



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA YENİ PİPERAZİN ÇEVRELİ  
SİLİSYUM FTALOSYANİNLERİN  
FOTODİNAMİK TERAPİ (PDT)  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aleyna NALÇAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2019





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA YENİ PİPERAZİN ÇEVRELİ  
SİLİSYUM FTALOSYANİNLERİN  
FOTODİNAMİK TERAPİ (PDT)  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aleyna NALÇAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2019

## ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Aleyna NALÇAOĞLU'nun hazırladığı “Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında Yeni Piperazin Çevreli Silisyum Ftalosyaninlerin Fotodinamik Terapi (PDT) Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.08.2019

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU  
(Danışman)

Prof. Dr. İsmail DEĞİRMENCİOĞLU

Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

---

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ...../...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../20..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.././2019

Aleyna NALÇAOĞLU

## **İthaf**

*Yüksek lisans tezimi; her koşulda yanımda olacaklarını bildiğim, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme ve yeğenlerim Defne ve Muhammed Ali'ye ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın oluşturulması süresince tecrübelerinden yaralandığım, bilgi ve becerilerimi geliştirmemde destek olan danışman hocam Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ersan KALAY olmak üzere, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim.

Tez yazımım ve laboratuvar çalışmalarında sürekli destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımdan olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Ceren SARI'ya ve Arş. Gör. İdris ER'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarının yanında manevi desteklerini esirgemeyen Ceren SÜMER'e ve Gülden BUDAK'a teşekkürü bir borç bilirim. Biyolog Tülay KÖSEAHMET'e şevkati ve desteği için teşekkür ederim. Diğer bölüm arkadaşlarıma güzel zamanlar ve destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullandığımız fotosensitizerlerin sentez aşamasını gerçekleştiren, engin bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren ve sabırla ilgilenen KTÜ Kimya bölümü Anorganik Kimya öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail DEĞİRMENCİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullanılan hücre hattını temin etmemizi sağlayan Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Zühal Hamurcu'ya teşekkür ederim.

Çalışmayı 218S754 kodlu proje ile destekleyen TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG)'na teşekkür ederim.

Son olarak sevgileri ve bana olan inançlarıyla her zaman beni onure eden, desteklerini hiç esirgemeyen canım annem ve babam Asiye-Şükrü NALÇAOĞLU'na, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ablam ve eniştem Gülnaz-Ali HACIOĞLU'na ve her zaman arkamda olduğumu bildiğim abim ve eşi Azem-Esra NALÇAOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Her türlü sıkıntıda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Aynur BEKAR'a, Pınar TOKGÖZ'e, bir abi ve arkadaş olarak desteğini hiç esirgemeyen Kadir ERGÜN'e teşekkür ederim.

Aleyna NALÇAOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>	
<b>ONAY</b>	
<b>BEYAN</b>	
<b>İthaf</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
2.1. Meme Kanseri	2
2.1.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	2
2.1.1.2. Etiyoloji	2
2.2. Fotodinamik Terapi	3
2.2.1. Fotodinamik Terapinin Etki Mekanizması	4
2.3. Fotosensitizerler	5
2.3.1. Piperazin Halkaları	7
2.3.2. Ftalosiyanimler	7
2.4. PDT ile Hücre Ölümünün Uyarılması	8
2.4.1. Apoptoz	9
2.5. Canlılık Testi (MTT Testi) ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	12
2.6. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Yöntemi ile Apoptoz Tayini	12
2.7. Annexin V/7-AAD İşaretleme Yöntemi ile Apoptoz Tayini	12
2.8. H <sub>2</sub> DCFDA Boyası ile Hücre içi ROS Miktarının Belirlenmesi	13
2.9. Wound healing (Yara İyileşme) ile Hücre Göçünün Belirlenmesi	13
2.10. Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	13



2.11. Çalışmada Kullanılan Fotosensitizerlerin Sentezi	13
2.11.1. 5a ve 5b Nolu Silisyum Ftalosyaninlerin Sentezi	14
2.11.2. Kuaterner Amonyum Formundaki 6a ve 6b nolu Silisyum Ftalosyanin Bileşiklerinin Sentezi	14
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>16</b>
3.1. Gereç	16
3.1.1. Hücre Hatları	16
3.1.2. Kimyasallar	16
3.1.3. Antikorlar	17
3.1.3.1. Primer Antikorlar	17
3.1.3.2. Sekonder Antikorlar	17
3.1.4. Kitler	17
3.1.5. Cihazlar	17
3.1.6. Sarf Malzemeler	18
3.1.7. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	19
3.1.7.1. Hücre Kültürü Besiyerleri	19
3.1.7.2. Fotosensitizer maddeler	20
3.1.7.3. Hücre Canlılık Analizi Solüsyonları	21
3.1.7.4. Akridin Oranj/Ethidyum Bromür Boyama Solüsyonları	21
3.1.7.5. H <sub>2</sub> DCFDA Solüsyonu	21
3.1.7.6. Western Blot Solüsyonları	22
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	25
3.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi	26
3.2.2.1. Tripan Mavisini ile Hücre Sayımı	26
3.2.2.2. İkilenme Zamanının Belirlenmesi	26
3.2.3. Fotodinamik Terapi Yöntemi	26
3.2.4. MTT Hücre Canlılık Testi	27
3.2.5. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyaması ile Apoptoz Tayini	27
3.2.6. Annexin V/7AAD Apoptoz Testi	27
3.2.7. Hücre İçinde Oluşan ROS Miktarının Tayini	28
3.2.8. Wound Healing (Yara iyileşme) Yöntemi ile Hücre Hareketinin Belirlenmesi	28

3.2.9. Western Blot Yöntemi	29
3.2.9.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu	29
3.2.9.2. BCA Kiti ile Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi	30
3.2.9.3. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması	30
3.2.9.3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	31
3.2.9.4. Islak Blotlama	31
3.2.10. İstatistiksel Analizler	31
<b>4. BULGULAR</b>	<b>33</b>
4.1. Hücrelerin Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri	33
4.2. Hücre Kültürü	33
4.3. Canlılık Analizleri	34
4.3.1. Piperazin Çevreli Silisyum Ftalosiyanın Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	34
4.3.1.1. 5a ve 5b'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	34
4.3.1.2. 6a ve 6b'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	36
4.4. Apoptotik analizler	37
4.4.1. AO/EB Boyama İle PDT'nin Apoptozu İndüklediğinin Belirlenmesi	37
4.4.2. Annexin V/7-AAD Testi ile Sağlıklı ve Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi	39
4.5. Reaktif Oksijen Miktarının H <sub>2</sub> DCFDA Boyası İle Belirlenmesi	43
4.6. PDT'nin MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 Üzerinde Hücre Hareketine Etkisinin Wound Healing (Yara İyileşme) Yöntemi ile Belirlenmesi	43
4.7. Apoptotik Protein Ekspresyonların Western Blot Analizi ile Analizi	47
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>49</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>54</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>56</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>65</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b>	Kırmızı ışık ile aktiveleşen fotosensitizer örnekleri (635-700 nm)	7
<b>Tablo 2.</b>	Fotosensitizerlerin (1mM/11ml) moleküler ağırlıkları ve miligramları	20
<b>Tablo 3</b>	RIPA patlatma tamponunun içeriği	29
<b>Tablo 4.</b>	10'luk ve %7.5'luk ayırma jelinin içeriği	30
<b>Tablo 5.</b>	%5'lik yükleme jeli içeriği	31



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Jablonski diyagramı ve reaktif oksijen oluşumu	5
Şekil 2.	Dokularda ışık yayılımı	8
Şekil 3.	PDT ile uyarılan hücre ölüm yolları	9
Şekil 4.	PDT uygulaması sonrası kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP inaktivasyonu ile gerçekleşen apoptoz	11
Şekil 5.	5a ve 5b fotosensitizerlerinin moleküler yapısı	15
Şekil 6.	Kuartener amonyum formundaki 6a ve 6b fotosensitizerlerinin moleküler yapısı	15

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim No</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Resim 1.</b>	Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri	34
<b>Resim 2.</b>	Farklı dozlardaki 5a bileşiğinin hücre canlılığına etkisi	35
<b>Resim 3.</b>	Farklı dozlardaki 5b bileşiğinin hücre canlılığına etkisi	35
<b>Resim 4.</b>	Farklı dozlardaki 6a bileşiğinin hücre canlılığına etkisi	36
<b>Resim 5.</b>	Farklı dozlardaki 6b bileşiğinin hücre canlılığına etkisi	37
<b>Resim 6.</b>	PDT ve kontrol gruplarının, AO/EB boyama ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri.	38
<b>Resim 7.</b>	Hücre hatlarında 5a bileşiğinin geliştirdiği apoptotik oranlar	39
<b>Resim 8.</b>	Hücre hatlarında 5b bileşiğinin geliştirdiği apoptotik oranlar	40
<b>Resim 9.</b>	Hücre hatlarında 6a bileşiğinin geliştirdiği apoptotik oranlar	41
<b>Resim 10.</b>	Hücre hatlarında 6b bileşiğinin geliştirdiği apoptotik oranlar	42
<b>Resim 11.</b>	Hücre hatlarında PDT sonrası ROS oluşumunun floresan mikroskop görüntüleri	43
<b>Resim 12.</b>	MCF-10A hücre hattında oluşturulan çizigin iyileşme görüntüleri	44
<b>Resim 13.</b>	MCF-10A hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri	44
<b>Resim 14.</b>	MDA-MB-231 hücre hattında oluşturulan çizigin iyileşme görüntüleri	45
<b>Resim 15.</b>	MDA-MB-231 hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri	45
<b>Resim 16.</b>	MCF-7 hücre hattında oluşturulan çizigin iyileşme görüntüleri	46
<b>Resim 17.</b>	MCF-7 hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri	46
<b>Resim 18.</b>	PDT'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında apoptotik proteinlerin ekspresyonları üzerine etkisi	48

## SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>5a, 5b</b>	Hidrofobik piperazin çevreli silisyum ftalosiyanimler
<b>6a, 6b</b>	Amfifilik piperazin çevreli silisyum ftalosiyanimler
<b>7-AAD</b>	7-amino-aktinomisin D
<b>AIF</b>	Apoptoz indükleyici faktör
<b>APS</b>	Amonyum persülfat
<b>ATCC</b>	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
<b>BCL-2</b>	B-hücre lenfoma 2
<b>BSA</b>	Bovin serum albümin
<b>BRCA</b>	Meme kanser geni
<b>DMEM/F12</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
<b>DFF45</b>	DNA parçalanma faktörü
<b>DMF</b>	Dimetilformamid
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonukleik asit
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>FBS</b>	Fetal bovin serum
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	2', 7'-diklorofloresan diasetat
<b>IACR</b>	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>IB</b>	İmmünoblot
<b>ICAD</b>	Kaspaz-aktive DNaz
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>PAGE</b>	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PARP</b>	Poli (ADP-riboz) polimeraz
<b>PBS</b>	Fosfat tampon solüsyonu
<b>PDT</b>	Fotodinamik terapi
<b>Pen/strep</b>	Penisilin/streptomisin
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsülfonil florür
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RPMI 1640</b>	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium
<b>PVDF</b>	Poliviniliden florür

