

Vitamin B Kompleksinin Fotodinamik Terapiyle Kolon Kanserine Etkisi

Effect of Vitamin B Complex on Colon Cancer by Photodynamic Therapy

Asiye GÖK YURTTAŞ^{1*}, Kamil ÇINAR²

¹ İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, İstanbul, Türkiye

² Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Katıhal Fiziği Anabilimdalı, Kocaeli, Türkiye



Ö Z

Amaç: Kolon kanserleri, hastanın yaşam kalitesini derinden etkileyen ve çeşitli komplikasyonlarla ilişkili kronik ölümcül bir hastalıktır. Vitamin B kompleksi, gıda takviyesi olarak alındığında olumlu anti-inflamatuar etkiler göstermektedir. Bu çalışma, fotodinamik terapiyle lipozumlu vitamin B kompleksinin kolon kanserlerinde (HCT-116 ve HT-29 hücre hattı) anti-kanser etkisini araştırmayı amaçlamıştır.

Materyal- Metot: Çalışmanın birinci basamağını oluşturan Vitamin B kompleksi lipozom ile kapsüle edildi. Lipozumlu vitamin B kompleksi Zetasizer cihazı ile karakterize edildi. Lipozumlu vitamin B kompleksi MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile HCT-116 ve HT-29 hücre hattında % canlılık oranlarına bakılmıştır. Aynı hücre hatlarında vitamin B kompleksinin fotodinamik terapi etkisiyle hangi ölüm yollarını seçtiğini göstermek için de akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Lipozumlu vitamin B kompleksinin boyutları 100 nm ile 200 nm aralığında değiştiği belirlendi. Lipozumlu vitamin B kompleksi (fotosensitizer) 7,5 J/cm² ışık dozunda 0,25 mg/ mL'de karanlık deneyinde HCT-116 hücre canlılık yüzdesi %75 iken ışık deneyi sonrası bu oran %47'lere düşmüştür (****p<0.001). 0,5 mg/mL vitamin B kompleksi çözeltisi için yapılan karanlık deneyinde HT-29 hücre canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %35'lere düşmüştür (****p<0.001). Arzu edilen fotodinamik etkinlik bu sonuçlara daha yakındır. Hücre ölüm yolları belirleme deneyinde lipozomlanmış vitamin B kompleksinin konsantrasyonu 1mg/mL olarak HCT-116 ve HT-29 hücrelerine uygulanmıştır. HCT-116 hücre hattında %40 oranında apoptoz görülürken HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptoz görüldü.

Sonuç: Pazarlanan ilaçları yeniden konumlandırmak, yeni antitümör ilaçları keşfetmek için yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Pazarlanan ilaçlar için yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi, yeni anti-tümör ilaçları geliştirmenin etkili ve hızlı yolu olduğu kanıtlanmıştır. Verilerimiz *in-vitro* olarak bazı kolon kanser türlerinde vitamin B kompleksinin fotodinamik terapiyle kullanımının ümit vaat ettiğini savunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik terapi, kolon kanseri, ilaç yeniden konumlandırma, vitamin B kompleksi, lazer

Alınış / Received: 08.11.2022 Kabul / Accepted: 05.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

Objective: Colon cancer is a chronic fatal disease that severely affects the quality of life of patients and is associated with various complications. Vitamin B complex shows positive anti-inflammatory effects when taken as a food supplement. The aim of this study was to investigate the anti-cancer effect of vitamin B complex with liposomes in colon cancers (HCT-116 and HT-29 cell lines) using photodynamic therapy.

Material-Method: Vitamin B complex, which is the first step of the study, was encapsulated with liposome. Vitamin B complex with liposome was characterized by Zetasizer device. The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to determine the % survival rates in HCT-116 and HT-29 cell lines. The same cell lines were also analyzed by flow cytometry to show which death pathways were selected by the vitamin B complex with the effect of photodynamic therapy.

Results: It was found that the dimensions of the vitamin B complex with liposomes varied between 100 nm and 200 nm. Liposomal vitamin B complex (photosensitizer) at 7.5 J/cm² light dose at 0.25 mg/mL in the dark experiment, while the percentage of HCT-116 cell viability was 75%, this rate decreased to 47% after the light experiment (****p <0.001). While the percentage of HT-29 cell viability was 70% in the dark test for 0.5 mg/mL vitamin B complex solution, this rate decreased to 35% after the light test (****p<0.001). The desired photodynamic efficiency is closer to these results. In the cell death pathway assay, the concentration of liposomal vitamin B complex was applied to HCT-116 and HT-29 cells at 1 mg/mL. While 40% apoptosis was observed in the HCT-116 cell line, 60% apoptosis was observed in the HT-29 cell line.

Conclusion: Repositioning of marketed drugs has emerged as a new approach to the discovery of new anti-tumor drugs. The development of new uses for marketed drugs has proven to be an efficient and rapid way to develop new anti-tumor drugs. Our data suggest that the in vitro use of vitamin B complex with photodynamic therapy is promising in some types of colorectal cancer.

Keywords: Photodynamic therapy, colon cancer, drug repositioning, vitamin B complex, laser



1. Giriş

Dünya Sağlık Örgütü, tümör morbidite ve mortalitesinin son yıllarda kademeli olarak artmakta olduğunu bildirmiştir [1]. Bu sebeple, hızla gelişen teknoloji ile anti-tümör ilaçlar için pazar zamanla çok büyük olmaktadır. Geleneksel yöntemleri kullanarak yeni ilaçlar keşfetmek zorlaşmaktadır, bu da yeni ilaç geliştirmenin başarı oranının yıldan yıla düşmesine neden olmaktadır [2]. İlacı yeniden konumlandırma olan pazarlanan ilaçlar için yeni kullanım alanlarının geliştirilmesi, yeni anti-tümör ilaçları geliştirmenin etkili bir yolu olduğu kanıtlanmıştır [3].

