

Meme kanseri (MCF-7) ve Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizileri üzerine in vitro ortamda hiperisin ile fotodinamik tedavi araştırma sonuçları

Yusuf Uysal (*), Ali Uğur Ural (**), Ferit Avcu (**), Güngör Sobacı (*), Volkan Hürmeriç (*), Üzeyir Erdem (*), A.Hakan Durukan (*), Atilla Bayer (*), M.Zeki Bayraktar (*)

Özet

Çalışmamızda meme kanseri (MCF-7) ve Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizileri üzerine hiperisinin fotodinamik etkinliği araştırılmıştır. Bir ve 50 µM konsantrasyon aralığında hiperisinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarla tek başına ve 532 nm KTP lazer (Orion) ile uygulanan 24 jul/cm² dozunda ışınlama sonrası MCF-7 ve Raji hücre dizisi proliferasyonu üzerine olan etkileri değerlendirildi. Sitotoksikite değerlendirilmesi MTT testi ile yapıldı. Antiproliferatif etkinin mekanizmasının öğrenilmesi açısından 48 saatlik kültür ortamına 1 nM konsantrasyonda staurosporin eklendi. Işınlama yapılan hücre dizileri üzerindeki etki MCF-7'de en belirgin olarak ortaya çıktı. MCF-7 dizisinde 1 µM konsantrasyonlarda 24. ve 48. saatlerde sırasıyla hücrelerin %4'ü (p>0.05) ve %41'i (p<0.001) ölüirken, 50 µM konsantrasyonda bu oranlar %48 (p<0.001) ve %64 (p<0.001) idi. Zamana bağlı olarak değerlendirmede ise tüm hücre gruplarında 24. ve 48. saatlerde 1 ve 50 µM konsantrasyonlarda antiproliferatif etkide anlamlı artış gözlemlendi (p<0.001 ve p<0.001). Kırk sekiz saatlik hiperisin inkübasyonunda tüm dozlarda protein kinaz inhibitörü staurosporin eklendiğinde antiproliferatif etkide belirgin derecede artış gözlemlendi. Hiperisin, MCF-7 ve Raji gibi kötücül hücre dizilerine doza ve zamana bağımlı olarak antiproliferatif etki göstermektedir. Bu etkisi fotodinamik aktivasyonda doza ve zamana bağımlı olarak artmaktadır. Hiperisin bu etkisini protein kinaz C inhibisyonu üzerinden gerçekleştirmektedir. Sonuç olarak hiperisin, bu çalışmada örnek alınan MCF-7 ve Raji hücre dizileri üzerine antiproliferatif etki göstermektedir. Göz içi tümörlerin tedavisinde de hiperisin ile fotodinamik

tedaviden yararlanılabilir ve bu konu ile ilgili ileri çalışmalar planlanmalıdır.

Anahtar kelimeler: Antiproliferatif etki, fotodinamik tedavi, hiperisin, MCF-7, Raji

Summary

Results of in vitro photodynamic therapy with hypericin on breast cell (MCF-7) and Burkitt lymphoma (Raji) cell lines

In our study we investigated the photodynamic effect of hypericin on breast cell (MCF-7) and Burkitt lymphoma (Raji) cell lines. The effect of hypericin administration on the proliferation of MCF-7 and Raji cell lines was investigated. Hypericin was administered between the concentrations of 1 and 50 µM for incubations of 24 and 48 hours as either a single regimen or after 24 joule/cm² 532 KTP laser (Orion) administration. Cytotoxicity was evaluated with MTT test. To investigate the mechanism of antiproliferative effect, 1 nM staurosporine was added to the incubation media at 48th hour. The most significant effect was obtained on MCF-7 cell lines among the cell lines radiated. At 1 µM concentration of hypericin, 4% (p>0.05) and 41% (p<0.001) of cells died after 24 and 48 hours of incubation, respectively, whereas these rates were 48% (p<0.001) and 64% (p<0.001) at 50 µM concentration of hypericin, respectively. A significant increase in antiproliferative effect was observed in all cell lines after incubation of 24 and 48 hours at 1 and 50 µM concentrations (p<0.001 and p<0.001, respectively) in time-dependent evaluation. A significant increase in antiproliferative effect was observed in all concentrations when a protein kinase C inhibitor, staurosporine, was added after 48 hours of incubation with hypericin. Hypericin has a dose- and time-dependent antiproliferative effect on malignant cell lines such as MCF-7 and Raji. The cytotoxic effect of hypericin increases with photodynamic activation depending on dose and incubation time. This effect is achieved with protein kinase C inhibition. As a result hypericin had antiproliferative effect on MCF-7 and Raji cell lines sampled in this study. Photodynamic therapy with hypericin may also be used for the treatment of intraocular tumors and further studies should be conducted.

