDT'nin mukokutanöz kaposi sarkomunda palyatif ya da küratif etki göstereceği düşünülmüş; Schweitzer ve arkadaşları tarafından AIDS'e sekonder gelişen oral Kaposi sarkomunda fotodinamik tedavi etkinliği araştırılmıştır. 7 hastanın 4'ünde tam iyileşme görülürken; 3 hastada kısmi iyileşme saptanmıştır. **Özellikle immunsupresif hastalarda daha fazla immunsupresyona neden olmadığından FDT tercih edilebilecek bir tedavi şekli olarak kabul edilmektedir. [38]**

Rhodes ve arkadaşları, Nodüler Bazal Hücreli Karsinom'u olan hastalarda FDT'nin 5 yıllık etkinliğini araştırmışlardır. 50 hastada bulunan 53 BHK lezyonuna yerel metil aminolevulinatla yapılan FDT, arkasından 570-670 nm dalga boylarında kırmızı ışık uygulamışlar. Sonuçta 5 yıllık nüks oranı %14 olarak saptanmıştır. **FDT medikal nedenlerden dolayı cerrahi uygulanamayan veya önceden radyasyon tedavisi almış hastalara uygulanabilecek alternatif bir yöntemdir. [39]**

Deri metastazlarında FDT'nin rolü genelde palyatiftir. Özellikle meme kanseri metastazlarında sistemik fotosensitizörler kullanılmıştır. **Ancak ışık ile metastatik tümör penetrasyonu tam olmadığından başarı az nüks sık bulunmuştur.**

Lowdell ve arkadaşları, Hematoporfirin türevleri'nin kilo başına 1,5-2 mg ve bakır buhar boya lazerle akciğerin skuamöz hücreli karsinomu ve memenin adenokarsinomuna sekonder 50 kutanöz ve subkutanöz tümörün tedavisinde %81 tam cevap elde edildiği bildirilmiştir. [42] **FDT, günümüzde sıklıkla deri ve yüzeysel kanser tedavilerinde kullanılmaktadır.**

Malign melanoma (MM) lezyonları boyunca ışığın penetrasyonu onların melanin içerikleri nedeniyle belirgin ölçüde azalmıştır. Hafif pigmente melanoma

tümörleri porfirin içerikli FDT’de daha iyi sonuçlar göstermektedir. Malign melanoma lezyonlarında porfirin sodyum veya Hematoporfirin türevleri kullanılarak uygulanan sistemik FDT’de önemli sonuçlar elde edilmiştir, fakat kısa süreli cevaplardır. Mevcut bilgiler ışığında FDT’nin, MM’un alternatif tedavi yöntemleri kadar etkili olmadığı söylenebilir. FDT amelanotik metastatik lezyonların tedavisinde faydalı olabilmesine rağmen, primer deri melanomu için uygun bir tedavi şekli değildir. [42]

Petrelli ve arkadaşları, geleneksel tedaviye dirençli perianal meme dışı Paget hastalığı için HPD ve 630 nm argon pompalı boya lazer kullanarak uyguladıkları FDT sonucunda başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. Stender ve Wulf, aktinik keilitli 3 hastaya uyguladıkları yerel %20 ALA ve slayt projector tedavisinde %100 tam cevap elde etmişlerdir. Aktinik keilit tedavisinde FDT, kriyoterapi, CO2 lazer, 5-fluorourasil ve retinoidler gibi tedavi yöntemlerine göre (hepsi etkisizdi) belirgin üstünlük göstermiştir. Benzer sonuçlar ALA aracılı FDT’nin keratoakantomlarda uygulanmasıyla 24-36 aylık takip boyunca hiç nüks görülmemesiyle elde edilmiştir. [42]

Hem *in vivo* hem *in vitro* çalışmalarda düşük oksijen konsantrasyonlarında FDT etkilerinin azaldığı veya kaybolduğu gösterilmiştir. Vaskülarizasyonun az olduğu hipoksik tümörlerin FDT direnci göstermesi, hem bu etkiye hem de sistemik uygulamalarda azalmış vaskülarizasyon nedeniyle fotosensitizörlerin tümör sahasına taşınma güçlüğüne dayanmaktadır. Ayrıca FDT sonrası IL-1 β , IL-2, TNF- α gibi sitokinlerin üretildiği gösterilmiş ve klinik cevapta katkıları olabileceği düşünülmüştür. **Yine bir çeşit programlanmış hücre ölümü olan apoptozun da FDT’yi takiben oluşabileceği bildirilmiştir.** [44]