<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SiPc</b>	Silisyum ftalosiyenin
<b>TBS-T</b>	Tris buffered saline-tween 20
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamin
<b>TLC</b>	İnce tabaka kromatografisi

### **Simgeler**

<b>B</b>	Beta
<b>G</b>	Gram
<b>j/cm<sup>2</sup></b>	Joul (enerji birimi)/santimetre kare
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>Mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>Nm</b>	Nanometre

### **Formüller**

<b>CH<sub>3</sub>I</b>	Metil iyodür
<b>C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub></b>	Tris-baz
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>H<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>P</b>	Sodyum fosfat dibazik
<b>N<sub>2</sub></b>	Azot
<b>NaH</b>	Mililitre
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Potasyum karbonat
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Potasyum dihidrojen fosfat
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NaF</b>	Sodyum florür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Sodyum ortovanadat

## ÖZET

### **Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında Yeni Piperazin Çevreli Silisyum Ftalosiyanınların Fotodinamik Terapi (PDT) Etkinliğinin Araştırılması**

Kanser, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulduğu patolojik bir durumdur. Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Meme kanseri tedavisinde birçok farklı yöntemler kullanılsa da alternatif tedavi arayışları devam etmektedir. Tedavi yöntemlerinde, yan etkinin en az düzeyde olması ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümöral hücrelerin hedeflenmesi istenilmektedir. Bu bağlamda ilgi gören alternatif yöntemlerden biri fotodinamik terapi (PDT)'dir. PDT, belirli bir dalga boyundaki ışık ile aktifleşen bir fotosensitizer molekül varlığında, reaktif oksijen türlerinden yararlanarak hücre ölümünün gerçekleştirilmesini sağlar. Tezin amacı; yeni sentezlenen piperazin çevreli silisyum ftalosiyanınların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A normal meme hücrelerinde PDT uygulaması aracılığıyla gelişmesi beklenen antiproliferatif etkinin ve apoptozun araştırılmasıdır. Bu bağlamda; çalışmada kullanılmak üzere sentezlenmiş dört adet fotosensitizer molekül (5a, 5b, 6a ve 6b) ilk kez MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri ve MCF-10A normal meme hücre hatlarında çalışıldı. Kullanılan hücre hatları üzerinde farklı dozlarda madde ve farklı yoğunluklarda ışık ile PDT denemeleri gerçekleştirilip etkin dozlar bulundu. PDT uygulaması ile hücrelerde oluşan ROS miktarı H<sub>2</sub>DCFDA boyama ile tespit edildi. Fotosensitizerlerin meme kanseri hücre hatlarındaki apoptotik etkileri akridin oranj/etidyum bromür boyama ile mikroskopik olarak teyit edildi. PDT uygulamasının ardından, Annexin V/7-AAD flow sitometrik boyama metodu ile apoptotik hücre popülasyonu kantitatif olarak tespit edildi. Metastatik hücre hatları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde PDT'nin hücre hareketine etkisi wound healing (yara iyileşme) deneyi ile belirlendi. Apoptotik belirteçler olan PARP1, kesilmiş PARP1 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimler western blot yöntemi ile tespit edildi. Kullanılan fotosensitizerler ile gerçekleştirilen PDT'nin meme kanseri hücre hatlarındaki, hücre canlılık ve apoptotik analiz deneylerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Dört fotosensitizerden iki tanesi (5a ve 5b) kullanılan hücre hatlarında kesilmiş PARP1 oluştururken diğer iki fotosensitizer (6a ve 6b) uygulandığında kesilmiş PARP1 protein ekspresyonu gözlenmedi. Elde edilen bulgulara göre, kullandığımız fotosensitizerlerin anti kanser çalışmalara aday olabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, fotoduyarlaştırıcı, neoplazma, reaktif oksijen türleri, toksisite



## ABSTRACT

### **Investigation of Photodynamic Therapy (PDT) Effects of The New Piperazine Substituted Silicon Phthalocyanines on Different Breast Cancer Cell Lines**

Cancer is a pathological condition in which the balance between cell proliferation and cell death is destroyed. Breast cancer is the most common type of cancer in women. Although many methods are used in the treatment of breast cancer, alternative methods are still in search. In treatment methods, it is desirable to minimize side effects and to target tumor cells without damaging healthy cells. In this context, one of the alternative methods of interest is photodynamic therapy (PDT). PDT enables reactive oxygen species in the presence of a photosensitizer molecule activated by light of a certain wavelength, and thus cell death. The aim of this thesis; investigate the antiproliferative effect and apoptosis of new piperazine substituted silicon phthalocyanines by way of PDT in the MCF-7, MDA-MB-231 breast cancer cell lines and MCF-10A normal breast cells. In this context; four photosensitizer molecules (5a, 5b, 6a and 6b) which synthesized for use in this study were first studied in MCF-7, MDA-MB-231 breast cancer and MCF-10A normal breast cell lines. On the cell lines used, PDT experiments with different doses of substance and different concentrations of light were performed and effective doses were found. The amount of ROS arising from PDT in cells were determined by H<sub>2</sub>DCFDA staining. The apoptotic effects of photosensitizers in breast cancer cell lines were microscopically confirmed by acridine orange/ethidium bromide staining. After PDT treatment, apoptotic cell population was quantitatively determined by Annexin V/7-AAD flow cytometric staining method. The effect of PDT on cell movement in the metastatic cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 cells was determined by wound healing assay. Changes in expression of apoptotic markers PARP1, cleaved PARP1 and caspase-3 proteins were detected by western blot method. Statistically significant results were obtained in cell viability and apoptotic analysis experiments on breast cancer cell lines of PDT with the photosensitizers. Two of the four photosensitizers (5a and 5b) used produced cleaved PARP1 in the cell lines, while the other two photosensitizers (6a and 6b) didn't show cleaved PARP1 band. The results were evaluated statistically and in accordance with the literature. According to our data, we believe that the photosensitizers we use may be a potential drug candidate for anti cancer studies.

**Keywords:** Apoptosis, neoplasm, photosensitizers, reactive oxygen species, toxicity

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerden kemoterapi ve radyoterapinin olumlu etkilerinin yanı sıra birçok istenmeyen yan etkiye sebep olduğu, aynı zamanda sağlıklı hücreleri de öldürdüğü bilinmektedir (1). Yeni kanser tedavisi geliştirmeye yönelik çalışmalarda amaç, istenmeyen yan etkileri azaltıp tedavide en etkin sonucu almaktır. Bu anlamda fotodinamik terapi (PDT), yeni tedavi arayışlarında ilgi görmekte olan bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (2). PDT, tek başına bir kanser tedavi yöntemi olarak çalışıldığı gibi, daha hızlı ve etkili sonuçlar için kemoterapi ve radyoterapiyi destekleyici olarak da çalışılmaktadır (3, 4). Bu tedavi yaklaşımı, hücreler üzerinde tek başına zararsız olan bir ışık ve ışık ile uyarılan bir fotosensitizer molekülün etkileşimine dayanmaktadır. Fotosensitizerin ışık ile etkileşimi sonucunda hücredeki moleküler oksijen, reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşerek kanser hücrelerinde hasar oluşmasına neden olmaktadır (5). Bugüne kadar, farklı fotosensitizer türleri geliştirilmiş olup kanser hücrelerine spesifik, etkili, fizyolojik şartlarda hücre içerisine alınan, agregasyonu zayıf fotosensitizerlerin geliştirilmesine yönelik çalışılmaktadır.

PDT’de, kolay modifiye edilebilen ve yüksek absorpsiyon gücüne sahip olan ftalosiyanimler, uygun fotosensitizerlerdendir. İlaç modellerinde kullanıma uygun olan N-heterosiklik yapıdaki piperazin halkaları ile çevrelenen ve merkezi boşluğunda silisyum metali barındıran fotosensitizerler çalışmamızda kullanılmak üzere sentezlenmiştir. Çalışmamızda, piperazin çevreli yeni silisyum ftalosiyanimlerin MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A normal meme hücre hattı hücrelerinde ilk kez kullanılması, ışık ile uyarılan bu moleküllerin hücrelerde oluşturması beklenen apoptotik ve anti tümöral etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın amacına yönelik, ilk olarak piperazin çevreli silisyum ftalosiyanimlerin (SiPc) MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerindeki canlılığa olan etkileri gösterilmiştir. Moleküler oksijenin singlet oksijene dönüşümü mikroskopik olarak tespit edilmiştir. Metastatik özellikte olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PDT uygulamasının ardından, hücrelerin hareket kabiliyeti incelenmiştir. PDT uygulamasının neden olduğu apoptotik değişimlerin izlenmesi için kaspaz-3, kesilmiş PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz) ve PARP proteinlerinin ekspresyonları analiz edilmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Meme Kanseri**

Meme yapısı, süt üreten bezleri (lobüller) ve kanalları bulunduran glandüler dokular ve yağlı, lifli bağ dokudan oluşan stromal (destekleyici) dokular olmak üzere iki ana doku tipinden oluşur. Sıklıkla kadınlarda görülen meme kanseri, çoğunlukla süt kanallarının iç kısımları veya kanallara süt sağlayan loplardan gelişir (6).

Meme kanseri hücreleri, bulunduğu bölgeye göre, sadece kanallarla sınırlı kalıp diğer dokulara geçmiyorsa non-invaziv, kanal ve lobüler duvardan geçip memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila ediyorsa invaziv olarak sınıflandırılır. Meme kanserinin en yaygın tipi olan duktal karsinoma in situ (DCIS) ve süt bezlerindeki hücrelerin artışıyla gelişen lobular karsinoma in situ (LCIS, lobular neoplasia) en sık görülen non invaziv meme kanseri türleridir. Medullar karsinoma ve tubular karsinoma ise en az görülen invaziv meme kanseri türlerindedir (6-8).

#### **2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji**

Kanser, dünyada en sık görülen hastalıkların başında gelmektedir ve ölüm sıklığı açısından kardiyovasküler hastalıkların ardından ikinci sırada yer alan yaygın bir hastalık olarak bilinmektedir (9, 10). Dünya sağlık örgütünün (World Health Organization-WHO) ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IACR) 2018 yılında yayınlamış olduğu verilerine göre, dünyanın 20 farklı coğrafi bölgesindeki araştırmalar sonucunda, yaklaşık 18.1 milyon yeni kanser vakası ve buna bağlı olarak 9.6 milyon ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir (11).