Key words: Antiproliferative effect, photodynamic therapy, hypericin, MCF-7, Raji

* GATA Göz Hastalıkları AD

**GATA Hematoloji BD

Bu çalışma, 37. Ulusal Oftalmoloji Kongresinde (4-8 Ekim 2003, İstanbul) bildirisi olarak sunulmuştur

Bu çalışma, GATA Araştırma Merkezi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir

Ayrı basım isteği: Dr. Yusuf Uysal, GATA Göz Hastalıkları AD, Etilik-06018, Ankara

E-mail: yuysal002@yahoo.com

Makalenin geliş tarihi: 06.12.2006

Kabul tarihi: 16.05.2007

Giriş

Hiperisin, doğal bir fotosensitizör ve etkin bir protein kinaz C (PKC) inhibitörü olarak kötcül tümörlerin fotodinamik tedavisinde güncellik kazanmıştır (1). Sistemik uygulama yanı sıra lokal uygulamaya olanak vermesi nedeniyle, göz bu tedavinin uygulanabileceği ideal bir ortam olarak görünmektedir (2).

Günümüzde fotodinamik tedavi (FDT) gözde ve göz dışı hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır. Fotodinamik tedavide dolaşımdaki ya da hedeflenen doku-daki fotosensitif boya uygun dalga boyu ile uyarılır ve ortama salınan serbest radikaller yoluyla vazooklüzyon ve doku hasarı gerçekleşir (3). Bu maksatla, pek çok vital boya laboratuvar ve klinik koşullarda denenmektedir.

Hiperisin doğada bilinen en etkin fotoaktif doğal pigmenttir (4). Ayrıca, etkin bir PKC inhibitörüdür. Halk dilinde "sarı kantaron otu" olarak bilinen *Hypericum perforatum*'dan elde edilen bu doğal ilaç yaşlılardaki depresyonun tedavisinde, özellikle Orta Avrupa'da yıllardır kullanılmaktadır. Sobacı ve ark. subfoveal koroidal neovasküler membranın tedavisi için hiperisin ile güçlendirilmiş Argon lazer fotokoagülasyon uygulayarak hiperisinin gözde fotodinamik maksatla kullanılabileceğini göstermişlerdir (5).

Çalışmamızda, daha sonra göz tümörlerinin tedavisinde de uygulanması düşünülen bu yöntemin kötcül hücrelere örnek olarak seçilen meme kanseri (MCF-7) ve Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizileri üzerine olan antitümöral etkinliği ve bu etkinlikte PKC inhibisyonunun rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma GATA Araştırma Merkezi'nde Şubat 2003 ile Mayıs 2003 tarihleri arasında yapılmıştır. Meme kanseri hücre dizisi MCF-7 ve Burkitt lenfoma hücre dizisi Raji, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY'den temin edildi. MCF-7 ve Raji hücre dizileri %5 karbondioksit içeren ve 37 derecede olan ortamda RPMI 1640 içinde kültüre edildi. RPMI 1640 vasatı ısı ile inaktifleştirilmiş sırasıyla %10 ve %20'lik fetal dana serumu içermektedir. Bunun dışında 2 μ M L-glutamin, 100 μ g/ml streptomisin ve 100 u/ml penisilin katılmıştır. Hiperisin %0.1'lik dimethylsulfoxide (DMSO) içinde çözüldü ve kullanımdan hemen önce kültür ortamında (1-50 μ M) dilüe edildi. Çalışmadaki DMSO konsantrasyonu %0.1'i geçmedi. DMSO'nun olası yan etkilerini kontrol etmek için, vasat bütün deneylerde negatif bir kontrol olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar Sigma Chemical Co., St. Louis, MO'dan satın alındı. Hiperisinin MCF-