Litaratüre baktığımızda Bezmialem Vakıf Üniversitesinde ileri evre pankreas tümörlerinde yapılan deneysel bir çalışmada, 2 yeni ışığa duyarlı madde olan Fotolon ve ICG kullanılarak FDT’nin pankreas tümöründe etkin olduğunu ve hücre ölüm şeklinin apoptoz olduğunu göstermişlerdir. **Özellikle tümör boyutunu cerrahi sınırlara indirgemede veya yok etmede öncü bir tedavi seçeneği olarak pankreas tümörü tedavisinde ümit vaat etmektedir. Bizim çalışmamızda TEG-Pc ile**

ratlara yapılan FDT’de tümör boyutunun azaldığı, takipte ise tümörün kaybolduğu gözlenmiş ve bununla ilgili ikinci bir proje çalışması yürütülmektedir.

FDT, sıklıkla dermatolojik hastalıklarda da uygulanmakta ve bununla ilgili birçok klinik çalışma mevcuttur. Aktinik Keratoz dermatolojik FDT için en iyi endikasyonlardan biridir. Çalışmaların çoğunda yerel % 20 ALA kullanılmış ve yüz ve baş yerleşiminde %71-100 oranlarında tam cevap alınmıştır.

Wolf ve arkadaşları, histopatolojik olarak %20’lik ALA’nın ve 40 J/cm²’lik ışıkla 4-5 seans FDT’nin Mukozis Fungoides plaklarını tam iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Recio ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, FDT’nin yama, plak evre ve tek lezyonlu Mukozis Fungoides tedavisinde başarıyla kullanılabileceğini bildirmiştir. **Bu cesaret verici sonuçları doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.** [40]

Endotel hücre hasarına neden olması nedeni ile Lin-Xiao ve arkadaşları tarafından şarap lekesi tedavisinde kullanılmıştır. FDT uygulanan 130 hasta tedavi sonrasında etkinlik açısından değerlendirildiğinde; %98.3 oranında tedaviye yanıt gözlenmiştir. **FDT lazerden tamamen farklı etki mekanizması ve tatmin edici sonuç elde edilmesi nedeni ile umut vaad etmektedir.** [43].

Epilasyon amaçlı fotodinamik tedavinin temeli yerel uygulama ile pilosebase ünitelerde yoğunlaşma eğiliminde olan 5-ALA’nın kıl foliküllerinde selektif fotokimyasal destrüksiyon oluşturucu etkisine dayanmaktadır. Han ve arkadaşları, fotodinamik tedavi uygulanan sıçanlarda, epidermiste destrüksiyon nedeniyle depilasyon sonrası kıl indüksiyonunun inhibe olduğu sonucuna varmışlardır. [44]

Fotodinamik epilasyon konusunda Groszman ve arkadaşları, 1995 yılında, fotodinamik epilasyon uygulanan 11 olgu bildirilmişlerdir. FDT sonrası alınan biyopsilerde epidermis ve kıl foliküllerine lokalize olan bir destrüksiyon saptanmış ancak dermiste korunduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmaların verileri ışığında FDT’nin epidermis ve kıl foliküllerinde seçici hasar oluşturduğu, bu etkinin düşük

dozlarda (100 J/cm²) kıl uzamasında gecikme, yüksek dozlarda (200 J/cm²) ise kalıcı kıl kaybına neden olduğu sonucuna varılmıştır. [46]

Fotodinamik epilasyon konusunda henüz yeterli veri olmamasına rağmen tüm deri tiplerinde ve tüm kıl renklerinde etkin olabilmesi ve uygun protokollerde uygulandığında kalıcı epilasyon sağlayabilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntem olarak görülmektedir. [47]

FDT uygulaması sonrasında ortaya çıkan yan etkilerle ilgili literatürde klinik çalışmalar mevcuttur. Bu yöntemin bir takım kısıtlamaları ve aynı zamanda büyük potansiyel avantajları da vardır. Örneğin kemoterapide karşılaşılan yan tesirlerin ortaya çıkmadığı gözlenmiştir. **Diğer tedavi yöntemlerinde bağışıklık sistemi baskılanırken bu yöntemde tam tersine bağışıklık sistemi güçlenmektedir. Bu açıdan FTD' nin kanser tedavisinde avantajlı olduğu düşünülmüştür.**