2018 global kanser istatiklerine göre 36 kanser vakası içerisinde meme kanseri 2 088 849 (%11.6) yeni tanı sayısı ile 2. sırada yer alırken, meme kanseri nedeniyle ölen kişi sayısı 626 679 (%6.6)'dır. Meme kanseri insidansı; Avustralya, Batı Avrupa, Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'da yüksek, Doğu Afrika, Orta Afrika ve Güney Asya'da ise düşüktür (11-13).

#### **2.1.2. Etiyoloji**

Meme kanseri etiyojisinde birçok faktörün rol aldığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları; menopoz gibi hormonal değişimler ya da hormonlarda görülen bozukluklar, alkol kullanımı, obezite, uzun süreli radyasyon maruziyetidir. Aile hikayesinde meme kanseri olan kişilerin bu hastalığa yakalanma olasılığı yüksektir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki anormalliklerin erken yaşlarda meme kanserine yakalanma riskini %40 ile %85 arası

artırdığı bilinmektedir (6, 14). Meme kanseri oranı hamilelik yaşıyla da ilişkilendirilmiştir. İlk hamileliği 35 yaş üstünde olan kişinin meme kanserine yakalanma olasılığı 30 yaş öncesine göre daha fazladır. Emzirmenin de meme kanseri riskini azalttığı gözlemlenmiştir (15, 16). Coğrafi ve kültürel varyasyonlarında meme kanserine yakalanma olasılığını değiştirdiği bilinmektedir. Örneğin, Asya ve Batı ülkeleri arasındaki beslenme farkının hormon sentezi ve metabolizmasını etkilemesi nedeniyle meme kanseri vakalarında farklılıklar görülmektedir. Bunun dışında Asya ve Batı ülkeleri arasındaki genetik farklılığın da meme kanseri teşhisinde rolü vardır (6).

## **2.2. Fotodinamik Terapi (PDT)**

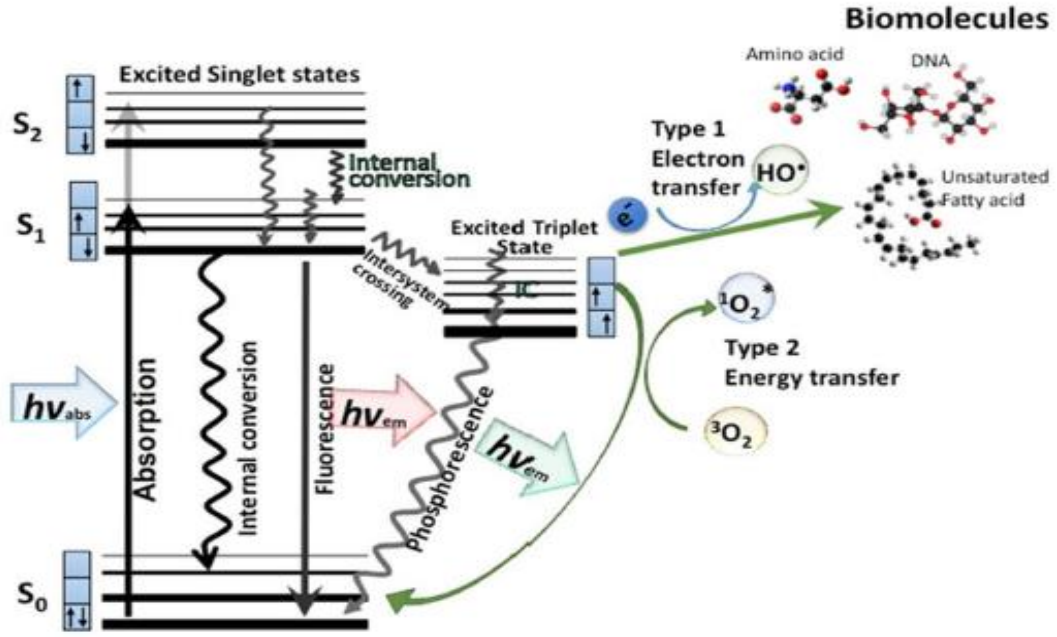
Fotodinamik terapi, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan, ışık ve ışık ile aktifleşen etkin bir madde içeren tedavi yöntemidir (17). 4000 yıl önce antik Mısır'da ışık ile çeşitli hastalıkların tedavilerinin yapıldığı bilinmektedir. Mısırlılar, Amni Majus bitkisi ve ışık ile vitiligoyu tedavi etmeyi başarmışlardır (18). PDT'nin temelleri, 1960'lı yıllarda hemoporfirin türevi olan bir molekül geliştiren Lipson ve arkadaşları tarafından atılmıştır. 1978 yılında, cilt kanseri üzerinde argon boya lazeri ile ilk PDT denemesi yapılmıştır. 1980'li yılların başında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) hemoporfirin türevi olan "Photofrin" isimli ilacın klinik uygulamalarına onay vermesiyle, bu yöntem pek çok kanser vakasında uygulanmaya başlanmıştır. PDT'nin, ışığa maruz kalan fotoduyarlaştırıcının uyarılmasıyla oluşan bir fotodinamik reaksiyon ile elde edildiği olgusu ilk olarak 1990 yılında Raab ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Birinci nesil fotosensitizer olarak isimlendirilen Photofrin'in sahip olduğu yan etkilerden ötürü, araştırmacılar ikinci ve üçüncü nesil fotosensitizerler üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır (19-21).

Fotodinamik terapi (PDT), günümüzde neoplastik ve vasküler hastalıkların tedavisi için onaylanmış alternatif bir tedavi yöntemidir. PDT'nin klinikteki kullanımı, yaşa bağlı masküler dejenerasyon (AMD) ve sedef hastalığı dahil olmak üzere mesane, yemek borusu, solunum yolu ve jinekolojik kanserler gibi çeşitli kanserlerin tedavilerini içermektedir (19, 22). PDT'nin işlevi; topikal veya sistemik olarak uygulanan bir fotosensitizer, görünür alandaki ışık ve singlet veya reaktif oksijen oluşumunda etken olan moleküler oksijene dayanır (23). Kullanılan ışık ve ışık ile etkileşen fotosensitizer molekül tek başlarına zararsız iken, etkileşimleri sonucu tümör hücrelerindeki moleküler oksijenin reaktif oksijene dönüşümüyle hücre hasarına ve ölümüne yol açmaktadır (24). PDT'nin antitümöral etkileri; tümör hücreleri üzerinde doğrudan oluşan sitotoksik etki, vasküler tümörlere dolaylı yoldan

verilen hasar ve sistemik bağıışıklığı aktive edebilen inflamatuvar yanıtın indüksiyonu sayesinde birbirleriyle ilişkili üç mekanizmadan oluşmaktadır (22). PDT'nin moleküler düzeydeki etkisi, plazma zarı, mitokondri, lizozom, golgi ve endoplazmik retikulum (ER) zarlarında geri döndürülemeyen foto-hasarın oluşumuna neden olması şeklinde görülür (24).

### **2.2.1. Fotodinamik Terapinin Etki Mekanizması**

PDT, singlet oksijen veya diğer reaktif oksijen türlerinin aracılığı ile hücre hasarına neden olmaktadır (25). PDT'nin etki mekanizması Jablonski diagramı ile açıklanır. Elektronik uyarımın ortak özellikleri ve sonuç olarak ortaya çıkan fotokimyasal reaksiyon üç basamak ile özetlenmektedir. Bu basamaklar temel hal (S0), tekli uyarılmış haller (S1, S2, S3) ve uzun ömürlü üçlü uyarılmış hal (T1) basamaklarıdır (28). Şekil 1'de görüldüğü gibi bir fotonun absorpsiyonu, fotosensitizerin "uyarılmış hal" formuna geçmesine neden olur. Sistemler arası bir dönüşümle bu elektronlardan bazıları triplet uyarılmış hale çevrilir. Triplet halde çevredeki biyomoleküller ile etkileşime girer (26). Bu etkileşim elektron transferi ile gerçekleşiyorsa tip I, enerji transferi ile gerçekleşiyorsa tip II reaksiyon olarak adlandırılmaktadır. Moleküler oksijen varlığında, Tip I reaksiyonlarında süperoksit ve hidroksil radikalleri, Tip II reaksiyonunda ise singlet oksijen oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen, proteinler ve lipidler gibi birçok biyomolekül türüne zarar verir (27). PDT'de reaktif oksijen oluşumu daha çok Tip II reaksiyon üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 1) (20, 28-30).



Şekil 1. Jablonski diyagramı ve reaktif oksijen oluşumu (Abrahamse ve Hamblin'den, 30)

### 2.3. Fotosensitizerler

Fotodinamik terapide en önemli bileşenlerden biri fotosensitizerlerdir. Fotosensitizerler, uygun dalga boylarında aktifleşen ışığa duyarlı moleküllerdir. Yapılarında, temel halde ve zıt yörüngelerinde 2 elektron içerirler. Uygun absorpsiyon, bir elektronun daha yüksek enerji düzeyine uyarılmasını sağlamaktadır. Oluşan bu singlet uyarılmış haldeki fotosensitizer kararsızdır ve enerjisini floresans veya ısı olarak kaybeder. Bunun dışında, sistemler arası dönüşüme maruz kalarak triplet hale geçebilir. Bu triplet uyarılmış haldeki molekül daha karardır. Bu safhada daha uzun süre kalarak, oksijene enerji transferinde bulunabilir. Bu enerji transferi singlet oksijen oluşumuna yol açmaktadır. (Şekil 1) (28, 29).

Kanserde kullanılan fotosensitizerler, genellikle hemoglobin yapısındaki protoporfirin prostetik yapısına benzer olan tetropirol omurgasına dayanmaktadır. Yapılarına bağlı olarak genelde 600-800 nm arası dalga boyunda absorpsiyon gösterirler (28). Ftalosiyaninler, klorinler ve bakteriyoklorinler koyu kırmızı spektral bölgede yüksek emicilik göstermeleri sebebiyle daha yüksek verime sahiptir ve bu açıdan tercih edilen fotosensitizerlerdir (30, 31). Çalışmalarda optimum fotosensitizeri bulmak için porfirin, purfirin, klorin ve ftalosiyanin dahil olmak üzere birçok madde sentezlenmiştir. Sentezlenen

bu fotosensitizerlerin amfifilik özellikte olması istenilen özellikler arasındadır. Yüksek lipofilik yapıdaki fotosensitizerler, intravenöz enjeksiyonda kan damarlarını geçmekte zorluk yaşar. Öte yandan yüksek hidrofilik yapıdaki fotosensitizerlerin ise hücreye nüfuzu zordur. Bu nedenle yeni sentezlenen fotosensitizerlerde bu iki özellik açısından denge sağlanması önemlidir (32).