Kolon kanseri, dünya çapında ölüme neden olan üçüncü büyük kanser türüdür [4]. Kolorektal kanser (KRK), vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparsa, hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %15'tir [5]. Kanser için mevcut tedaviler radyoterapi, kemoterapi, cerrahi rezeksiyon ve immünoterapidir. Halihazırda mevcut tedaviler, zayıf biyoyararlanım ve ciddi yan etkilere sahip olup, sağlıklı hücreleri öldürmektedir. Bu nedenle, hasta sonuçlarını iyileştirebilecek yeni tedavi stratejilerini belirlemek için KRK başlangıcını ve ilerlemesini yöneten mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşturulması çok önemlidir. Fotodinamik terapi (FDT), minimal invaziv bir tümör tedavi stratejisidir [6, 7]. Hastalara başlangıçta intravenöz olarak, tümör bölgelerinde biriken bir fotosensitizer (FS) (ilaç) uygulanır, ardından tümörü ışınlamak için belirli bir dalga boyunda görünür ışık kullanılır. FS, fotokimyasal

reaksiyon yoluyla singlet oksijen (1O_2) oluşumuyla tümör hücrelerine zarar verir ve onları öldürür. Vitamin B12, folat ve biyotin reseptörleri; akciğer, lösemi, kolon, meme ve böbrek hücre hatlarında daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir [8-10]. Vitamin B kompleksi düşük toksisite, hedef dokuda hızlı ve seçici birikim, kolay sentez ve üretim, 550-670 nm'de güçlü absorpsiyon dalga boyu, cilde neredeyse hiçbir yan etkisi olmayan avantajlarıyla FDT için ileriye dönük bir FS olarak ortaya çıkmaktadır [11,12]. Klinik uygulamada FDT'nin yüksek maliyeti sadece ekipmanın fiyatından değil, aynı zamanda FDT için kullanılan ilaçların yüksek maliyetinden de kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, özellikleri yüksek etkinlik, düşük yan etkiler ve düşük maliyet içermesi gereken yeni ilaçların geliştirilmesi arzu edilmektedir. Bu gereklilikleri takiben, halihazırda varolan bazı organik kimyasallar FDT adayları olarak kullanılmaktadır. Bunlardan biri de 650 nm'de yüksek ışık absorpsiyonuna sahip iyi bilinen bir boya olan metilen mavisidir [13]. Bizde burdan yola çıkarak vitamin B kompleksinin FDT'de etkili ve çeşitli hastalıklara karşı klinik uygulamalar için 1O_2 ve fotodinamik aktivite üretme kabiliyeti gösterebileceğini öngörmekteyiz.

FDT ile ilişkili kanser tedavisinde FS veya ilaçların çözünürlüğü çok önemlidir [14]. Çözünürlükle ilgili temel sorunlar, polimerik nanoparçacıklar [15], lipozomlar [16], miseller [17] ve karbon nanotüpler [18] gibi farklı nanotaşıyıcı sistemler kullanılarak belirgin bir şekilde azaltılmıştır. Bu makalede nanotaşıyıcı sistem olarak lipozomlama teknolojisi kullanılmıştır. Lipozomlanan vitamin B kompleksi herhangi zararlı etkiye uğramadan kolon kanser hücrelerinin membranından kolay bir şekilde geçerek hedefe ulaşmış olacaktır. Bizde bu çalışma ile halihazırda varolan vitamin B kompleksini yeni anti-tümör ilaç olarak yeniden konumlandırmayı hedeflemekteyiz. Vitamin B kompleksi FDT' de FS olarak kullanılarak düşük maliyet ve düşük yan etki sağlanmış olacaktır.

2. Materyal ve Metot

Fotosensitizer ve Işık Kaynağı

Fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi (B1:B6:B12), (Cas no:Sigma V2876 68-19-9), ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup, hüzmeye profili yaklaşık Gaussian profilindedir. Gaussian ışın profilinin kuyrukları, numuneler üzerindeki maruz kalma acıklılığına ihmal edilebilir katkı nedeniyle hesaplamamızda hariç tutulmuştur. Lazer çıkışı uygulama alanına 5 mW'lık ışık gücü aktarmaktadır. Dozlama süresince (5 dakikada) net 7,5 J/cm² miktarında ışık akısı ilgili örnek yüzeyine aktarılmaktadır [19-21].

Vitamin B Kompleksinin Lipozomlanması

Öncelikle iki ayrı karışım hazırlandı [22].

- Birinci karışım: 3 mg fosfolipit (Lipoid S) etanol (EtOH)'de çözüldü.
- İkinci karışım: %2'lik DMSO/PBS ve Vitamin B kompleksi (stok derişim: 10 mg/mL) hazırlanıp çalkalayıcıda karıştırıldı. Birinci karışımından 10 µL ikinci karışımından da 90 µL alındı ve 15 dakika vortekslandı. Zeta sizer boyut analiz cihazı ile karakterize edildi (Şekil 7).

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışmamız ATCC'den ticari olarak temin edilen HCT-116 ve HT-29 (kolorektal kanser hücre) hatlarında gerçekleştirilmiştir. Bu hücre hatları fotodinamik etkinliğin fazla olan yüzeye yakın kanser türleri olduğu için tercih edilmiştir. Hücreler -80°C'den alınarak hızla çözünmesi sağlandı. Hücrelerin kültür ortamları DMEM (4.5 g/L glukoz, Thermo Fisher Scientific), %10 fetal dana serumu (2x, SIGMA), 100 U/mL penisilin (SIGMA) içinde yapıldı. Çözünen hücreler içerisinde 10 ml DMEM besiyeri bulunan 50 ml'lik tüplere alınarak 1500 rpm (2 819 xg) de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet resüspanse edilerek, besiyeri içeren flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de inkübasyona bırakıldı, hücre çoğalması her gün takip edildi. Hücrelerin besiyeri değişimleri, pH değişimine bağlı olarak üç dört günde bir gerçekleştirildi. Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi. Pasaj sırasında besiyeri flasklardan uzaklaştırıldı, PBS (1x, SIGMA) ile üç kez yıkanan hücreler, flaskın boyutuna göre eklenen tripsin-EDTA (%0.25, SIGMA) ile 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besiyeri ile birlikte 50 ml'lik tüplere toplanan hücreler 1500 rpm (2 819 xg) de 5 dakika santrifüj edildi. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, pasajlamada anlatılan şekilde toplanan hücreler, pelletin miktarına göre besiyeri ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µL alındı, 10 µL tripan mavisi ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.