Işık maruziyeti esnasında hasta, ışınlanan alanda ağrı, batma, yanma ve kaşıntı hissedebilir. Bu şikayetler uygulamanın ilk birkaç dakikası içinde görülebilir ve birkaç saat kadar devam edebilir. Tedavi alanında eritem ve hafif ödem yaygın yan etkilerdir. Aşırı doz ışık tedavisi bül oluşumu, ülserasyon ve nekroz gibi şiddetli reaksiyonlara neden olabilir. Selektif deri nekrozu etkin bir kanser tedavisi için gerekliyse de, psoriasis gibi benign inflamatuvar dermatozlarda istenmeyen bir etkidir. Yine tedavi sahasında hipo-hiperpigmentasyon veya skatris gibi yan etkiler görülebilir. [48]

Görünür ışık herhangi bir kutanöz karsinogenez riski taşımadığı halde FDT'nin uyardığı serbest oksijen radikallerinin potansiyel genotoksisitesine dikkat çekilmiştir. Yerel ALA-FDT ile saçlı deride, çıplak alanda mevcut olan 28 Aktinik Keratoz ve 3 süperfisyel Squamoz Hücreli Karsinom için 7 seans tedavi gören bir hastada, 6 ay sonraki kontrollerde Aktinik Keratoz'lara komşu bir alanda (4 kez FDT seansı uygulanan kısımda) malign melanom (eksizyon sonucu Clark II, Breslow 0.4mm) izlenmiştir. FDT'nin DNA'yı direkt olarak hasarlamadığı, dolayısıyla mutajenik olmadığı bilinmekle beraber, immunosupresif etkileriyle karsinogeneze katkısı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca tekrarlanan FDT uygulamalarının bariz

inflamasyona neden olduğu, ısrarlı inflamasyonun tümör uyarıcı etkisine dikkat çekilmiştir. Özet olarak FDT'nin direkt tümör başlatıcı olmasa da klinik olarak görülmeyen, fakat önceden mevcut olan malign melanositik hücreleri uyarak hızlı tümör formasyonuna neden olduğu sonucuna varılmıştır.[46]

Hipertermi FDT'nin etkisini artıracak önemli bir faktördür. Tek başına FDT uygulanan hastalara göre daha başarılı sonuçlar alınmıştır. [46]

Tümörün makroskopik olarak radikal çıkarılmasından sonra tümör yatağında kalabilecek ve kanserin nüksüne yol açabilecek rezidüel neoplastik hücreler için FDT uygulanması kanser hücrelerinin eradikasyonu için önemli bir yöntemdir. Baş ve boyun bölgesinin ileri infiltratif karsinomlarının iyileşme oranlarının tümör rezeksiyonundan sonra uygulanan FDT ile arttığı bildirilmiştir.

Boyunda Skuamöz Hücreli Karsinom'un sık nüksü intraoperatif FDT uygulanan 10 hastaya, 40 aylık takipte sadece birinde nüks görüldüğü ve yüksek oranda cevap alındığı bildirilmiştir.[49-50]

Meme karsinomundan gelişen metastazlara fotofrin ve mitomisin-C'nin birlikte uygulanması nüks oranlarını azalttığı bildirilmiştir. **Fitalosiyaninli FDT** ve metaklopramid hidroklorid, benzamid türevlerinin birlikte uygulanımı, radyoterapi ve kemoterapi esnasında tümör ablasyonunu arttırdığı, %100 başarı sağlandığı ve 150 günlük takipte tümörün nüks etmediği, buna karşın sadece FDT uygulanan hastalarda %80-%90 başarı ve 20 gün sonra nüks gözlemlendiği bildirilmiştir. **Bu açıdan literatür bilgilerine bakıldığında tümör nüksü ve metastatik hastalık tedavisinde FDT'nin kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte kullanıldığında etkinliğinin arttığı düşünülmüştür.**

Tümörlü hücrenin yayılmadan yok edilmesi kanser tedavilerinin temel amaçlarından biridir. Fakat günümüzde uygulanan yöntemlerde sağlıklı hücrelere de zarar gelmektedir. Bu noktada ftalosiyanin ve porfirazin bileşiklerinin ikinci kuşak foto algılayıcılar olarak 600-800 nm bölgesinde şiddetli absorpsiyon yapmaları, singlet ve radikal oksijen üretme(reaktif oksijen türevleri=ROS) potansiyeline sahip

olmaları bu maddelerin fotodinamik tedavide foto algılayıcılar olarak kullanılmalarını sağlamıştır [18-21].