Fotosensitizer moleküllerin hücre içine girerek, mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi ve plazma membranı gibi çeşitli organellere lokalize olması etkinlikleri açısından önemlidir (33). Bu lokalizasyonun seçici olarak tümör hücresinde gerçekleşmesi istenilen özelliktir. Kanseri hücrelerinde LDL reseptörlerinin ekspresyonlarının yüksek oluşu, daha hızlı çoğalmaları, düşük pH ve artmış vasküler geçirgenlik gibi etkenler fotosensitizerlerin tümöral hücrelere olan seçiciliğini artırmaktadır (32, 34, 35).

Fotosensitizerler üç ana gruba ayrılmaktadır. Birinci nesil fotosensitizerlerin örneklerinden olan porfirinler, ışığa duyarlılığın uzun süre devam etmesi ve uzun dalga boyu emilimi sergileyememeleri (MacDonald and Dougherty, 2001) gibi olumsuz özelliklere sahiptir (23). Porfirin bileşenlerinin geliştirilme çalışmaları benzoforin, klorin gibi ikinci nesil fotosensitizerleri ortaya çıkarmıştır. İkinci nesil fotosensitizerler daha uzun dalga boyunu absorblama yeteneğine sahiptirler (MacDonald veDougherty, 2001; Brown *ve ark.*, 2004) (36). İkinci nesil fotosensitizerlerden olan klorinler ve ftalosiyeninler en sık kullanılan fotosensitizerler arasındadır (37, 38). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise ikinci nesil fotosensitizerlerin yerini tümör dokusuna afinitesi olan ve normal dokuda agregasyon göstermeyen üçüncü nesil fotosensitizerler almaya başlamıştır. (36). Çeşitli hastalıklara yönelik çalışılmış, farklı dalga boyundaki ışık ile etkileşen çeşitli fotosensitizer örnekleri çalışılmıştır (Tablo 1) (2, 5, 23, 39-41).

**Tablo 1.** Kırmızı ışık ile aktiveleşen fotosensitizer örnekleri (635-700 nm)

Fotosensitizer	Absorbladığı maksimum dalga boyu (nm)	Çalışılan hedef tümörler
Porfirinler (Porfimer sodium)	630	Akciğer, mide, uterus, meme, deri
Klorinler	690	Meme, akciğer
Ftalosiyeninler	680	Meme, akciğer
Temoporfin	652	Beyin, baş-boyun
Hemotoporfirin türevleri	630	Akciğer, bronş, özafagus, beyin
Laserphrin	664	Akciğer, beyin, özafagus
Porfimer sodyum	630	Akciğer, gastrointestinal
5-ALA, metil ester ALA	635	Deri, baş-boyun

### 2.3.1. Piperazin Halkaları

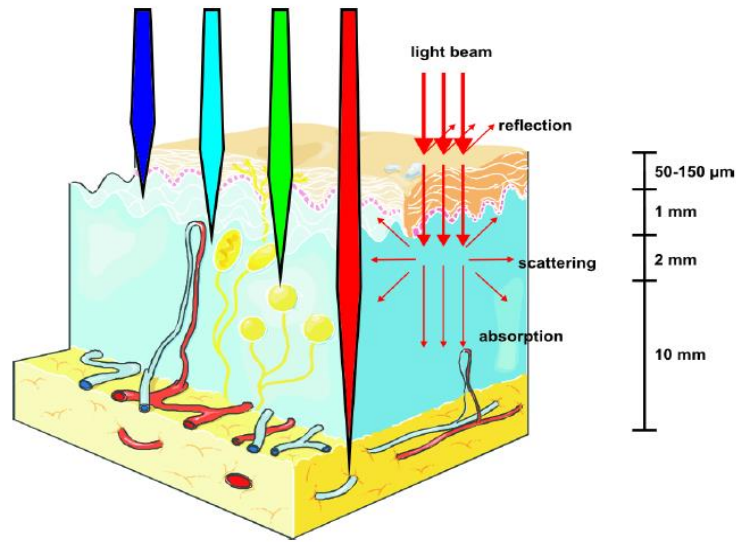
Piperazin, iki karşıt azot atomu içeren 6 halkalı bir yapıya sahip bir moleküldür (30). N-heterosiklik yapısındadır ve ilaç çalışmalarında sıklıkla kullanılan moleküllerdendir (42). Piperazin ve analogları, antifungal, antibakteriyel, antipsikotik ve antikanser özellikte ilaçların yapılarında bulunurlar (43-45). Son 10 yılda yeni bir rekreasyonel ilaç grubu olarak bir dizi piperazin türevi ortaya çıkmıştır. Piperazin türevi ilaçlara, antineoplastik ajan olan Imatinib (Ticari ismi Glivec), pulmoner arteriyel hipertansiyonun tedavisinde kullanılan Sildenafil gibi birçok örnek verilebilir. Kanseri çalışmalarında da piperazin türevi moleküller farklı kanser hücre hatları ve hayvan modellerinde sıklıkla denenmektedir (46, 47). Hayvan modelleriyle yapılmış çalışmalarda, piperazin türevi 1,3-trifluorometilfenilpiperazin'in kümülatif dopamin ve serotonin salınımını uyarabileceği gösterilmiştir (48).

### 2.3.2. Ftalosiyeninler

Ftalosiyeninler (Pc), dört imino izoindol ünitesinden oluşan düzlemsel, aromatik, makro halkalı yapılardır (49). İlk kez Braun ve Tcherniac tarafından 1907 yılında yapılan bir çalışmada yan ürün olarak bulunmuş fakat yapısı Linstead ve arkadaşları tarafından 1929 yılında açığa çıkarılmıştır (42). Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı günümüzde bu moleküllerin çalışma sahası genişlemektedir (50). Pc'ler ve türevleri güçlü uzak kırmızı ve NIR (yakın kızılötesi) ışık Emilimi gösterirler. Yüksek sönme katsayılı ( $\epsilon > 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) uzun dalga boyu Emilimi, daha derin doku görüntüleme için NIR dalga boylarına yaklaşan kırmızı floresans emisyonu ve yüksek singlet oksijen kuantum verimi gösterirler (Şekil 2)



(51, 52). Pc'lerin halkalı yapısı birçok metal iyonunu merkezi boşluğunda barındırabilecek şekildedir. Bu nedenle metal içerikli Pc bileşikleri sentezlenmektedir. Pc'ler, merkezindeki metale bağlı olarak, singlet oksijen kuantum verimleri ve yüksek triplet uyarılmış halde kalma ömürleri bakımından PDT için uygun fotosensitizer adaylarıdır. Bunun yanında düzlemsel yapıları sulu ortamlarda toplanma (agregasyon) eğilimi gösterirler. Bu agregasyon durumu uyarılmış halin kendi kendilerine söndürülmesiyle sonuçlanır (50). Ftalosiyanın tercih edilmelerindeki etkenlerden biri de halkalı yapısına bağlı olarak basitçe modifiye edilebilmeleridir. Bu sebeple farklı çalışmalarda kullanılabilmesi için hidrofilitik, emilim ve emisyon dalga boyunda değişiklikler yapılabilmektedir.

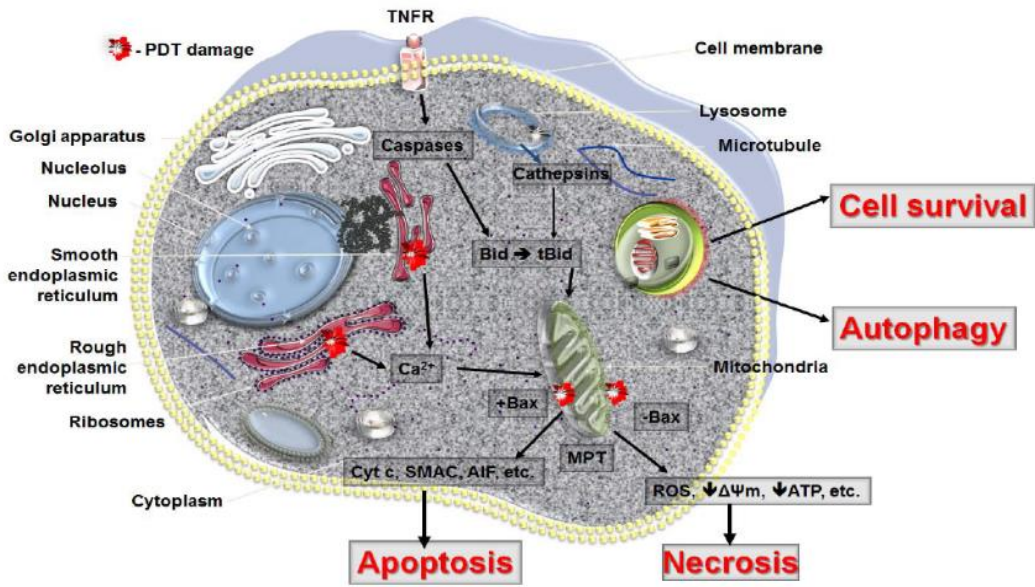


Şekil 2. Dokularda ışık yayılımı (Agostinis'ten, 52)

#### 2.4. PDT ile Hücre Ölümünün Uyarılması

PDT'nin antitümöral etkisi hücrede birden fazla şekilde gerçekleşebilir. PDT'de reaktif oksijen türleri proteinlerin, yağların ve diğer moleküllerin hasarına neden olmaktadır. Bu hasarlar sonucunda apoptoz, otofaji ve nekroz gibi ölüm yolları aktive olmaktadır (Şekil 3) (53). Apoptoz programlı hücre ölümüdür. Nekrotik hücre ölümü, apoptozun tersine patolojik bir hücre ölümüdür. Nekroz; sitoplazmada şişme, hücre organellerinin tahrip olması, plazma zarının bütünlüğünün bozulması ile karakterize, hücre içeriğinin dışarı salınması ve bunun sonucu inflamatuvar yanıt oluşumu gözlenen, şiddetli ve hızlı bir dejeneratif ölüm şeklidir (54). Otofaji ise hücrede, hücre ürünlerinin sentezi, bozulması, geri dönüşümü arasında denge sağlayan katabolik mekanizmadır. Bu işlem, hücrede besin

azlığı, oksidatif stres, yaşlanma, ER stresi vb. gibi durumlarda hücrede enerji kaynaklarını dengelemek amacıyla çeşitli organel ve proteinlerin lizozomal parçalanması içermektedir. Geri döndürülemeyen hasarların gerçekleştiği hücrelerde, otofaji hücreyi ya kendi sistemiyle ya da apoptoz yollarını indükleyerek ölüme yönlendirir (55). PDT uygulandığı hücrelerde, mitokondriden sitokrom-c salınımı, Bcl-2 hasarı veya sitoplazmada NFκB hasarı ile apoptoz, lizozomda hasar veya endoplazmik retikulumde Beclin-1, mTOR aktivasyonu ile otofaji ya da hücre mebrandaki bütünlüğün kaybı nekroz oluşmasına neden olabilmektedir (33, 56-58).