Toma lamı ve lamel arasına boyanan hücrelerden 10 µL konularak ters-faz ışık mikroskopunda 10x büyütmede hücreler sayıldı. Tripan mavisi (MERCK) ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

Hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılıp, sayıldıktan sonra 10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl besiyeri/kuyu içeren 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat 37°C (% 5 CO₂)'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün lipozomlu vitamin B kompleks hazırlanan ana stoklardan 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı [20,21]. Bu maddelerin hücre canlılığına olan etkileri incelenmek üzere, ilaç+ışık uygulamasından 24 saatin sonunda MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür, (5 mg/mL, SIGMA)'den 10 µl eklendi. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücre canlılığı spektrofotometre kullanılarak 540 nm'de ölçüldü aşağıdaki formüle göre hesaplandı [23].

Canlılık= (Örnek540nm-Blank540nm)/(Control540nm-Blank540nm)

Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini

Apoptoz yolağının aktivasyonu sırasında hücre zarında açığa çıkan fosfatidilserinlerin boyanmasını sağlayan Annexin V, FITC konjüğe olduğundan FL1 panelinde görüntülenirken hücre çekirdeğini boyayan 7AAD (7-Aminoactinomisin D), apoptozun geç evresindeki ve nekrotik hücreleri boyayarak FL2 panelinde görüntülenir. Sonuç olarak boyanmayan hücreler canlı, sadece Annexin V ile boyanan hücreler erken apoptotik, her iki boya ile boyanan hücreler geç apoptotik, son olarak sadece 7AAD ile boyanan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilir. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi hücre hatlarında (HCT-116 ve HT-29) hangi ölüm yollarını tetiklediği Annexin V/7AAD ile boyanmaları ile belirlendi. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara, 80^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi (1mg/mL) uygulanmasından ve ışık (ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup, hüzmeye profili yaklaşık Gaussian profilindedir) ile muamele edildikten sonra 24. saatteki apoptoz ve nekroz oranları akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Hücreler kuyucuklardan tripsin-EDTA (2x) ile kaldırılıp ependorflara toplandıktan sonra, iki kez soğuk PBS (Fosfat Tamponu,1x) ile yıkandı. Daha sonra 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilip supernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelletin konsantrasyonu 10^6 hücre/mL olacak şekilde annexinV bağlama tamponu eklendi, içerisinde 100 µL (10^5 hücre) alınıp üzerine 5µl Annexin V, 5µl 7AAD eklendi, tüpler 15 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 400 µl bağlama tamponu eklenen tüpler buza alındı ve akış sitometrisinde analiz gerçekleştirildi.

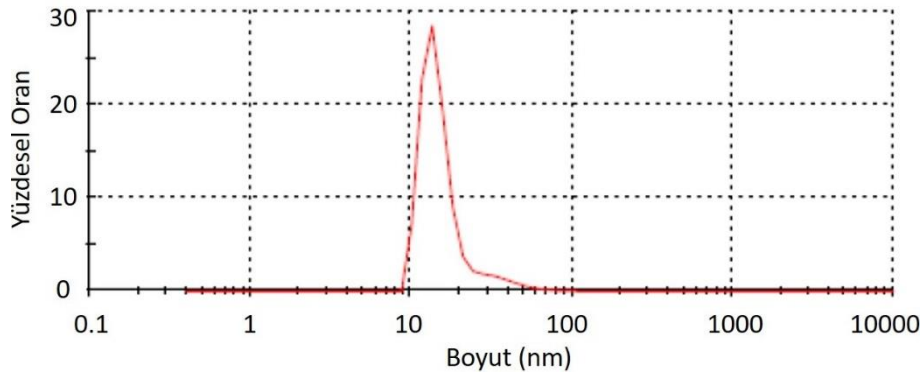
İstatiksel Analiz

İkiden fazla parametrik değişkenin karşılaştırılması İki Yönlü Varyans Analizi (Two-way ANOVA) ile, Sidak Çoklu Karşılaştırma Testi ise post hoc testi ile yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler % 5 anlamlılık düzeyinde yapıldı ve P <0.05, P <0.01 ve P <0.001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analiz, Graphpad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3. Bulgular

Vitamin B Kompleksinin Lipozomlanması

Lipozomlanmış vitamin B kompleksinin Zetasizer ile boyutları incelendi. Lipozom boyutlarının 100 nm ile 200 nm aralığında değiştiği belirlendi. Lipozomlanmış vitamin B kompleksi bir filtre yardımıyla süzülerek 100 nm altında olanlar kanserli hücrelere verilmiştir. Böylece vitamin B kompleksi hücre zarından geçebilecek biyoyoumlu hal almıştır (Şekil 1).



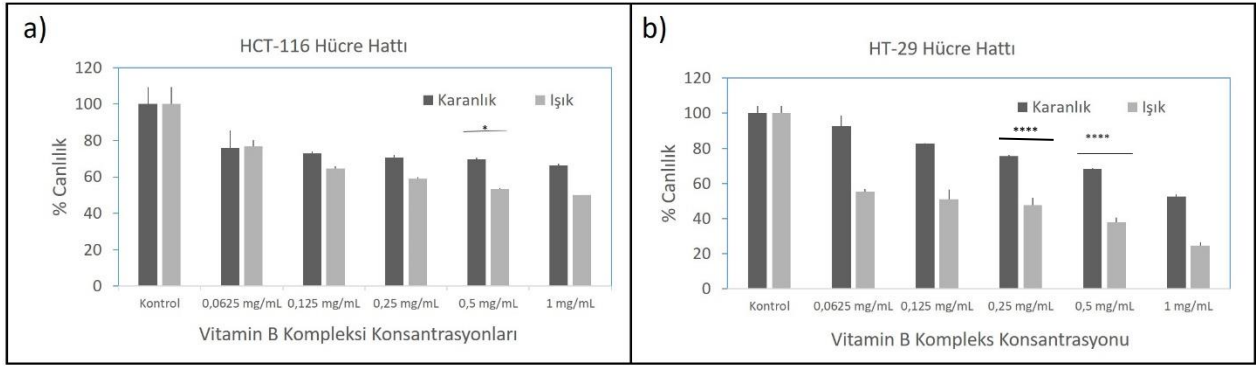
Şekil 1. Vitamin B kompleksinin lipozom partikül boyutta karşılık yüzdesel oranı