Fotodinamik tedavi temel ve klinik tıp bilimleri ile biyoteknik şirketlerin birlikte çalışmalarını gerektirir. Biyoteknoloji endüstrisi, ALA-FDT'nin FDA onayından beri fotodinamik tedavi çalışmalarına daha fazla önem vermektedir. Daha etkili fotosensitizan maddelerin ve ışık kaynaklarının gelişmesi FDT'nin etkinliği için çok önemlidir. Klinik çalışmalar yeni endikasyonlarda FDA onayı sağlayacaktır.

Son yıllarda artan çalışmalar FDT nin moleküler, hücresel ve doku düzeyinde anlaşılmasına yöneliktir. Ana P. Castano ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada FDT nin birçok hücresel sinyal olaylarına aracılık ederek hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir. [36] **Bizim çalışmamızda da hücresel enzimatik değişiklikler gösterilmiştir.**

Reaktif oksijen metabolitleri, süperoksit radikalinin ortamdaki temizlenmesini sağlayan *süperoksit dismutaz (SOD)* enziminin tanınması ile yetmişli yıllardan itibaren yoğun ilgi çekmeye başlamıştır. Oksijen molekülüne bir fazla elektronun eklenmesi sonucu oluşan bir reaktif oksijen metaboliti yani süperoksit radikalinin (O_2^-) ortadan kaldırılması *SOD* enziminin katalize ettiği bir reaksiyon ile gerçekleşir. Bu reaksiyon esnasında da ortama hidrojen peroksit açığa çıkar. Reaktif oksijen metabolitlerinin toksik etkilerine engel olmak için çeşitli antioksidan mekanizmalar devreye girer. Bunlardan en önemlisi de süperoksit radikalini ortadan kaldıran *SOD* enzimidir. Ayrıca nötrofillerde bulunan *myeloperoksidaz(MPO)* enzimi ,klor iyonu(Cl^-) varlığında hidrojen peroksiti güçlü bir oksidan ajan olan hipoklorik asite dönüştürür. Hidrojen peroksitin büyük bir kısmı *Katalaz(CAT)* tarafından su ve oksijene parçalanır bir kısmı da *Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)* etkisiyle yıkılır. Hidrojen peroksit tek başına hücreler üzerine toksik etkilere sahiptir. Çünkü hidrojen peroksit hücrede deoksiribonükleik asit (DNA) harabiyeti, membran yıkımı ve kalsiyuma bağımlı *Proteaz* ve *Nükleazların* aktivasyonuna yol açan kalsiyum iyon salınımına neden olur. Bu harabiyetin bir kısmı hidrojen peroksit ile süperoksit radikali arasında demir yada bakır iyonları varlığında gelişen bir reaksiyon sonucu açığa çıkan oldukça yüksek reaktiviteye sahip hidroksil (OH^-) radikalidir. Hidrojen

peroksite ortadan kaldırılmasında ve hidroksil radikalının oluşumunun indirekt önlenmesinde *Katalaz(CAT)* ve *Glutasyon Peroksidaz(GSHPx)* enzimleri rol oynar. Bu yüzden *SOD*, *CAT* ve *GSHPx* ile birlikte hücre içinde oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin değişime uğramasına neden olarak antioksidan savunmanın ilk basamağını oluşturur. *GSHPx*, redükte glutasyonun okside glutatyona dönüştüğü reaksiyonda hidrojen peroksiti kullanır ve hücre içinde hidrojen peroksit birikimine sebep olur [36].

Reaktif oksijen metabolitlerinin aşırı miktarda üretimi hücre harabiyeti ile sonuçlanır. Bunlardan hidrojen peroksit adozintrifosfat (ATP) sentezinin inhibisyonuna neden olarak DNA harabiyeti gelişir. Nitekim, bu metabolitlerin hücre membranında başlattıkları lipid peroksidasyonunun ürünleri (*Malondealdehit,MDA*) de yine DNA harabiyetine yol açmaktadır. Açığa çıkan lipid peroksitler de reaktif oksijen metabolitlerine benzer şekilde hücresel komponentlerde toksik etkiler gösterir. [37].