Şekil 3. PDT ile uyarılan hücre ölüm yolları (Mroz'dan, 33)

### 2.4.1. Apoptoz

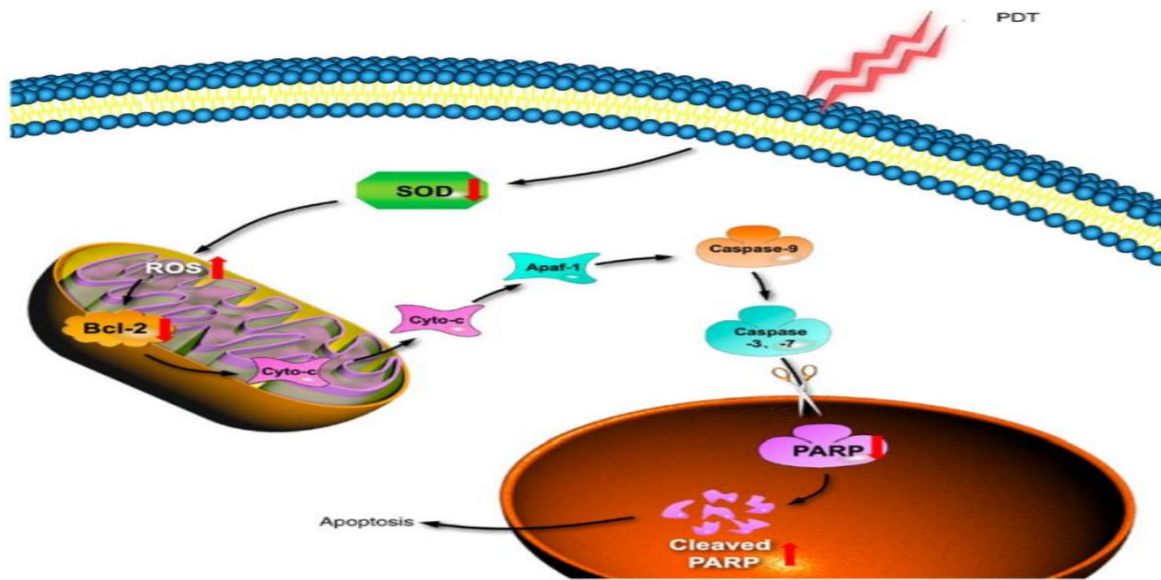
İlk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından programlı hücre ölümü “apoptoz” olarak tanımlanmıştır (59). Apoptoz, gelişim ve yaşlanma sırasında gerçekleştiği gibi dokulardaki hücre popülasyonunu korumak amacıyla homeostatik bir mekanizma olarak da meydana gelmektedir. Bunların yanında immün reaksiyonlarda bir savunma mekanizması olarak veya hücrelerin çeşitli sebeplerle zarar gördüğü durumlarda gerçekleşmektedir (60). Programlı hücre ölümündeki bozulmalar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklarında gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Aşırı apoptoz dejeneratif hastalıklara yol açarken, apoptozun olmaması da proliferasyon kontrolünün engellenmesine ve kansere sebebiyet vermektedir (61).

Hayvan hücrelerinde apoptoz, ekstrinsik (ölüm reseptörleri yolağı), intrinsik (mitokondriyal yolak) ve perforin/granzim yolağı (granzim A-B) olmak üzere 3 yolak üzerinden gerçekleşmektedir. Mitokondriyal yolak, ölüm reseptörleri yolağı ve granzim B yolakları kaspaz kaskadı üzerinden ilerlerken, granzim A yolağı kaspaz bağımsız tek zincir DNA kırığı oluşturarak işlev görür (61). Mitokondriyal yolda kaspaz aktivasyonu, Bcl ailesinin proapoptotik üyeleri tarafından mitokondri membran geçirgenliğini artırması ile yakından ilişkilidir (62). Mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması ile mitokondrinin iç ve dış zarları arasında sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF ve endonükleaz G gibi bir dizi proteinin salınımı gerçekleşmektedir (63). Sitozoldeki bu proteinler kaspazları uyararak hücre ölümünü tetiklemektedirler (64). Ölüm reseptörleri yolağında ise CD95 (APO-1/Fas), TNF reseptörü 1 (TNFRI), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand reseptörü 1 (TRAIL-R1) ve TRAIL-R2 gibi iyi bilinen ölüm reseptörleri işlev görmektedir (65). Her yolağın sonucu olarak, hücre apoptoza girince kromatin yoğunlaşır, internükleozomal DNA parçalanması gerçekleşir, hücre parçalanmaya başlar ve apoptotik cisimcikler oluşmaktadır. Oluşan apoptotik cisimcikler, makrofajlar tarafından ortamdan uzaklaştırılmaktadır (61).

Programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde görevli olan kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar (66). Kaspazlar genellikle başlatıcı (kaspazlar 2, 8, 9, 10) ve efektör (kaspazlar 3, 6, 7) olarak sınıflandırılır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara nakledeleler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A ve DNA tamirinde rol alan PARP parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin oluşumuna neden olurlar. Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3, birçok önemli hücresele proteini katalize eden apoptozda sıklıkla aktif bulunan ölüm proteazıdır. Kaspaz-3'ün aktivasyonu mitokondriyal sitokrom-c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağılı olduğu gibi bunlardan bağımsız da gerçekleşebilmektedir (67). Kanseri hücrelerinde PDT sonrası ROS oluşumu sonucu hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşmektedir (68). Kaspaz-3 aktivasyonunun varlığı apoptoz ile sonuçlanacağı için, prokaspaz-3'ün kesilmiş kaspaz-3'e dönüşümü bir apoptoz belirteci olarak bilinmektedir (66).

Mitokondri, apoptotik yollardaki, merkez organellerin başında gelmektedir. Hasarlı bölgelerden veya hücre ölüm reseptörlerinden gelen sinyaller mitokondri membran geçirgenliği artırır. Böylece mitokondriden sitokrom-c, belirli prokaspazlar, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi apoptotik proteinler salınmaya başlar. Salınan öncü kaspazlar aktif kaspazlara dönüşerek, BCL-2, ICAD/DF45 ve PARP gibi anti apoptotik proteinleri parçalayarak inaktive eder. Klinkte ve preklinikte kullanılan fotosensitizerlerin çoğu güçlü birer apoptotik indükleyicidir ve mitokondriye lokalize olma eğilimindedirler. PDT sırasında oluşan singlet oksijen, aminoasit yapılarını bozarak mitokondriyal proteinlere etki eder (69). Sonuç olarak, sitokrom c salınımı, kaspaz aktivasyonu ve PARP inaktivasyonu ile hücre apoptoza yönlendirilir (70, 71).

Apoptoz sırasında kaspazlar tarafından parçalanarak inaktive edilen Poly (ADP Riboz) Polimeraz (PARP) proteini, toplamda 17 proteinden oluşan ve ökaryotik hücrelerde bulunan ADPribozil transferaz ailesine aittir (72-74). PARP, bir DNA tamir mekanizması olan baz ekzisyon onarımında (BER) önemli roller üstlenmektedir (75). PARP, DNA hasarı sinyali sonrası kırık oluşan DNA ya bağlanır ve bu bölgede bulunan diğer DNA onarım proteinlerini düzenler. PARP1 proteini, DNA hasarı onarımı sürecinde ATP ve NAD<sup>+</sup> kullanır. ATP ve NAD<sup>+</sup> nın hücrede tükenmeye başlaması, apoptotik uyarıya yol açmakta ve bunun sonucunda hücredeki ATP ve NAD<sup>+</sup>ın tükenmemesi için kaspazlar tarafından PARP kesilerek inaktive edilmektedir (Şekil 4) (76).



Şekil 4. PDT uygulaması sonrası kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP inaktivasyonu ile gerçekleşen apoptoz (Zhuo'dan, 77)

## **2.5. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi hücre canlılığı ve sitotoksikite çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir analiz yöntemidir (78). Prensip olarak, sarı tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal dehidrojenazlar sayesinde çözünmeyen mor formazan kristalleri oluşturmaya dayanır. Ölü hücreler bu formazan kristallerini oluşturma yeteneğini kaybetmiştir. Bu nedenle yalnızca canlı hücrelerde bu bahsedilen kristallerin oluşumu görülür. Çözünmüş formazan kristallerinin konsantrasyonu, spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülmektedir (79).

## **2.6. Akridin Oranj/Etidyum Bromür (AO/EB) Boyama Yöntemi ile Apoptoz Tayini**

AO/EB, apoptozu mikroskopik olarak belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri akridin oranj/etidyum bromür yöntemidir. Akridin oranj, hem canlı hem de ölü hücrelerin içine girerek hücre çekirdeklerini yeşil renge boyamaktadır. Etidyum bromür ise sadece apoptotik ve ölü hücreler tarafından hücre içine alınarak hücre çekirdeğinin turuncu veya kırmızı renge boyanmasını sağlamaktadır. Floresan emisyonu ve boyanan çekirdekte kromatin yoğunlaşmasının morfolojisine göre hücreler 4 farklı şekilde değerlendirilir (80). Düzgün yapıda ve parlak yeşil boyanmış hücreler canlı hücrelerdir. Erken apoptotik hücrelerde yeşil boyanır fakat perinuklear kromatin yoğunlaşmasından çekirdekte parlak yeşil fragmanlar veya lekeler görülmektedir. Geç apoptotik hücrelerde yoğunlaşmış ve parçalanmış kromatin kırmızı ve turuncu ışığa verirken, nekrotik hücreler ise organize ve homojen halde kırmızı ve turuncu ışığa vermektedir.

## **2.7. Annexin V/7-AAD İşaretleme Yöntemi ile Apoptoz Tayini**

Annexin V/7-AAD işaretleme yöntemi, canlı ve apoptotik hücrelerin tayininde kullanılan flow sitometrik bir yöntemdir. Annexin V, apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzeyine taşınan fosfatidilserine bağlanma afinitesine sahiptir. Canlı hücrelerde fosfatidilserin iç yüzeydeyken apoptozun indüklenmesiyle dış zara aktarılır ve annexin V bağlanmasına uygun hale gelmektedir. 7-amino aktinomisin D (7-AAD) ise, canlı hücrelerin içine giremeyen bir boyadır ve membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri canlı hücrelerden ayırmak için kullanılmaktadır (81). Bu yöntem, erken ve geç apoptotik hücreler arasında ayırım sağlayarak apoptozu ölçmeyi sağlar. Canlı hücreler bu iki boyayı da geçirmez. 7AAD'nin hücre içine alınmadığı fakat Annexin V'in membran yüzeyindeki fosfatidilserinlere bağlandığı durumda, hücrelerin erken apoptotik süreçte olduğu kabul

edilir. Her iki boyanın da etkisinde kalan hücreler ise geç apoptotik hücreler olarak değerlendirilmektedir (82).