7 ve Raji hücre dizileri üzerine toksik etkilerini belirlemek üzere 1, 5, 10, 50 μ M konsantrasyonlarında hiperisin 24 ve 48 saat boyunca hücre dizileri ile 96 kuyucuklu plate içinde inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, başka bir plate üzerinde aynı doz aralığında hiperisin ve ardından lazer uygulaması yapıldı. Her iki plate üzerinde 12'şer kuyucuk sadece kontrol ve sadece lazer (pozitif) kontrol olarak kullanıldı.

Çalışmamızda 532 nanometre, yeşil dalga boyunda ışın salan KTP YAG lazer (Orion™) kullanıldı. Lazer enerji fluensi 24 jul/cm²'ye ayarlandı ve 12 mm çapındaki lazer probu ile her defasında plate'deki bir kuyucuk üzerinde tutularak lazer uygulandı. Bu testler aynı plate üzerinde olmak üzere 5 kez tekrarlandı. Ardından MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide] testi yapıldı.

MTT testi daha önce tanımlandığı gibi uygulandı (6,7). Hedef tümör hücreleri; hücre sel canlılıklarını tripan mavisi ile test edilerek değerlendirildikten sonra 1-x10⁵ hücre/ml ortamında tekrar süspanse edildi. 100 μ L hücre süspanasyonu 96 kuyucuklu plate'in (Costar CO., Cambridge, MA) her bir kuyucuğuna dağıtıldı ve her plate 24 saat inkübe edildi. Daha sonra istenen konsantrasyondaki 100 μ L reagent solüsyonu her kuyucuğa dağıtıldı ve 24, 48, 72 saat tedavi uygulandı. Yalnız 200 μ L hücre vasat içeren kuyucuklar ve reagent'lar negatif kontrol olarak kullanıldı. Belirtilen inkübasyon zamanından sonraki tedaviyi takiben 20 μ L MTT solüsyonu (5 mg/mL) her kuyucuğa eklendi ve mikroplate'ler 37 derecede 4 saat daha inkübe edildi. Kuyucuktaki reaksiyona girmeyen süpernatantlar çıkarıldı ve 100 μ L asidifiye izopropanol (0.04 N HCl izopropanol içinde) kültürlerle eklendi ve formazonun koyu mavi kristalleri eriyinceye kadar karıştırıldı. Her kuyucuğun absorbans değeri (A) 570 nm filtre içeren mikroplate ELISA okuyucu ile belirlendi. Negatif kontroller sıfır absorbans değeri olarak kullanıldı. Sonuçlar belirlenen sitotoksosite yüzdesi (deneysel kuyucuğun 1-A'sı/pozitif kontrol kuyucuğu) x 100 olarak sunuldu. Her deney sunulan veriler doğrultusunda 3 kez tekrarlandı.

Apoptozun belirlenmesi için hücre siklus analizinden faydalanılarak hücreler Giemsa ile boyandı. Apoptotik hücreler literatürde belirtildiği gibi nükleer yapılarında oluşan değişiklikler (nükleus periferinde kresent şeklinde kromatin yoğunlaşması ve/veya sitoplazmik tomurcuklanma) temel alınarak tanımlandı (8). Apoptotik hücre oranı her deneysel gruptan 500 hücre içinden belirlendi ve her deney 3 kez tekrarlandı.