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Lipozomlanmış vitamin B kompleksi kanser hücre hatlarında (HCT-116 ve HT-29) hücre canlılığına olan etkileri farklı derişimlerinde MTT testi ile % canlılık kontrolü yapılmıştır. Hücre kültürü ortamında 96 kuyulu plaklar kullanılarak gerçekleştirilen canlılık testinde belirlenen konsantrasyon aralığında, her iki hücre hattında da 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL artan konsantrasyonlarına bağlı olarak karanlık ve ışık deneylerinde canlılığını yitirdiği gözlenmiştir (Şekil 2). Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlık toksisiteye bakılırken minimal toksik etki göstermesi ışık toksisite de maksimum toksik etki göstermesidir.

HCT-116 hücre hattında karanlık toksisiteden sonra ışık ile muamele edilerek aktif hale getirilmek istenen fotosensitizer (Lipozomlanmış vitamin B kompleksi) lipozomlanarak 96 kuyulu plaklara 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot ile 7,5 J/cm² ışık dozlarına maruz bırakıldı. Daha sonra MTT testi ile % canlılık oranlarına bakıldı. 7,5 J/cm² ışık uygulandığında fotosensitizer 0,0625 mg/mL konsantrasyonunda karanlık ve ışık deney sonuçları arasında anlamlı bir fark görülmezken, 0,5 mg/mL konsantrasyonunda da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 50'lere düşmüştür (*p<0.05) (Şekil 2). Fotosensitizer 1 mg/mL konsantrasyonunda da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi % 65 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 50'lere düşmüştür (*p<0.05). Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlıkta minimum toksik etki gösterirken ışık deneyinde maksimum bir ölüm gözlenmesidir. Fakat kabul etmeliyiz ki; fotodinamik terapinin etkinliği HCT-116 hücre hattında beklenen etkiyi gösterememiştir.

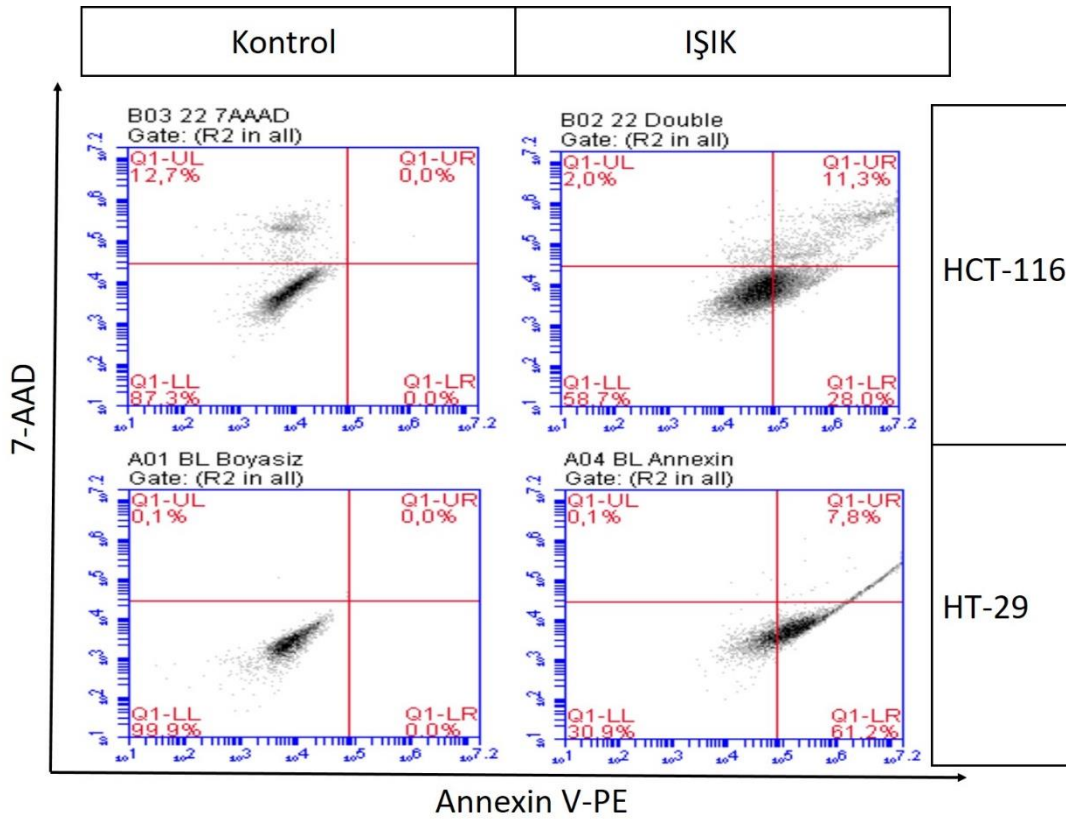
HT-29 hücre hattında karanlık toksisiteden sonra ışık ile muamele edilerek aktif hale getirilmek istenen fotosensitizer (Lipozomlanmış vitamin B kompleksi) lipozomlanarak 96 kuyulu plaklara 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra 650 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot ile 7,5 J/cm² ışık dozlarına maruz bırakıldı. Daha sonra MTT testi ile % canlılık oranlarına bakıldı. 7,5 J/cm² ışık dozunda, fotosensitizer 0,25 mg/mL konsantrasyonda karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %75 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 47'lere düşmüştür (****p<0.001) (Şekil 2). Aslında bu konsantrasyonda da karanlık ve ışık deney arasında beklenen fark yine yakalanamamıştır. Fakat 0,5 mg/mL'da konsantrasyonda karanlık deneyinde hücrenin canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 35'lere düşmüştür (****p<0.001) (Şekil 2). Fotosensitizer 1 mg/mL'da konsantrasyonda ise karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %50 iken ışık deneyi sonrası bu oran % 25'lere düşmüştür (****p<0.001). Arzu edilen fotodinamik etkinlik bu sonuçlara daha yakındır. Her iki konsantrasyonda da canlılık yüzdesi yarı yarıya düştüğü hem şekil hem yüzdelere üzerinden de görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Vitamin B kompleksinin a) HCT-116 Hücre Hattı'nın ve b) HT-29 Hücre Hattı'nın karanlık-ışık toksisite sonuçları verilmiştir. HCT-116 hücresinde Vitamin B kompleksinin; karanlık 0,5 mg/mL vs ışık 0,5 mg/mL * $p < 0,05$ ve ışık 0,5 mg/mL vs ışık 0,0625 mg/mL *** $p < 0,001$. HT-29 hücresinde Vitamin B kompleksinin, ışık 0,0625 mg/mL vs karanlık 0,0625 mg/mL **** $p < 0,001$; ışık 0,25 mg/mL vs karanlık 0,25 mg/mL **** $p < 0,001$; ışık 0,5 mg/mL vs karanlık 0,5 mg/mL **** $p < 0,001$.

Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini

Lipozomlanmış vitamin B kompleksi (1mg/mL) uygulanmasından ve ışık ile muamele edildikten sonra 24. saatteki apoptoz ve nekroz oranları akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. FDT uygulamasından sonra hücrelerin doza bağlı ölümleri apoptotik açıdan değerlendirildi. Apoptoz deneyinde lipozomlanmış vitamin B kompleksinin konsantrasyonu 1mg/mL olarak hücrelere uygulanmıştır. Lipozomlanmış vitamin B kompleksinin 1mg/mL konsantrasyonları hücre hatlarına (HCT-116 ve HT-29) uygulanmıştır. Her iki hücre hattını etkinlik açısından karşılaştırmak için bu konsantrasyon seçilmiştir. HCT-116 hücre hattında %40 oranında apoptoz görülürken HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptoz görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında Vitamin B kompleksinin (1 mg/mL) Annexin-V/7AAD analizi

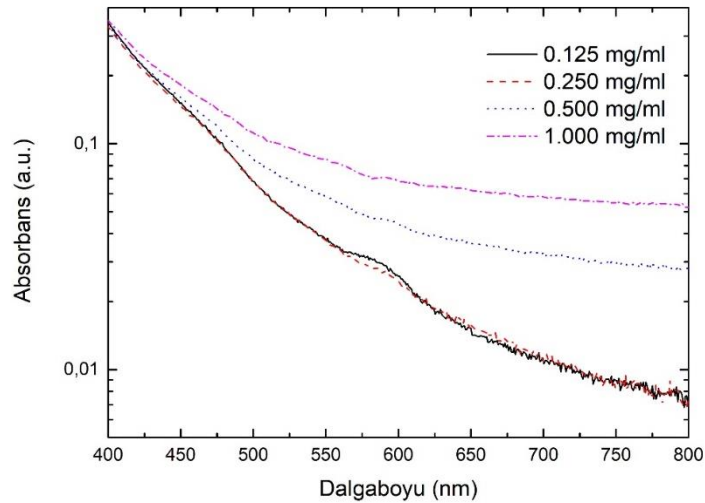
Flow sitometri diyagram, aşağıdaki şekilde tanımlanan dört bölgeye ayrılır: Q1, Q2, Q3 ve Q4 yüzdeleri şu şekilde: nekrotik hücrelerin yüzdesi (Q1: 7AAD/ AnnexinV +/-); geç apoptotik hücrelerin yüzdesi (Q2; 7AAD/ AnnexinV +/-); yaşayabilir hücrelerin yüzdesi (Q3; 7AAD/ AnnexinV -/-) ve erken apoptotik hücrelerin yüzdesi (Q4; 7AAD/ Annexin-V -/+).

Lazer Dozlamaları ve Absorbans

Bu çalışmada ışık deneylerinde 650 nm dalgaboylu sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazer ışınması dalga-boyu bant genişliği ≈ 3 nm sahip olması aktarılan ışık enerjisinin hücreye aktarılan miktarının kesinlikli olarak hesaplanmasını kolaylaştırmaktadır.

Deneyler sırasında kullanılan vitamin B kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans grafikleri Şekil 4'da gösterilmiştir. Absorbans değerleri göreceli olarak logaritmik ölçekte verilmiştir. Konsantrasyonların artışıyla birlikte absorbans değerlerindeki artış, derişim değerlerindeki artışla doğru orantılı olarak artmaktadır ki bu beklenen bir sonuçtur.

Şekil 4'de 1 mg/mL ve 0.5 mg/mL derişimli B kompleksi için 650 nm dalgaboyunda absorbansı sırasıyla 6 ve 3 katları kadar artış göstermektedir. Bu da ilgili hücrelerin ışık dozlamasında FDT için gerekli enerji miktarının aynı oranlarda artmasına neden olmakta birlikte FDT'nin 650 nm dalgaboyunda etkinliğini artırmaktadır. Kanser hücreleri 650 nm dalgaboyunda $7,5 \text{ J/cm}^2$ enerji ile dozlanan 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL vitamin B kompleksi aracılığıyla bu enerjinin sırasıyla %15 ve %10 kadarını bünyelerinde hapsedebilmektedirler. FDT etkinliği bu emilim sayesinde gözlenmektedir.