## **2.8. H<sub>2</sub>DCFDA Boyası ile Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi**

H<sub>2</sub>DCFDA boyası hücresele seviyede reaktif oksijen miktarını saptamada kullanılan temel yöntemlerden biridir (83). H<sub>2</sub>DCFDA, lipit membran boyunca hücre içine yayılarak sitozolde gerçekleşen deasetilasyon ile H<sub>2</sub>DCF'ye dönüşür. DCF membrandan geçemez ve hücre içinde tutunur. Normal şartlarda floresan özellikte olmayan DCF, hücre içindeki ROS ile oksitlenerek floresan özellikteki DCF'ye dönüşür. Floresan DCF oluşumu, hücre içi ROS miktarının belirteci olmaktadır (84).

## **2.9. Wound Healing (Yara İyileşme) ile Hücre Göçünün Belirlenmesi**

Yara iyileşme deneyi, hücre hareketi sırasında hücreleri görselleştirme açısından sıklıkla kullanılan bir yaklaşımdır. Yöntem, bir bölgedeki hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması ve o bölgeye doğru hücre hareketinin indüklenmesi esasına dayanmaktadır. Kollektif hücre hareketinin hücresiz bölgeye doğru yönelimi mikroskopik olarak belirlenmektedir (85).

## **2.10. Western Blot Yöntemi ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

Western blot, protein ekspresyonlarının belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknikte, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülen örneklerin, hedef proteine özgü birincil ve ikincil antikorlar ile işaretlenmesi ve spektrofotometrik ölçümler ile protein absorbanslarının tespiti gerçekleştirilir. Protein etkileşimleri, protein ekspresyonundaki değişimler gibi çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (86).

## **2.11. Çalışmada Kullanılan Fotosensitizerlerin Sentezi**

Çalışmada kullanılan fotosensitizerlerin sentezi KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya AbD'de gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan piperazin çevreli silisyum ftalasiyaninlerin sentezi için başlangıç maddeleri olarak kullanılan 1-(2-furoil) piperazin (1) ve 2,3-dibromopropan-1-ol (2a) ticari olarak satın alındı. 5a, 5b, 6a ve 6b nolu bileşiklerin yapısında kullanılacak olan 3a ve 3b nolu bileşiklerin sentezi gerçekleştirildi. 3a nolu bileşiğin sentezi için N<sub>2</sub> gazıyla doldurulmuş reaksiyon ortamına, önce, belli miktar kuru asetonitrilde çözülmüş 2 mol amin

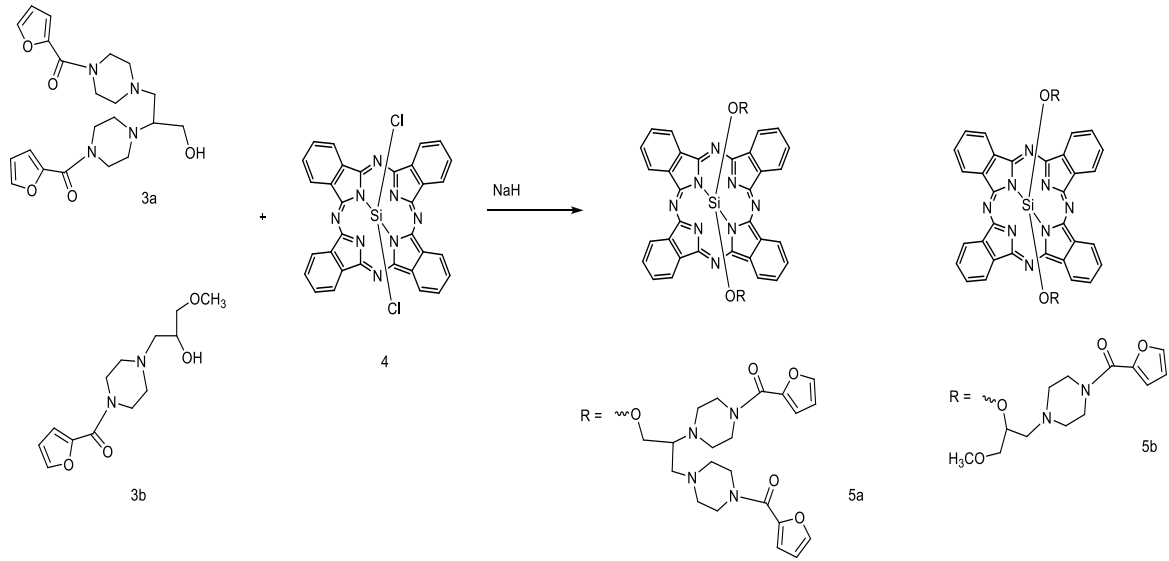
(1) ilave edildikten sonra, üzerine 2 mol kuru  $K_2CO_3$  ilave edildi ve oda sıcaklığında, yarım saat karıştırıldı. Bu süre sonunda, ortama belli miktar kuru asetonitrilde çözülmüş 1 mol (2a) nolu madde damla damla ilave edildi ve reaksiyon 3-5 gün kaynatıldı. Reaksiyonun gidişatı (süresi), TLC kontrollü olarak takip edildi ve buna göre, reaksiyon sonlandırıldı. 3b nolu bileşiğin sentezi için,  $N_2$  gazıyla doldurulmuş reaksiyon ortamına, önce belli miktar kuru asetonitrilde çözülmüş 1 mol amin (1) konduktan sonra, üzerine 2 mol kuru  $K_2CO_3$  ilave edilecek ve oda sıcaklığında yarım saat karıştırıldı. Bu süre sonunda, ortama belli miktar kuru asetonitrilde çözülmüş 1 mol (2b) nolu madde damla damla ilave edildi ve reaksiyon 3-5 gün kaynatıldı. Reaksiyonun gidişatı (süresi), TLC kontrollü olarak takip edildi ve buna göre, reaksiyon sonlandırıldı. Nihai moleküller (3a, 3b), saflaştırılarak (kristallendirme veya kolon/preparatif kromatografisi) uygun spektroskopik yöntemlerle (IR,  $^1H/^{13}C$ -NMR, kütle ve elementel analiz) yapısı aydınlatıldı (87).

#### **2.11.1. 5a ve 5b nolu Silisyum Ftalosiyanın Sentezi**

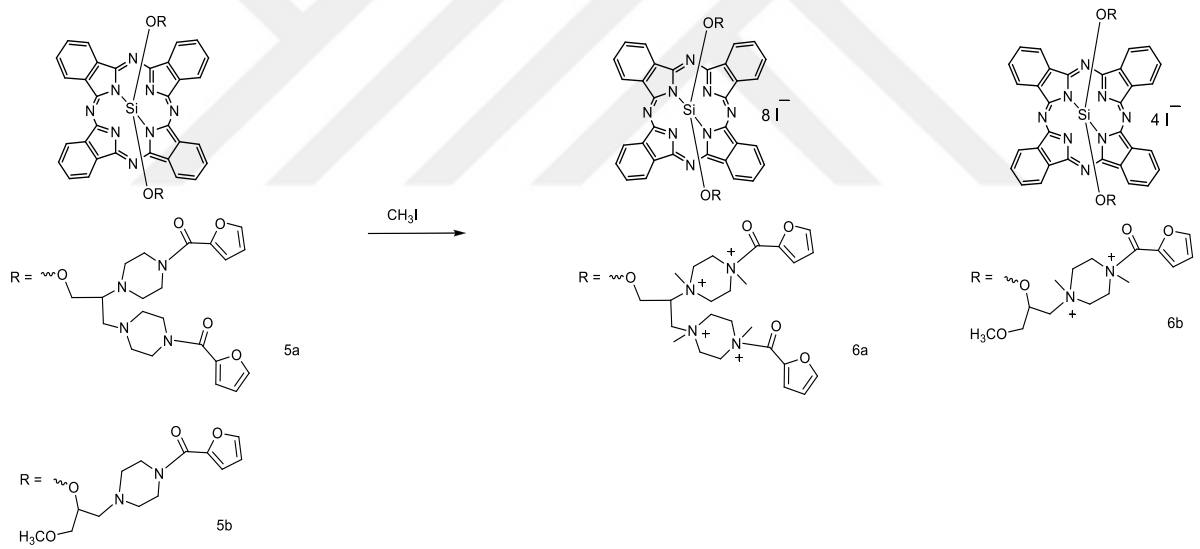
$N_2$  gazıyla doldurulmuş reaksiyon ortamında, kuru toluen içerisinde süspanse edilmiş, 1 mol 3a ya da 3b bileşiği ve 1.05 mol NaH (%60) oda sıcaklığında 15 dakika karıştırıldıktan sonra, üzerine 0.5 mol  $SiPcCl_2$  (4) ilave edildi ve reaksiyon 1-2 gün kaynatıldı. Reaksiyonun gidişatı (süresi), TLC kontrollü olarak takip edildi ve buna göre reaksiyon sonlandırıldı. Nihai moleküller (5a ve 5b), saflaştırılarak (kristallendirme veya kolon/preparatif kromatografisi) uygun spektroskopik yöntemlerle (IR,  $^1H$ -NMR, UV-vis, kütle ve elementel analiz) yapıları aydınlatıldı (Şekil 5) (87).

#### **2.11.2. Kuaterner Amonyum Formundaki 6a ve 6b nolu Silisyum Ftalosyanin Bileşiklerinin Sentezi**

Yaklaşık 30 mg 5a veya 5b bileşiği, 5 ml kuru kloroformda çözüldükten sonra, üzerine 2 ml  $CH_3I$  ilave edildi ve oda sıcaklığında, TLC kontrollü olarak reaksiyon sonlandırıldı. Bu tip reaksiyonlarda, genellikle nihai madde (6a ya da 6b) ortamda çökmektedir. Çöken madde, cam krozeden süzülerek, aseton ile yıkanıp kurutuldu. Yapısı, bilinen klasik spektral yöntemler (IR, UV-vis, kütle ve elementel analiz) yardımıyla aydınlatıldı (Şekil 6) (87).