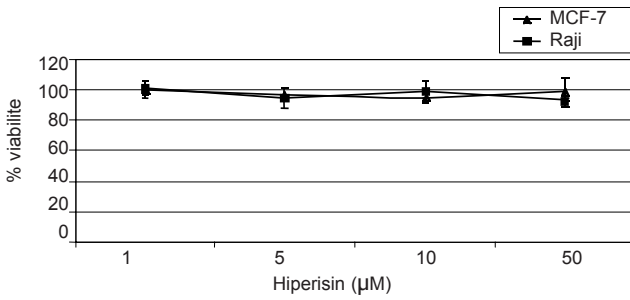
Protein kinaz C yolağı üzerinden apoptotik etkinin oluşup oluşmadığını belirlemek için staurosporin 1 nM

konsantrasyonunda 48 saatlik inkübasyonda hiperisin ve lazer ile birlikte ilave edildi. Aynı plate üzerinde sadece staurosporin ilave edilen 12'şer kuyucuk ise pozitif kontrol olarak değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirmede Student's two-tailed t-testi saptanan farklılıkların istatistiksel önemini belirlemek için kullanıldı ve bulunan değerlerin $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

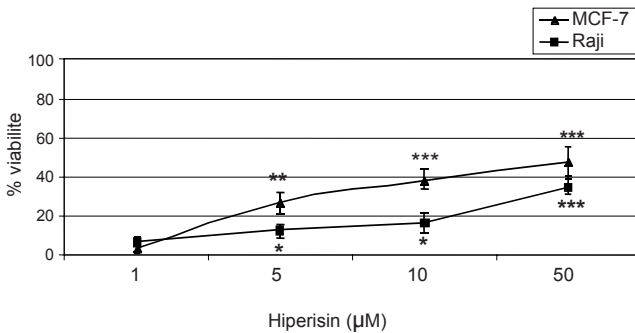
Bulgular

Çalışmada elde edilen sonuçlar kontrol ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi kontrol grubu olarak alınan sadece hücrelerin üretildiği ve hiçbir işleme tabi tutulmayan kuyucuklar kontrol grubu olarak alındı. Bu kuyucuklar ile sadece lazer uygulanan kuyucuklar (pozitif kontrol) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ve bu sonuca göre sadece lazer uygulamasının MCF-7 ve Raji hücreleri üzerine bir etkisi saptanmadı. Lazer ışınlanma yapılmadan 1-50 μM dozlarında sadece hiperisinin hücre dizileri üzerine antiproliferatif etkisi gözlenmedi (Şekil 1). Lazer ve hiperisin birlikte uygulanan MCF-7



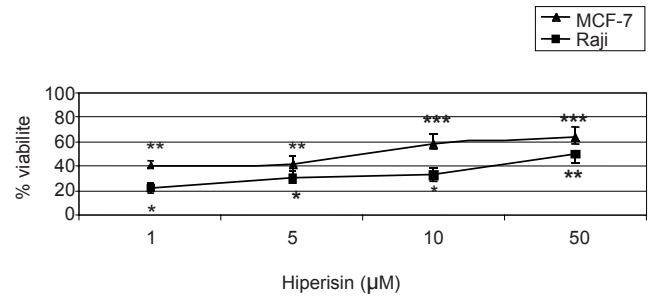
Şekil 1. Tek başına hiperisin uygulamasının 24 saatte hücre dizileri üzerine etkisi

ve Raji hücre dizileri 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin antiproliferatif etki gözlemlendi (Şekil 2,3). İstatistiksel incelemelerde 24. saat-



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

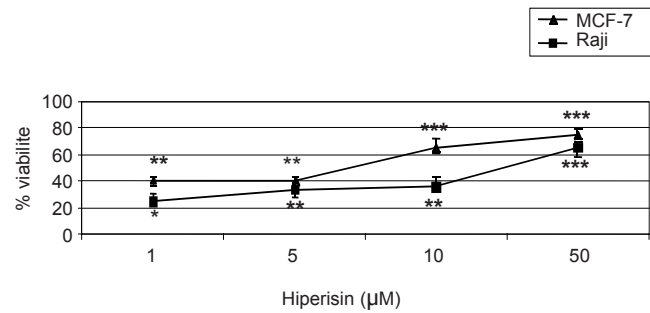
Şekil 2. Hiperisin ve lazer uygulamasının 24 saatte hücre dizileri üzerine etkisi