Şekil 4. Vitamin B kompleksi derişimine göre absorbans grafiği

4. Tartışma ve Sonuç

Modern dünyada kanserin giderek artması, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini önemli kılmaktadır. Günümüzde modernleşen alışkanlıklar nedeniyle kanser hastaları ve ölüm vakaları hızla artmaktadır [24]. Araştırmacılar kanser hücrelerini kemoterapi, radyoterapi, çoklu ilaç kombinasyonları, hedefleme, immünoterapi, fotodinamik terapi, nanoparçacık hedefleme [25] vb. dahil olmak üzere farklı şekillerde tedavi etmeye odaklanmaktadır. Fotodinamik terapi, normal hücreleri etkilemeden sadece kanserli hücrelere odaklanan, kanser için geleneksel ve gelişmekte olan bir tedavidir. FDT ve nanoteknoloji temelli tedavilerin ve teşhisin bir kombinasyonu kanser için yeni ve etkilidir [26].

Fotodinamik terapi, ışığın sınırlı doku penetrasyonundan dolayı fotodinamik tedavinin etkili olabilmesi için prostat, servikal, özofagus, gastrik ve kolon kanser gibi yüzeysel kanser türlerinden temin edilen hücre hatları üzerinde çalışılmıştır [27]. Diğer kanser türlerinin ışığın sınırlı doku penetrasyonundan ve cerrahi müdahale gerektireceğinden dolayı tercih edilmemiştir. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda yüzeysel kanser hücre hatlarından HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücreleri tercih edilmiştir.

Fotodinamik terapinin temel prensiplerinden olan karanlıkta minimum toksik etki gösterirken ışık deneyinde maksimum bir ölüm gözlenmesidir. İki hücre hattında doğru bir karşılaştırma analizi yapabilmemiz için 0,5 mg/mL konsantrasyon değerlerinde ideal sonuçlar vermiştir. İki hücre hattında fotodinamik etkinliği karşılaştıracak olursak HT-29 hücre hattı, HCT-116 hücre hattına göre fotodinamik inaktivasyon etkinliği daha fazladır.

Bu yüzyılın ilk yıllarından itibaren FDT de klinik olarak kabul gören ftalosiyanimler bazı istenmeyen yan etkilerine rağmen bu bileşiklerle ilgili çalışmalar oldukça günceldir [28,29]. Yüksek toksisite gibi bir sınırlamayı en aza indirmeye yönelik olası bir yaklaşım, biyoyumlu ve fotoaktif bir bileşiğinin bu tedavi yöntemine eklenmesidir. Vitamin B12, DNA sentezi için kofaktör olarak görev yapan iyi kabul görmüş bir ilaç şekli olmuştur. Yakın bir zamanda B12, iyi bilinen terapötik ajanların yerine kullanılabilir ve ışığa duyarlı bir bileşik olarak yeniden piyasaya sürülmüştür [30]. B12 vitamini ile konjüge ftalosiyanimler bir FDT çalışmasında karanlıkta minimum toksisite gösterirken ışıkta maksimum toksisite göstermiştir. Aynı zamanda ftalosiyanimleri daha az konsantrasyonda kullanarak zararlı yan etkilerinden de kaçınılmıştır. Böylece çalışma daha düşük ftalosiyanim konsantrasyonlarında optimum FDT etkinliği ile sonuçlanmıştır [19]. Genel olarak, iki biyolojik ve fotoaktif bileşik (ftalosiyanim ve B12) içeren kombine FDT uygulamaları için ilgi konusu olacağını düşünmekteyim. Bu tür kombinasyonlar, ışığa duyarlı ftalosiyanim vb. bileşiklerin sınırlı seçiciliği ve karanlık toksisitesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabilir. Bizim kendi çalışmamızda ise zararlı yan etkilere sahip olacak bir bileşik (ftalosiyanim vb.) kullanılmadan sadece Vitamin B kompleksi ile arzu edilen fotodinamik etkinlik gözlenmiştir.

Fotodinamik tedavinin temel prensibinde fotosensitizerler (vitamin B kompleksi) karanlıkta minimal toksisite gösterip ışık ile muamele edildiğinde singlet oksijen oluşturup kanserli hücreleri maksimum seviyede öldürmesidir. Bizim çalışmamızda MTT canlılık verilerini değerlendirecek olursak HCT-116 hücre hattında vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL'de karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %50'lere düşmüştür (* $p < 0.05$). Vitamin B kompleksinin bu konsantrasyondaki verilerine bakacak olursak fotodinamik terapide arzu edilen bir performans bu hücre hattında görülmemiştir. HT-29 hücre hattında vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL'da karanlık deneyinde canlılık yüzdesi %70 iken ışık deneyi sonrası bu oran %35'lere düşmüştür (**** $p < 0.001$). Bu hücre hattında fotodinamik terapinin temel prensiplerine uygun bir performans görülmektedir. Bu sonuçlar kolon kanserlerinde vitamin B kompleksi kullanılarak fotodinamik terapi yapılabileceğini vaat etmektedir. Bu tedavi yönteminin klinikte de kullanılması için etki mekanizmalarının incelenmesi gereklidir. Akış sitometrisinde ölüm yollarının belirlenmesi için yapılan analizde HT-29 hücre hattında %60 oranında apoptozu seçtiği görülmektedir. HCT-116 hücre hattında ise %40 oranında apoptoz görülmüştür.

Lipozomlar hidrofilik ve hidrofobik bileşiklerin kapsüle edilmesini sağlayan ve ilaç, gıda, kozmetik ve kimya endüstrisinde kullanılan, polar nanoparçacıklardır [31]. Lipit tabakasının temel omurgası fosfolipitlerdir [32]. Lipozomların çapı 20 nm'den 20 000 nm'ye kadar değişebilir [33]. Bizim kendi çalışmamızda hazırladığımız lipozomlarımızın boyutu 100 nm olarak hücre zarından kolaylıkla geçebilecek boyuttadır. Fonksiyonel bileşenlerin lipozomlar içine hapsedilmesinin, ortamla etkileşimini ortadan kaldırdığı, kapsüllenen maddenin stabilitesini artırdığı böylece bozulmasına neden olacak ortamlarda uzun süre aktivitesini koruyabildiği gösterilmiştir [32]. Bu çalışmanın devamı niteliğinde ileri ki çalışmalarda hedeflediğimiz in-vivo deneylerde Vitamin B kompleksi herhangi bir zarara uğramadan kanserli dokuya kolaylıkla ve stabil olarak da ulaşmış olacaktır.

Yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar, B12 vitamini ile doğal olarak oluşan diatomların yüzeyini değiştirerek kanser hücre hatları (HT-29 ve MCF-7)' na karşı artan yapışma özelliklerine sahip yeni bir biyomateryal sentezlenmişlerdir. Sentezlenen biyomateryal sulu ortamda özellikle 5 güne kadar tutulmuş ancak hücre zarında olduğu gibi lipofilik ortamlarda kolayca salındığı gösterilmiştir. Genel olarak, sonuçları, bu tip B12 modifiye diatomların, ilacı vücuda vermeden önce ilgili bölgelerle güçlü bir şekilde etkileşime giren bir mikro mekik görevi görerek, suda çözünmeyen inorganik bileşiklerin tümör dokularına hedefli bir şekilde verilmesini sağlamak için umut verici bir araç olabileceğini göstermektedir [34].

Bizim çalışmamızda ışık deneylerinde sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazer ışınması dar dalga-boyu bant genişliğine sahip olması aktarılan ışık enerji miktarının kesinlikli olarak hesaplanmasını kolaylaştırmaktadır. Tek yönlü ışınma, kontrollü ışınma dozlarının ayarlanabilmesi ve hedeflenen organizmalara direk hedef odaklı çalışması nedeniyle FDT uygulamaları için çok iyi bir seçenektir [35,36]. Bu çalışmada, lazer ışığının eş zamanlı olarak vitamin B kompleksinin kolon kanser hücre hatlarında FDT etkisine bakılmıştır. İntravenöz yoldan kullanım için, ilacın vücutta birikeceği yeri tam

olarak bilmek ve ardından o bölgeyi lazer ışımaya maruz bırakmak önemlidir. Işığa maruz kalma süresi, vitamin B kompleksi konsantrasyonu ve lazer ışık dozu arasındaki dengenin araştırılması FDT verimliliğinin kontrol edebileceğini göstermektedir [37]. Vitamin B kompleks birikiminin zayıf olduğu perfüze olmayan dokular için, benzer bir terapötik etkiye izin vermek için ışınlama süresi uzatılmalıdır. Kansere hücrelerinde kullanılan ışığın dalga boyunun uzun olması, sağlıklı dokulardaki etkinliği göreceli olarak daha az olması kısa dalga boyulu ışımaya göre bir avantajdır. Deneylerde ışık dalgaboyunun 650 nm olarak seçilmesi hücrelerde görece ışık maruziyetini en aza indirerek, kısıtlı ışık emilimiyle FDT uygulamasını gerçekleştirilebilmesi ve hücre ölüm oranlarında artış sağlanması gösterilmiştir. Bu yüzden maruz kalma süresi, hücre ölüm hızı üzerindeki etkilerle gözlemlenebileceği gibi, FDT aktivitesi için esastır.

Lipozomlu vitamin B kompleksinin karanlık ortamda kanser hücre hatlarında zararsız olmasına karşılık 7,5 J/cm² ışık dozunda toksik olmaları tedavide kullanılabileceklerini düşündürmektedir. Seçilen FDT ışık kaynağının dalgaboyu uzadıkça sağlıklı hücreleri etkilemesi o kadar az olacak ve gereksiz ışınlamalardan sağlıklı hücreleri koruyacaktır [38]. Aynı zamanda uzun dalgaboyunda olan ışığın dokularda absorpsiyonu düşük olduğundan dokulara nüfuz etme kabiliyeti giderek artacaktır. Burada vitamin B kompleksinin her ne kadar absorpsiyon değerleri uzun dalgaboylarında düşse de FDT etkinliği oluşturduğunu görmekteyiz. Bu çalışmada ortaya çıkan fotodinamik terapi yöntemiyle vitamin B kompleksinin anti-kanser potansiyeli ile birlikte bu tür etkileri potansiyel bir ilaç olarak yeniden konumlandırmaktadır. Verilerimiz kolon kanseri tedavisinde vitamin B kompleks kullanımını savunmaktadır. Kolon kanserleri tedavisinde vitamin B kompleksinin klinik etkinliğini araştırmak ve ilgili moleküler mekanizmaları doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışmada bana destek olan Melike Kefeli ve Zeliha Şekerli' ye teşekkür ederim.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. 2017. Cancer statistics 2017. CA Cancer J. Clin. 67 (1), 7–30.
- [2] Yoonjeong, C., Erez, T., Reynolds, I. J., Kumar, D., Jermaine, R., Gregory, K., et al. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. Br. J. Pharmacol. 175 (2), 168–180.
- [3] Reddy, A.S., and Zhang, S. 2013. Polypharmacology: drug discovery for the future. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 6 (1), 41–47.
- [4] Lopez-Lazaro, M. What is the main cause of cancer? J. Cancer Stud. Ther. 2016, 1, 1–2.
- [5] Rebecca, L.S.; Kimberly, D.M.; Ahmedin, J. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 2019, 69, 7–34.
- [6] Deng, X., Shao, Z., Zhao, Y. Solutions to the drawbacks of photothermal and photodynamic cancer therapy. Adv Sci. 2021;8(3):2002504.
- [7] Suzuki, T., Tanaka, M., Sasaki, M., Ichikawa, H., Nishie, H., Kataoka, H. Vascularshutdown by photodynamic therapy using talaporfn sodium. Cancers.2020.
- [8] Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J., Nowotnik, D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. J. Inorg. Biochem. 2004, 98, 1625–1633.
- [9] Vadlapudi, A.D., Krishna, R., Pal, D., Mitra, A.K. Molecular expression and functional activity of sodium dependent multivitamin transporter in human prostate cancer cells. Int. J. Pharm. 2012, 436, 324–331.
- [10] Patel, M., Vadapatla, R.K., Shah, S., Mitra, A.K. Biotin uptake by T47D breast cancer cells: Functional and molecular evidence of sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT). Int. J. Pharm. 2013, 441, 535–543.