**Şekil 5.** 5a ve 5b fotosensitizerlerinin moleküler yapısı



**Şekil 6.** Kuarterner amonyum formundaki 6a ve 6b fotosensitizerlerinin moleküler yapısı



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Hücre Hatları

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülen bu çalışmada, meme kanseri hücre hatları, MCF-7 (ATCC® HTB-22™) ve MDA-MB231 (ATCC® HTB-26™) ve normal meme hücre hattı MCF-10A (ATCC® CRL-10317™) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kanserli hücre hatları tez danışmanının hücre koleksiyonundan, normal meme hücre hattı ise Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Zühal Hamurcu'dan temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Kimyasallar

DMEM/F12	Gibco, 11320033
Horse serum	Thermo, 16050130
Fetal bovine serum	Gibco, 10500064
Hidrokortizon	Sigma, H 0888
İnsülin	Sigma, I9278
Klorotoksin	Sigma, C8052
İnsan epidermal büyüme faktörü (EGF)	Thermo, PHG0313
RPMI 1640, HEPES	Gibco, 52400-025
Penisilin/streptomisin	Gibco, 15140-122
H <sub>2</sub> DCFDA	Sigma, D6883
Metanol	Merck, 1.06009.2500
L-Glutamin	Biological Industries, 752353
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma, NIST200B
İzopropanol	Applichem, A3928,0500PE
Sodyum dodesil sülfat	Merck, 822050
Sodyum fosfat dibazik	Sigma Aldrich, S7907
Sodyum florür	Sigma Aldrich, S7920
Sodyum hidroksit	Merck, 1.064.621.000
Sodyum klorür	Merck, 1.06404.1000
Sodyum ortovanadat	Sigma Aldrich, S6508
Tripan mavisi	Sigma Aldrich, T8154

Trypsin-EDTA	Biological Industries, 741152
Tris-baz	Sigma Aldrich, T1503
TEMED	Applchem, A1148
Tween 20	J.T.Baker, 7374

### 3.1.3. Antikorlar

#### 3.1.3.1. Primer Antikorlar

Anti-PARP 1 rabbit monoclonal	Abcam, ab32138
Anti-Cleaved PARP1 rabbit monoclonal	Abcam, ab32561
Anti-kaspaz-3 rabbit monoclonal	Abcam, ab184787
Anti- $\beta$ aktin	Abcam, ab184220

#### 3.1.3.2. Sekonder Antikorlar

Anti-Rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045
Anti-Mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047

#### 3.1.4. Kitler, Markırlar

PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, 559763
Clarity TM Western ECL Substrate	BIORAD, 1705060
Prism Protein Ladder	Abcam, ab115832

#### 3.1.5. Cihazlar

Işık cihazı semikondüktör lazer	LumaCare LC 122, ABD
CO <sub>2</sub> 'li etüv	Heraeus, Almanya
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik, Türkiye
Buz makinesi	Scottman, İngiltere
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch, Türkiye
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo, ABD
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	BIORAD- ABD
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Mikroplate okuyucu spektrofotometre	Molecular Devices Versemex, ABD
BD Accuri C6 Plus	BD Biosciences, Kanada
Hassas terazi	Ahaus, ABD

Invert mikroskop	Nikon, Japonya
Lamin air flow hood	Heraeus, Almanya
Chemidoc MP görüntüleme sistemi	BIO-RAD, ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Mikrosantrifüj	Thermo I EC, ABD
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Otomatik pipet seti	Gilson, ABD
pH metre	Hanna, Portekiz
Pipet aid	Drummond Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804, Almanya
Su banyosu	Memmert, Almanya
Termocycler	GeneAmp 9700, ABI, ABD
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Vorteks	Labinco L-46, Hollanda
Sonikatör	Sonics-Vibracell vcx500, ABD
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya

### 3.1.6. Sarf Malzemeler

Pipet uçları (10, 200, 1000 µl)	Axygene, Almanya
Kültür flaskları (25 cm <sup>2</sup> T25 ve 75 cm <sup>2</sup> T75)	Greiner, Almanya
Mikrohacimli kapaklı tüpler (1.5 ml)	Greiner, Almanya
Pastör pipetleri	Isolab, Almanya
Whatmann kağıdı 3 MM	GE-Healthcares, 3030-861
Pleyt (6 ve 96 kuyucuklu)	Greiner, Almanya
Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 ml)	Greiner, Almanya
Thoma lamı	Marienfeld, Almanya
Falkon tüpler (15 ve 50 ml)	Greiner, Almanya
Enjektör (5 ve 10 ml)	Ayset, Türkiye

### **3.1.7. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri**

#### **3.1.7.1. Hücre Kültürü Besiyerleri**

##### **50 ml %10 FBS %1 Pen-Strep İçeren RPMI 1640 Besiyeri**

###### **Hazırlanışı:**

45.5 ml RPMI 1640 besiyeri içerisine 5 ml FBS ve 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

##### **MCF-10A Hücrelerinde Kullanılan Besiyeri İçeriği**

###### **Hazırlanışı:**

50 ml besiyeri için 46.410 ml DMEM/F12 besiyeri içerisine, 2.5 ml horse serum, 10 µl EGF (100 µg/ml stok), 25 µl hidrokortizon (1 mg/ml stok), 5 µl klorotoksin (1 mg/ml stok), 50 µl insülin, 0.5 ml pen-strep eklenerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

##### **EGF Human**

###### **Hazırlanışı:**

100 µg/ml stok hazırlamak için 1 ml PBS içerisinde 100 mg toz EGF çözülerek hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

##### **Hidrokortizon**

###### **Hazırlanışı:**

1 g toz halindeki hidrokortizondan 1 mg tartılıp 1 ml absolut alkolde çözüldü. Hazırlanan çözelti 19 ml besiyerine eklenerek 50 µg/ml hidrokortizon hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

##### **Klorotoksin**

###### **Hazırlanışı:**

Ticari olarak satın alınan liyofilize haldeki 1 mg klorotoksin 1 ml steril suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.7.2. Fotosensitizer Maddeler

Çalışmada kullanılan fotosensitizerlerin moleküler ağırlıklar ve miligramlar Tablo 2’de verildi.

**Tablo 2.** Fotosensitizerlerin (1mM/11ml) , moleküler ağırlıkları ve miligramları

<b>Kullanılan Molekül</b>	<b>Moleküler Ağırlık (g/mol)</b>	<b>mg</b>
5a	1371.534	15.0865
5b	1075.210	11.8272
6a	2507.046	27.577
6b	1642.966	18.0719

#### **5a Solüsyonu (Stok)**

##### **Hazırlanışı:**

1371.534 g/mol moleküler ağırlığa sahip 5a toz haldeki madde hassas terazide 15,0865 mg tartılarak 11 ml DMF’de çözüldü. Stok solüsyon 1 mM olacak şekilde hazırlandı ve karanlıkta, oda ısısında muhafaza edildi.

#### **5b Solüsyonu (Stok)**

##### **Hazırlanışı:**

1075.210 g/mol moleküler ağırlığa sahip 5b toz haldeki madde hassas terazide 11.8272 mg tartılarak 11 ml DMF’de çözüldü. Stok solüsyon 1 mM olacak şekilde hazırlandı ve karanlıkta, oda ısısında muhafaza edildi.

#### **6a Solüsyonu (Stok)**

##### **Hazırlanışı:**

2507.046 g/mol moleküler ağırlığa sahip 6a toz haldeki madde hassas terazide 27.577 mg tartılarak 11 ml DMF’de çözüldü. Stok solüsyon 1 mM olacak şekilde hazırlandı ve karanlıkta, oda ısısında muhafaza edildi.

## **6b Solüsyonu (Stok)**

### **Hazırlanışı:**

1642.966 g/mol moleküler ağırlığa sahip 6b toz haldeki madde hassas terazide 18.0719 mg tartılarak 11 ml DMF’de çözüldü. Stok solüsyon 1 mM olacak şekilde hazırlandı ve karanlıkta, oda ısısında muhafaza edildi.

## **3.1.7.3. Hücre Canlılık Analizi Solüsyonları**

### **MTT Solüsyonu**

#### **Hazırlanışı:**

Ticari olarak temin edilen toz haldeki MTT den 0.1 g tartılıp 20 ml PBS’te çözüldü. Filtre edildi ve 1 ml ependorflara alikot yapıldı. -20° C’de karanlıkta muhafaza edildi.

## **3.1.7.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Solüsyonları**

### **Akridin Oranj Solüsyonu (Stok)**

#### **Hazırlanışı:**

5 mg akridin oranj, 1 ml PBS içerisinde çözümlenerek stok solüsyon hazırlandı.

### **Etidyum Bromür Solüsyonu (Stok)**

#### **Hazırlanışı:**

3 mg etidyum bromür, 1 ml PBS içerisinde çözümlenerek stok solüsyon hazırlandı.

## **Akridin Oranj/Etidyum Bromür Çalışma Solüsyonu**

#### **Hazırlanışı:**

AO/EB stok solüsyonlarından 1’er µl alınarak, 1 ml PBS içerisine eklendi ve çalışma solüsyonu hazırlandı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

## **3.1.7.5. H<sub>2</sub>DCFDA solüsyonu (stok)**

#### **Hazırlanışı:**

Ticari olarak satın alınan toz halindeki H<sub>2</sub>DCFDA boyasının molekül ağırlığı 487.29 g/mol olacak şekilde toz madde 5.8 mg tartılıp 3000 µl DMSO da çözüldü. 4000 µM olacak şekilde stok hazırlandı ve +4 ° C’de muhafaza edildi.

### **3.1.7.6. Western Blot Solüsyonları**

#### **Ayrırma Jel Tamponu (1.5 M, Tris-HCl pH 8.8)**

##### **Hazırlanışı:**

36.33 g tris (Ma: 121.14 g/mol) 180 ml deiyonize suda çözülerek, HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### **Yükleme Jel Tamponu (0.5 M, Tris-HCl pH 6.8)**

##### **Hazırlanışı:**

6.057 g tris 90 ml deiyonize su içerisinde çözülerek, HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve toplam hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### **%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

##### **Hazırlanışı:**

10 g SDS (Ma: 288.372 g/mol) 100 ml deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### **Tris Glisin Tamponu (10X)**

##### **Hazırlanışı:**

30.3 g tris ve 144 g glisin (Ma: 75.07 g/mol), 1 litre deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### **SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1X)**

##### **Hazırlanışı:**

10X tris glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi ve 10 ml %10'luk SDS ilave edilerek son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

#### **SDS-PAGE Transfer Tamponu (10X)**

##### **Hazırlanışı:**

10X tris glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi ve 200 ml metanol ilave edilerek son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

### **Amonyum Persulfat (%10 APS)**

#### **Hazırlanışı:**

100 mg APS (Ma: 228.18 g/mol), 1 ml deiyonize suda çözülerek +4°C'de muhafaza edildi.

### **SDS-PAGE Yükleme Tamponu**

#### **Hazırlanışı:**

Toplam hacim 10 ml olacak şekilde 0.25 M tris-HCl pH 6.8, %10 SDS, %50 Gliserol, %0.01 Bromofenolmavisi hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi. Kullanımdan önce son konsantrasyonu 0.5 M olmak üzere DTT eklendi.

### **Fosfat Buffer Saline (PBS), 10X Stok, pH:7.4**

#### **Hazırlanışı:**

1 litre distile su içerisinde, 2 g 2.7 mM KCL (Ma: 74.56 g/mol), 80 g 1.37 M NaCl (Ma: 58.44 g/mol), 2 g 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Ma: 136.09 g/mol), 11 g 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Ma: 141.96 g/mol) hazırlanarak 1N HCl ile pH: 7.4'e ayarlandı.

### **10X TBS Stoğu**

#### **Hazırlanışı:**

800 ml distile su içerisinde 24g tris HCL, 5.6 g tris-baz, 88 g NaCl (Mw: 58.44 g/mol) hazırlandı ve pH 1N HCl ile 7.6'ya ayarlandı.