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Şekil 3. Hiperisin ve lazer uygulamasının 48 saatte hücre dizileri üzerine etkisi

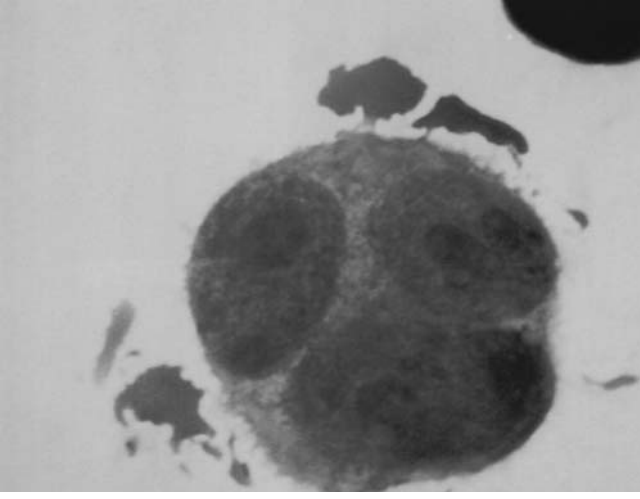
te MCF-7 ve Raji üzerine artan konsantrasyonlarda daha belirgin olmak üzere antiproliferatif etki saptandı ve bu artış 50 μM hiperisin ile en belirgindi (Sırası ile; $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). Kırk sekizinci saatte de MCF-7 ve Raji üzerine artan konsantrasyonlarda antiproliferatif etki saptandı. Bu artış 10 ve 50 μM hiperisin ile en belirgindi (Sırası ile MCF-7: $p < 0.001$ ve $p < 0.001$; Raji: $p < 0.05$ ve $p < 0.01$). Yüksek konsantrasyonda (50 μM) hiperisin ile lazerin 24. ve 48. saatlerde MCF-7 üzerine olan antiproliferatif etkileri Raji hücre dizisine göre daha belirgindi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Zamana bağlı olarak değerlendirmede ise MCF-7 ve Raji üzerine 24. ve 48. saatlerde artan konsantrasyonlarda antiproliferatif etkide anlamlı artış gözlemlendi (Sırası ile; $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). Kırk sekiz saatlik tüm dozlarda hiperisin ve lazer inkübasyonunda PCK inhibitörü staurosporin eklenip pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırıldığında MCF-7 ve Raji üzerine antiproliferatif etkide belirgin derecede artış gözlemlendi (Sırası ile 50 μM 'da; $p < 0.001$ ve $p < 0.001$) (Şekil 4). MCF-7 hücrelerinde daha belirgin olmak üzere apoptotik hücre-



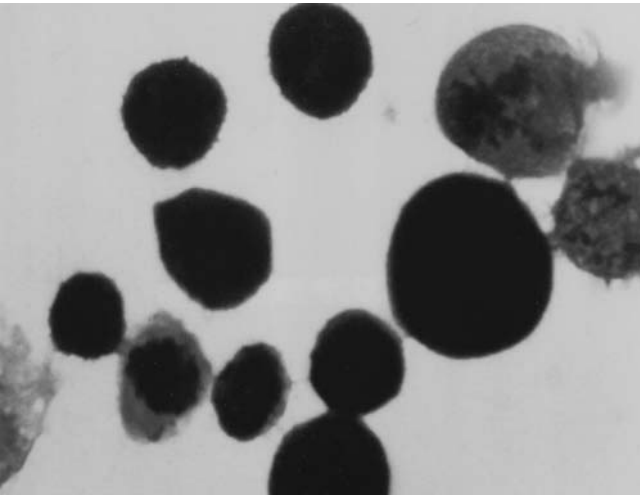
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Şekil 4. Hiperisin-lazer ve staurosporin kombinasyonunun 48 saatte hücre dizileri üzerine etkisi

lerde sitoplazmik tomurcuklanma, nükleer kondansasyon ve fragmantasyon izlendi (Şekil 5,6).