- [11] Juzeniene, A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2009, 6, 26630–26637.
- [12] Kamkaew, A., Cheng, L., Goel, S., Valdovinos, V.F., Barnhart, T.E., Liu, Z., Cai, W.B. Cerenkov radiation-induced photodynamic therapy using chlorin e6-loaded hollow mesoporous silica nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 26630–26637.
- [13] Peloi, L.S., Soares, R.R.S., Biondo, C.E.G., Souza, V.R., Hioka, N., Kimura, E. 2008. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue, *Journal of Biosciences.*, 33(2), 231–237.
- [14] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Knap-czop, K., Kotlinska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharm.* 2018, 106, 1098–1107.
- [15] Pramualala, S., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., Bergkvist, M., Jouan-Hureau, V., Arnoux, P., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., Niamsiria, N. Polymer-lipid-PEG hybrid nanoparticles as photosensitizer carrier for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017, 173, 12–22.
- [16] Ghosh, S., Carter, K.A., Lovell, J.F. Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomaterials* 2019, 218, 119341.
- [17] Muddineti, O.S., Rompicharla, S.V.K., Kumari, P., Bhatt, H., Ghosh, B., Biswas, S. Lipid and poly (ethylene glycol)-conjugated bi-functionalized chlorine e6 micelles for NIR-light induced photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2020, 29, 101633.
- [18] Marangon, I., Ménard-Moyon, C., Silva, A.K.A., Bianco, A., Luciani, N., Gazeau, F. Synergic mechanisms of photothermal and photodynamic therapies mediated by photosensitizer/carbon nanotube complexes. *Carbon* 2016, 97, 110–123.
- [19] Mantareva, V., Iliev, I., Sulikovska, I., Durmuş, M., Angelov, I. Cobalamin (Vitamin B12) in Anticancer Photodynamic Therapy with Zn(II) Phthalocyanines. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(5):4400.
- [20] Yurtaş, G.A., Çınar K. P. Aeruginosa Bakterisinin Vitamin B Kompleksi ve Kırmızı Lazer Kullanılarak İnaktif Edilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2022; 13(3): 353-363.
- [21] Su, L., Huang, J., Li, H. Chitosan-riboflavin composite film based on photodynamic inactivation technology for antibacterial food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;172:231-240.
- [22] Yurtaş, G.A., Gökdoğan, K., Hekim, S.N. 2022. Liposomes Loaded with Activatable Disulfide Bridged Photosensitizer: Towards Targeted and Effective Photodynamic Therapy on Breast Cancer Cells. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, Volume 12, Issue 1, 304 -325.
- [23] Birgül, K., Uba, A.İ., Çuhadar, O., Koçyiğit, S.S., Tiryaki, S., Tiber, P.M., Orun, O., Telci, D., Yılmaz, Ö., Kemal Yelekçi, K., Küçükgül, G.K. "Synthesis and molecular modeling of MetAP2 of thiosemicarbazides, 1,2,4-triazoles, thioethers derived from (S)-Naproxen as possible breast cancer agents". *J. Mol. Struct.* 1259 (2022) 132739.
- [24] Pham, T., Bui, L., Kim, G., Hoang, D., Tran, T., Hoang, M. Cancers in Vietnam Burden and Control Efforts: A Narrative Scoping Review. *Cancer Contr.* 2019, 26, 1–14.
- [25] Naidoo, C., Kruger, C.A., Abrahamse, H. Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2018, 17, 1–15.
- [26] Chen, D., Song, M., Huang, J., Chen, N., Xue, J., Huang, M. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2020, 13, 2030009.
- [27] O'driscoll, L.; Clynes, M. Biomarkers and multiple drug resistance in breast cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 365–384.
- [28] Jackowska, A., Gryko, D. Vitamin B12 Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates. *Org. Lett.* 2021, 23, 4940–4944.
- [29] Abrahamse, H., Tynga, I. Nano-mediated photodynamic therapy for cancer: Enhancement of cancer specificity and therapeutic effects. *Nanomaterials* 2018, 9, 23, 1–14.

- [30] Choi, Y., Weissleder, R., Tung, C.H. Selective Antitumor Effect of Novel Protease-Mediated Photodynamic Agent. *Cancer Res.* 2006; 66(14), 7225-7229.
- [31] Gibis, M., Vogt, E., Weiss J. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymercoated liposomes. *Food & Funct.* 2012; 3(3),246-254.
- [32] Oskouei, Z.M, Biçim, G., Yalçın, A.S. C vitamini, E vitamini ve polifenol ekstresi içeren lipozomların eldesi ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması. *Marmara Med J.* 2014; 27, 166-170.
- [33] Kırıl, E., Öztıp, M.H. Liposomes as an Encapsulation Agent for Food Applications: Structure, Characterization, Manufacture and Stability. *Akademik Gıda.* 2014; 12(4) ,41-57.
- [34] Slow-targeted release of a ruthenium anticancer agent from vitamin B 12 functionalized marine diatom microalgae. 2020. Accessed February 25, 2023.
- [35] Chun, J.Y., Choi, M.J., Min, S.G., Weiss, J. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocoll.* 2013; 30(1), 249-257.
- [36] José, H. Correia, J.H., Rodrigues, J.A., Pimenta, S., Dong, T., Yang, Z., Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* 2021, 13(9), 1332
- [37] De Jode, M.L., Mcgilligan, J.A., Dilkes, M.G., Cameron, I., Hart, P.B., Grahn, M.F. A Comparison of Novel Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers in Medical Science.* 1997, 12:260-268
- [38] Yurttaş, A.G., Sevim, A.M., Çınar, K., Atmaca, G.Y., Erdoğmus, A., Gül, A. The effects of zinc(II)phthalocyanine photosensitizers on biological activities of epitheloid cervix carcinoma cells and precise determination of absorbed fluence at a specific wavelength. *Dyes Pigm.* 2022; 198, 110012