Antioksidan enzimler hücrelerin oksidatif stresten korunmasında önemlidir. *SOD* ve *GSHPx*, hücre canlılığının korunmasında önemlidir. *SOD* seviyeleri tümörlerde genellikle düşüktür. **Bizim çalışmamızda FDT ile kontrol gruplarına göre oldukça artmış *SOD* aktivitesi tespit edilmiştir.** *SOD* esas olarak süperoksit radikallerini hidrojen perokside dönüştürür. Bu oluşan hidrojen peroksit katalaz yada *GSHPx* ile ortamdan uzaklaştırılır. Hidrojen peroksit seviyeleri düşük konsantrasyonlarda iken etkili olan enzim *GSHPx* dir. **Bizim çalışmamızda FDT ile 6. Saatte artmış *SOD* ve *GSHPx* aktivitesi bulunmuştur.** Bu da bize hücresel düzeyde düşük ancak sabit bir seviyede hidrojen peroksit oluştuğunu düşündürmektedir.

Hücresel oksidatif stres çeşitli yöntemlerle tespit edilebilir. Antioksidan enzim düzeyleri, *MPO* aktivitesi ve *MDA* düzeyi ölçümleri bu amaçla kullanılan yöntemlerdendir. **Bizim çalışmamızda bu ölçümler kullanılarak hücresel oksidatif stres ölçülmüştür.**

Reaktif oksijen türevleri proteinlerde oksidatif değişikliklere neden olur. Hücre içinde oluşan oksidatif stress tiol gruplarının oksidasyonuna neden olur. FDT'nin proteinler üzerindeki etkisi ile enzimatik fonksiyonlarda değişiklikler ortaya çıkar. Proteinlerin sistein tiol grupları enzim fonksiyonları açısından çok önemlidir. Bu gruplar oksidasyona uğradığında enzimlerde yapısal, katalitik ve düzenleyici fonksiyonlarda değişiklikler olur. **Bizim çalışmamızda FDT ile oluşan oksidatif stres *Glutasyon* düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. *Glutasyon(GSH)* düzeylerindeki azalma protein yapısındaki enzimlerdeki tiol gruplarının oksidasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir. Enzim aktivitesindeki bozulmaların neden olduğu hücrel hasar antiinflamatuvar mekanizmaları etkilemektedir. Bunun en önemli göstergesi hücrel nötrofil infiltrasyonu ve *MPO* aktivitesindeki artıştır. Bizim çalışmamızda da artmış *MPO* aktivitesi saptanmıştır.**

FDT, tümörde akut inflamasyon, sitokin ve stres yanıt proteinlerinin salınımını artırıp lökosit işgaline neden olur. Bu da immün sistemin uyarılarak tümör hasarına yol açmasına neden olur.

Artmış serbest oksijen radikalleri lipit peroksidasyonuna neden olur. Bunun göstergesi artmış *MDA* düzeyleridir. **Bizim çalışmamızda *MDA* düzeylerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir.** D.Daııocıvcıu ve ark. çalışmasında FDT ile artmış lipit Peroksidasyonu tespit edilmiştir. Bunu singlet oksijen oluşumuna bağlamışlardır. Singlet oksijen oluşumu FDT de tip 2 mekanizma olarak bilinmektedir. Artmış hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit seviyeleri ise tip1 mekanizma olarak bilinir. **Bizim çalışmamızda Tip1 mekanizmanın hücrel hasara neden olduğu düşünölmektedir.**

Sonuç olarak bizim çalışmamızda TEG-Pc nin *in vivo* etkin bir fotosensitizer olduğu gösterilmiştir. **TEG-Pc ile FDT, Walker 256 karsinom hücre hattı kullanılarak oluşturulan tümör dokusunda serbest oksijen radikalleri oluşumuna sebep olmuştur.**

Bu ajanlar oksidatif sistemi uyarırlar ve antioksidatif sistemde değişikliklere sebep olurlar. Tümör hücre harabiyeti bu değişiklikler sonucu olabilir. Bu deneysel modelde TEG-Pc kullanılarak fotodinamik çalışma yapılmıştır. FDT uygulanan ratlarda; plazmada oksidatif değişiklikler, eritrositlerde ise antioksidan enzimler aktifleşmiştir.