Şekil 5. May-Graunwald-Giemsa ile boyanmış meme kanseri (MCF-7) hücre dizisi: Apoptozun göstergesi olan sitoplazmik tomurcuklanma, nükleer kondansasyon ve fragmantasyon izleniyor



Şekil 6. May-Graunwald-Giemsa ile boyanmış Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizisi: Sağlam hücreler ile sitoplazması tomurcuklanmış apoptotik hücreler izleniyor

Tartışma

Günümüzde tümörlerin tedavisinde FDT yöntemlerinin uygulanmasına yönelik çalışmaların yoğunluk kazandığı izlenmektedir. Verteporfin ile yapılan fotodinamik tedavi kötüçül dokuların tahrip edilmesinde güvenilir bir yol olarak bildirilmiştir (3).

Protein kinaz C aktivitesinin inhibisyonu ile birçok tümör türünde hücrelerin büyümesinin inhibe edildiği bilinmektedir. İn vitro çalışmalarda hiperisinin tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir (9). Protein kinaz C aktivitesinin hiperisin tarafından inhibe edilmesi ile bazı tümör gruplarında hücrelerde apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (10). Bizim çalışmamızda da hiperisin etkisini PKC aktivitesini doza bağımlı inhibe ederek göster-

miştir. Çalışmamızda hücrelerde apoptozun göstergesi olan hücre sitoplazmasında tomurcuklanma, nükleer kondansasyon ve fragmantasyon izlenmiştir. Hiperisinin oluşturduğu fotoaktivasyonun hücre içi asidifikasyonun ve glutatyonun azalmasına ve mitokondriyal tahribata neden olduğu bildirilmiştir (11). Bunlarda da apoptotik morfolojik değişiklikler izlenmiştir.

Fotodinamik ajanların tümörler tarafından alınma ve birikme miktarını tümör damarlarının geçirgenlik farkları belirler (12). Vandenberg ve ark. hiperisinin sitotoksik etkisini araştırdıkları bir çalışmada fototoksitenin hiperisinin hücreler tarafından tutulma miktarı ile orantılı olduğunu göstermişlerdir (13). Bizim çalışmamızda da östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücre dizisi MCF-7'de fototoksitenin daha belirgindi. Bu etkinlik MCF-7'de hiperisin toplanmasının fazla olması sonucu gelişmiş olabilir. Bunun için daha ileri moleküler çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

Du ve ark. cilt altına yerleştirdikleri nazofaringeal karsinomaya hiperisin ile fotodinamik tedavi uyguladıkları zaman tümörün vasküler yapısında tahribat ve tümör hücrelerinin direkt ölümü sonucu tümör dokusunda nekroz ve küçülme meydana geldiğini bildirmişlerdir (14). İyi diferansiye olmuş tümörler az diferansiye olanlara göre hiperisinli fotodinamik tedaviden daha fazla yarar görür. Hiperisinin kötüçül tümör yüzeyinde yeni bir epitel oluşturduğu görülmüştür (9).

Liu ve ark. hiperisin ile KTP 532 yeşil lazer uygulamasının in vivo ve in vitro ortamda pankreatik kanser büyümesini azalttığını göstermişlerdir (15). Biz de çalışmamızda, hücre dizileri ile hiperisinin 1-50 μ M konsantrasyonlarda 24-48 saat süreyle inkübasyonunu takiben KTP lazer uyguladık. Doz ve süre arttıkça meme kanseri ve Burkitt lenfoma hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkinin arttığını gözlemledik. Sadece lazer uygulanan grupta ise bu etki gözlenmedi.

Hiperisin intravenöz uygulamadan yarım saat sonra plazmada pik konsantrasyonuna ulaşır. Bu aynı zamanda tümör vasküler yapılarındaki pik konsantrasyon zamanıdır. Daha sonra hiperisin tümör dokusunda toplanmaya başlar ve dokudaki pik seviyesine ilaç alımından 6 saat sonra ulaşır. Hiperisin ile fotodinamik tedavi, vasküler yapıların mikrovasküler oklüzyonu ile etkinlik gösterdiğinden damar içinde en yüksek düzeyde olduğu dönemde yani ilaç alımından yarım saat sonra uygulanmalıdır (16).

Colasanti ve ark. prostatik adenokarsinoma ve prostatik adenokarsinomanın lenf nodu metastazlı hücre dizilerini 0.001-0.3 μ gr/ml konsantrasyonlarda hiperisin ile 24 saat inkübe ettikten sonra 599 nm dye lazer uyguladıkları fotodinamik tedavi sonucunda hücrelerde

toksik etki gözlediklerini, hiperisin kullanılmadan yapılan lazer uygulamasında ise bu etkinin gözlenmediğini bildirmişlerdir (17).

Chen ve ark.nın bir çalışmasında hiperisin ile fotodinamik tedavi uyguladıkları hücre dizilerinde agaroz jel elektroforez tetkiki ile nükleozomal DNA'da fragmentasyon ve ışık mikroskopi incelemesinde apoptozun hiperisin ile yapılan fotodinamik tedavinin en belirgin etkisi olduğu anlaşılmıştır (18). Ayrıca tümör hücrelerinin immünohistokimyasal analizinde Fas ve Fas ligand artışı saptanması bu hücre ölümü yolunun fotodinamik tedavinin indüklediği apoptoza katkı yapabileceğinin göstergesi olarak yorumlanmış ve hiperisin ile fotodinamik tedavinin tümör eradikasyonunda vasküler mikrooklüzyon yoluyla apoptoza neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır (18).

Hadjuri ve ark. hiperisin ile fotodinamik tedavinin melanoma hücre dizileri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (19). Bu sonuç uvea melanomlarında hiperisin ile fotodinamik tedavinin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca retinal kapiller hemanjiyomun tedavisinde başarı ile kullanılmıştır (2).

Hiperisin ile fotodinamik tedavide özellikle 590 nm dalga boyunda lazer kullanılarak tümörlerde 10 mm derinliğe kadar etki gözlemlendiği bildirilmiştir (20). Bu intraoküler tümörlerin tedavisinde çığır açabilecek bir gelişmedir. Araştırmacılar benzer etkinin 532 nm dalga boyunda da gözlemlendiğini ve fotodinamik tedavi ile tümör nekrozunda sadece fotofiziksel etkilerin değil (ışık penetrasyon sayısına bağlı absorbe edilen atomlar) vasküler yataktaki etkilerin de önemli olduğunu ortaya koymuştur. Hiperisin ile fotodinamik tedavinin uygulandığı tümör hücreleri arasında mesane tümörleri de bulunmaktadır (20,21). Ayrıca bu tümörlerde fotodinamik tedavinin hiperisinin floresans özelliği dolayısı ile izlenebilir olması çok belirgin bir klinik uygulama avantajı sunmaktadır (22,23).

Ritz ve ark. hiperisinin gliyoblastoma hücrelerinde nöronlara göre daha fazla toplandığını ve gliyoblastoma hücrelerinin hiperisin ile uygulanan fotodinamik tedaviyle inaktive edildiğini bildirmişlerdir (24). Çocukluk çağında sık görülen rabdomyosarkom hücrelerine hiperisin ile inkübe edildikten sonra FDT uygulanmış ve apoptoz oranındaki artışla birlikte hücre çoğalmasının neredeyse tamamen durduğu görülmüştür (25). Bu çalışmalarda elde edilen etkiler hiperisin ile lazerin beraber kullanılması ile sağlanmıştır. Çalışmamızda da lazer uygulaması ancak hiperisin ile inkübe edilen hücrelerde antiproliferatif etki göstermiştir.

Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücre dizisi

MCF-7'de hiperisin ile FDT'nin etkinliği ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Hiperisinin intravenöz, oral, intratümöral, topikal kullanımları mevcuttur. Temini kolaydır ve ucuzdur. Argon-yeşil (514 nm) ve 532 nm yeşil dalga boyunda fotoaktivasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu bakımdan pratikte yaygın kullanım alanı bulabilir. Nitekim göz kapağının bazal hücreli karsinomunda hiperisinli FDT uygulandığı bildirilmiştir (9).