6. SONUÇ

Bu proje için kullanılmış olan ftalosiyanin molekülünün tasarımı özgündür. İn vitro antikanser özellikleri bu çalışma ile gösterilmiştir ve ilaç hammaddesi olarak kullanımı söz konusu olacaktır.

Molekülün, sentez yönteminin ve hedeflenen uygulama alanının özgünlüğü nedeniyle elde edilen sonuçlar yüksek etki faktörlü bir dergide yayınlanmasını sağlayacaktır.

Ülkemizde uygulamaya yönelik çalışmalar çok azdır. Bu proje bu alandaki boşluğun doldurulmasına katkı sağlamıştır.

Sunulmuş olan çalışma daha da geliştirilecek ve ülkemizde kanser tedavisi alanında yapılan öncü çalışmalar arasında olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Tuncel S., Dumoulin F., Gailer J., Sooriyaarachchi M., Atilla D., Durmuş M., Bouchu D., Savoie H., Boyle R.W., Ahsen V., Dalton Trans., 40, 4067-4079, 2011.
2. Moser F.H. The Phthalocyanines, Properties. CRC. Boca Raton, Florida, 1983 pp. 1-20
3. De Diesbach H. Von der Wied E. Helv. Chim. Acta, 1927; 10:886.
4. Leznoff CC., Lever ABP. Phthalocyanines properties and applications, vols. 1-4. Weinheim: VCH; 1989-1996.
5. McKeown N.B. Phthalocyanine materials: synthesis, structure and function. Cambridge University Press; 1998,
6. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 20 Phthalocyanines 1992:213
7. Ahsen V. Yilmazer E., Ertaş M., Bekaroğlu Ö. J Chem Soc Dalton Trans 1988;401
8. Hanak M., Gül A., Hirsch A., Mandal B.K., Subramanian L.R., Witke E Mol Cryst 1990;187;365
9. Weber J.H. Busch D.H. Inorg Chem. 1965;4:469
10. Kobayashi N., Shirai H., Hojo N. J Chem Soc Dalton Trans 1984:207
11. Derkacheva V.M., bundina N.I., Merkhryanova N.G., Kaliya O.L., Gulinat T.Y., Lukyanets E.A. Russ J Inor Chem Engl Ed. 1981;26:911
12. Al-Raqa S.Y. Dyes and Pigments 2008;76:259.
13. Durmuş M., Nyokong T. Inorganic Chemistry Communications 2007;10:332.
14. Tayyaba H., Bernhard O., Anne C.E.M., Brian W.P., Radiation Oncology, 2000;40:605.

15. Zheng H., *Technol Cancer Res Treat.* 2005,4:283.
16. Patrice T., *Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology-Vol2*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2003.
17. Lawrence E., Patonay G., *Effects of Organic and Aqueous Solvents on the Electronic Absorption and Fluorescence of Chloroaluminum(III) Tetrasulphonated Naphthalocyanine*, *Talanta*, 1999; 48: 933
18. Gilbert A., Baggott J. *Essentials of Molecular Photochemistry* 1991:501
19. Dellinger N.L., *Photochem. Photobiolog.* 1996;64:182.
20. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. *Photochem. Photobiolog. Sci.*
20. Yukruk F., Doğan A.L., Canpınar H., Güç D., Akkaya E.U. *Org. Lett.* 2005;7:2885.
21. Hu M., Brassuer N., Yildiz S.Z., Van Lier J.E., Leznoff C.C., *J. Med. Chem.* 41, 1789-1802, 1998.
22. Sergeyeva T.A., Lavrikb N.V., Rachkova A.E., Kazantsevab, Z.I., Piletskya S.A., El'skaya A.V., *Anal. Chim. Acta* 391, 289-297, 1999.
23. Waldmeier P., Sigel H., *Inorg. Chim. Acta*, 5,659-665, 1971.
24. Shirai H., Maruyama A., Kobayashi K., Hojo N., Urushido K., *J. Polym Sci., Polym. Lett. Ed.* 17, 661-666, 1979.
25. Hamla M., Castro K.A.D.D., Taviot-Gueho C., Prevot V., Forano, C., Wypych F., Nakagaki S., *J. Catal.*, 257, 233-243, 2008.
26. Higaki S., Hanabusa K., Shirai H., Hojo N., *Macromol. Chem.*, 184, 691-699, 1983.
27. Miyauchi M, Nakamura H, Furukawa F, Son HY, Nishikawa A effects of combined antioxidant and sodium nitrate treatment on forestomach

- carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Letters* 178,19-24,2002
29. Robert BC., Kufe DW, Pollock RE Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine* 5, American Cancer Society, 2000.
30. Suguira K. *Tumor Transplantation*. American Cancer Society, 1962
31. Devita TV, Hellman S Jr, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 1985
32. Tope WD, Shaffer JJ. *Photodynamic Therapy. Dermatology' de. Ed.* Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. 2. Baskı. Philadelphia: Elsevier, 2003; 2127-2141.
33. Hönigsmann H, Szeimies RM, Knobler R. *Photochemotherapy and Photodynamic Therapy. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine' de. Ed.* Wolf K, Goldsmith L, Gilchrist B, Paller A, Leffell D. 7. Baskı. New York: Mc Graw Hill, 2008; 2249-2262.
34. Calzavara PG. *Photodynamic therapy: The present and the future. J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 2 (Suppl 2):71.
35. Dilkes MG, DeJode ML, Rowntree-Taylor A, McGilligan JA, Kenyon GS, McKelvie P. M-THPS photodynamic therapy for head and neck cancer. *Lasers Med Sci.* 1996; 11: 23-29
36. Halliwell B: *Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease, Am J Med* 91 (Suppl 3C), 16S, 1991
37. Halliwell B, Aruoma OI: *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, FEBS Lett* 281:9, 1991
38. Schweitzer VG, Visscher D. *Photodynamic therapy for treatment of AIDS-related oral Kaposi's sarcoma. Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102: 639-48.
39. Rhodes LE, de Rie MA, Leifsdottir R, Yu RC, Bachmann I, Goulden V, Wong GA, Richard MA, Anstey A, Wolf P. *Five-year follow-up of a randomized,*

prospective trial of topical methyl aminolevulinic acid photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2007; 143(9): 1131-1136.

40. Recio ED, Zambrano B, Alonso ML, de Eusebio E, Martín M, Cuevas J, Jaén P. Topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of unilesional mycosis fungoides: a report of two cases and review of the literature. *Int J Dermatol* 2008; 47(4): 410-413.

41. Gold MH. Lasers, Photodynamic therapy and the treatment of medical dermatologic conditions. *Laser Dermatology*'de. Ed. Goldberg DJ. 1. Baskı, Berlin: Springer, 2005; 99-121.

42. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am Acad Dermatol*. 2000; 42: 389-413.

43. Xiao-xi L, Wei W, Shuo-fan W, Chuan Y, Ti-Sheng C. Treatment of capillary vascular malformation (port-wine stains) with photochemotherapy. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99: 1826-30.

44. Hönigsmann H, Szeimies RM, Knobler R. Photochemotherapy and Photodynamic Therapy. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*'de. Ed. Wolf K, Goldsmith L, Gilchrist B, Paller A, Leffell D. 7. Baskı. New York: McGraw Hill, 2008; 2249-2262.

45. Tsoukas MM, Gonzalez S, Flotte TJ, Anderson RR, Sherwood ME, Kollias N. Wavelength and fluence effect on vascular damage with photodynamic therapy on skin. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 303-308.

46. Tope WD, Shaffer JJ. Photodynamic Therapy. *Dermatology*'de. Ed. Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. 2. Baskı. Philadelphia: Elsevier, 2003; 2127-2141.

47. Grossman MC, Wimberly J, Dwyer P, Flotte TJ, Anderson RR. PDT for hirsutism. *Lasers Surg Med* 1995; 7 (suppl): 44.

48. Bissonnette R, Lui H. Current status of photodynamic therapy in dermatology. *Dermatol Clin.* 1997; 15: 507-519.

49. Wolf P, Fink-Puches R, Reimann-Weber A, Kerl H: Development of malignant melanoma after repeated topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid at the exposed site. *Dermatology* 1997; 194: 53-54.

50. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990; 6: 143-148.