Sonuç olarak bu in vitro çalışmamız, gelecekteki in vivo ve klinik çalışmalara ışık tutabilecek özelliktedir.

Kaynaklar

1. Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2189-2204.
2. Uysal Y, Erdurman C, Sobacı G, Durukan AH, Bayer A, Bayraktar MZ. Retinal kapiller hemanjiyomun hiperisin ile güçlendirilmiş argon lazer fotokoagülasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi* 2005; 47: 236-238.
3. Pogue BW, Braun RD, Lanzen JL, Erickson C, Dewhurst MW. Analysis of the heterogeneity of pO₂ dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 700-706.
4. Agostinis P, Vantieghe A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 221-241.
5. Sobacı G, Bayraktar MZ, Durukan AH, Karshoğlu Y, Hürmeriç V, Aykaş S. Hypericin-enhanced argon laser photocoagulation of subfoveal choroidal neovascular membrane in age-related macular degeneration: a pilot study. *Eur J Ophthalmol* 2006; 16: 119-128.
6. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 1990; 131: 165-172.
7. Ural AU, Avcu F, Candir M, Guden M, Ozcan MA. In vitro synergistic cytoreductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R52.
8. Rogers MJ, Chilton KM, Coxon FP, et al. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1482-1491.
9. Alecu M, Ursaciuc C, Halalau F, et al. Photodynamic treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma with hypericin. *Anticancer Res* 1998; 18: 4651-4654.
10. Hamilton HB, Hinton DR, Law RE, et al. Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 1996; 85: 329-334.
11. Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: a possible role of hydrogen peroxide. *Int J Mol Med* 2002; 9: 461-472.
12. Roberts WG, Hasan T. Tumor-secreted vascular perme-

- ability factor/vascular endothelial growth factor influences photosensitizer uptake. *Cancer Res* 1993; 53: 153-157.
13. Vandenberghe AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J Photochem Photobiol B* 1997; 38: 136-142.
 14. Du HY, Bay BH, Olivo M. Biodistribution and photodynamic therapy with hypericin in human NPC murine tumor model. *Int J Oncol* 2003; 22: 1019-1024.
 15. Liu CD, Kwan D, Saxton RE, McFadden DW. Hypericin and photodynamic therapy decrease human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J Surg Res* 2000; 93: 137-143.
 16. Chen B, Xu Y, Roskams T, et al. Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effect in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* 2001; 93: 275-282.
 17. Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, et al. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B* 2000; 54: 103-107.
 18. Chen B, Roskams T, Xu Y, Agostinis P, de Witte PA. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* 2002; 98: 284-290.
 19. Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 375-381.
 20. Blank M, Kostenich G, Lavie G, Kimel S, Keisari Y, Orenstein A. Wavelength-dependent properties of photodynamic therapy using hypericin in vitro and in an animal model. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 335-340.
 21. Kamuhabwa AA, Cosserat-Gerardin I, Didelon J, et al. Biodistribution of hypericin in orthotopic transitional cell carcinoma bladder tumors: implication for whole bladder wall photodynamic therapy. *Int J Cancer* 2002; 97: 253-260.
 22. Zupko I, Kamuhabwa AR, D'Hallewin MA, Baert L, De Witte PA. In vivo photodynamic activity of hypericin in transitional cell carcinoma bladder tumors. *Int J Oncol* 2001; 18: 1099-1105.
 23. D'Hallewin MA, De Witte PA, Waelkens E, Merlevede W, Baert L. Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation of hypericin. *J Urol* 2000; 164: 349-351.
 24. Ritz R, Wein HT, Dietz K, et al. Photodynamic therapy of malignant glioma with hypericin: comprehensive in vitro study in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol* 2007; 30: 659-667.
 25. Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, et al. In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol* 2007; 30: 615-620.