### **1X TBST**

#### **Hazırlanışı:**

10X TBS'ten 50 ml alınarak 450 ml dH<sub>2</sub>O ile 1X TBS hazırlandı. %20'lik Tween 20 solüsyonundan son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

### **PBS, %0.05 Tween 20**

#### **Hazırlanışı:**

10X PBS stoğundan 10 ml ve %20'lik Tween 20 solüsyonundan 250 µl alınarak son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.



## **%20 Triton-X 100**

### **Hazırlanışı:**

10 ml Triton-X 100 deterjanının üzerine 40 ml deiyonize su eklenerek son hacim 50 ml'ye tamamlandı. Triton-X 100'ün tamamının çözülebilmesi için çözelti bir müddet ısıtıldı ve ardından +4°C'de muhafaza edildi.

## **RIPA Hücre Patlatma Tamponu (10X Stok)**

### **Hazırlanışı:**

Son konsantrasyonları, 150 mM sodyum klorür, 1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl pH:8.0, %1 triton-X 100, %0.5 sodyum deoksikolat ve %0.1 SDS olacak şekilde solüsyonlar ilave edildi ve son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

## **RIPA Hücre Patlatma Tamponu (1X)**

### **Hazırlanışı:**

Son konsantrasyonları 1X RIPA, 1X PI, 1X NaPPi, 10X NaVan, 5X NaF ve 20X PMSF olacak şekilde solüsyonlar ilave edildi ve deiyonize su ile son hacim 1 ml'ye tamamlandı.

## **Proteaz İnhibitör Kokteyli**

### **Hazırlanışı:**

1 adet Complete Mini Tablet (Roche), 1 ml çift distile su içinde çözüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

## **Fosfataz İnhibitörleri**

### **20X Sodyum Pirifosfat (NaPPi-100 mM)**

#### **Hazırlanışı:**

4.44 g NaPPi, 100 ml çift distile suda çözüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

### **100X Sodyum Ortovanadat (NaVan-200 mM)**

#### **Hazırlanışı:**

3.68 g Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 90 ml çift distile su içerisinde çözüldü. 1 N NaOH kullanılarak pH 10.0'a ayarlandı ve sarı renkli solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına

gelene kadar beklendikten sonra pH tekrar ölçülerek 10.0'a ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

### **50X Sodyum Florür (NaF-1 mM)**

#### **Hazırlanışı:**

4.2 g NaF, 100 ml çift distile su içerisinde çözüldü ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

### **100X PMSF (100 mM)**

#### **Hazırlanışı:**

0.174 g PMSF, 10 ml etil alkol içerisinde sulandırıldı ve alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi**

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri %10 FBS ve %1 pen-strep içeren RPMI 1640 besiyeri ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edildi.

MCF-10A normal meme hücreleri, %5 horse serum, 20 ng/ml EGF, 0.5 ng/ml hidrokortizon, 100 ng/ml klorotoksin, 10 µg/ml insülin, %1 pen-strep içeren DMEM/F12 besiyeri ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edildi.

Hücreler mikroskopik olarak kontrol edilip yoğunlukları gözlemlendi. Flaskta %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi, flaskta tutanan hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri dökülerek flask 5ml PBS ile yıkandı. Hücreleri tutundukları yüzeyden uzaklaştırabilmek için, yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA solüsyonu (T75 flask için ortalama 2 ml) hücreler üzerine eklenerek 37°C'de 3-4 dakika (dk) inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılması invert mikroskopta kontrol edildi ve tripsini durdurmak için ortama %10 FBS içeren besiyeri ilave edildi. Flasklardan toplanan hücreler 15 ml falkon tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüjle çöktürüldü ve besiyeri ile tekrar süspansiyon edilerek yeni flasklara aktarıldı. Pasajlama işlemi tamamlanan hücreler, 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edildi.

### 3.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi

Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi çalışmalarda kullanılacak hücre sayısının ayarlanması, PDT uygulanan hücrelerin canlılık deneyleri öncesi inkübasyonları gibi etmenleri belirlemek açısından oldukça önemlidir. Bu ve benzeri durumlar için hücrelerin ikilenme zamanları belirlendi. İkilenme zamanını belirlemede izlenen yol belli sayıda hücre ekimi ve hücrelerin günlük sayımı ile yapıldı.

#### 3.2.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

Hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenmesi için öncelikle hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Hücre süspansiyonundan ve tripan mavisinden 1:1 oranında alınıp bir endorf tüp içinde pipetaj ile karıştırıldı. Thoma lamına lamel yerleştirildi ve hücre boya karışımı kareler içeren bölgeye yayıldı. İnvert mikroskop altında inceleme yapıldı. Parlak görünen hücreler canlı; mavi boya almış olan hücreler ise ölü hücre olarak değerlendirildi.

Thoma lamında sayım yapıldıktan sonra total canlı hücre sayısı “(Hücre sayısı/2) × dilüsyon faktörü x 10<sup>4</sup> x süspansiyon hacmi” formülü ile hesaplandı.

#### 3.2.2.2. İkilenme Zamanının Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri ayrı ayrı sayıldı ve hücre sayısı formülü ile hesaplandı. Her bir hücre hattı için 24, 48, 72 ve 96. saatler için 4 adet T75 flask hazırlandı. Sayısı belirlenen hücreler flaska ekildi ve 0. saat olarak kabul edildi. Diğer saatler için hücreler tripsinize edildi ve tekrar sayıldı. 96. saat flaskındaki hücrelerde sayıldıktan sonra hücre sayıları ve sayıldıkları saatler kullanılarak büyüme eğrileri çizildi ve ikilenme zamanları bu eğriye göre belirlendi.

#### 3.2.3. Fotodinamik Terapi Yöntemi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri deneye bağlı olarak 96 kuyucuklu pleytlere 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde veya 6 kuyucuklu pleytlere ortalama 4x10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde ekilip 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile yıkandı. Farklı dozlarda piperazin çevreli silisyum ftalosyanin içeren besiyeri;

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

(M1=stoğun mikromoları, V1=alınacak miktar, M2=istenilen mikromolar, V2=istenilen miktar) “Eşitlik 1” denklemi kullanılarak ayarlandı.

İstenilen dozlarda fotosensitizerler ile hücreler muamele ettirildi ve 4 saat süreyle 37°C'de karanlıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Bu prosedürleri takiben, ışık verilecek pleytin 4 kenarına ve ortasına düşen ışık miktarı sensör ile ölçüldükten sonra, istenilen ışık dozu istenilen  $J = W \times s$  formülü ile süre bulunarak PDT uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler semikondüktör lazer (LumaCare LC 122) aracılığı ile her bir saat için 10 j/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda 680 nm dalga boyuna sahip kırmızı LED ışığa maruz bırakıldı. Bunun ardından yaklaşık 18 saat 37°C'de karanlık ortamda etüvde inkübe edildi.

#### **3.2.4. MTT Yöntemi**

Fotosensitizer muamelesi sonrası bir gecelik inkübasyonun ardından hem ışığa maruz bırakılan hem de karanlıkta tutulan kontrol hücre pleytlerinin her kuyucuğuna 10 µl MTT boyası eklendi ve pleytler 37°C'de yaklaşık 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl DMSO ilave edilerek pleytler etüvde 30 dk inkübe edildi. Sarı renkli tetrazolium tuzlarının, yalnızca canlı hücrelerde mor renkli formazan kristallerine dönüşmesiyle oluşan mor renk şiddetinin absorbansı, 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

#### **3.2.5. Akridin Oranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) Boyama**

6 kuyucuklu pleytlerde bulunan PDT uygulanmış ve kontrol grubu hücreleri PBS ile yıkandı ve tripsinize edildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pellette bulunan hücreler 1 ml PBS ile süspanse edildi. Alkolle temizlenmiş lamların üzerinde 10 µl boya çözeltisi ve 10 µl hücre süspanسیونu karıştırılarak floresan mikroskopta analiz edildi. Nükleusu yeşil boyanan hücreler canlı olarak değerlendirildi. Nükleusu turuncu boyanan ve apoptotik morfolojiye özgü sitoplazmik baloncukların gözlemlendiği hücreler apoptotik ve nükleusu tamamen turuncu ve/veya kırmızı boyanan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirildi.

#### **3.2.6. Annexin V/7AAD İşaretleme Yöntemi ile Apoptoz Tayini**

6 kuyucuklu pleytlere ekilen ve PDT işlemine maruz bırakılan 5a, 5b, 6a ve 6b muameleli, muamelesiz ve karanlık kontrol şeklinde hazırlanan MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki apoptotik değişimi flow sitometrik olarak göstermek için annexin V/ 7AAD işaretleme yapıldı. Hücreler PDT'den sonra 1 gece 37°C etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler tripsinize edilip 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Yıkamalardan sonra 1200

rpm 5 dk santrifüj tekrarlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra annexinV kitinde bulunan 10X binding buffer steril su ile 1X hale getirildi. Hücre pelleti 1X binding bufferda süspanse edildikten sonra her örnek için hazırlanan ependorflara 100 µl örnek alındı. Ependorflara alınan hücrelere 2 µl annexin 2 µl 7AAD boyası eklenip pipetaj yapıldı. Boya eklenen hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında hücreler 15 dk inkübe edildikten sonra flow sitometri cihazından analiz gerçekleştirildi.

### **3.2.7. Hücre İçinde Oluşan ROS Miktarının Tayini**

Lamellerin yıkanması: 24x24 mm lameller önce musluk suyundan geçirilip sonra yüzeylerini otoklavlanmış distile su kaplayacak şekilde 1 gece inkübe edildi. Su boşaltıldıktan sonra lameller 0.1N HCl ile 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. 1 saatin sonunda HCl döküldü ve lameller 4 kez distile su ile yıkandıktan sonra bir kere daha su koyulup 1 saat çalkalanarak yıkama yapıldı. Su tekrar uzaklaştırılıp %70 alkol ile son yıkama gerçekleştirildi. Lameller steril kabine koyuldu ve kuruyana kadar bekletildi. Yüzeyine parafilm serilmiş geniş pleylere yerleştirildi. Bu şekilde 2-3 saat UV ışığına maruz bırakıldı.

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri tripsinize edildi. 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülüp pellet 5 ml besiyeri ile resüspanse edildi. 20 µl hücredeki hücre miktarı sayıldı. Yıkanan lameller 6 kuyucuklu pleyt içerisine yerleştirildi. 2 ml besiyerinde 450 000 hücre/kuyu olacak şekilde kuyulara ekildi. Hücrelere fotosensitizer muamelesi ve ışık uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler 1 gece etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hazırlanmış stok H<sub>2</sub>DCFDA boyasından PBS içerisinde 4 µM olacak şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı. Hücrelerden besiyeri pipetaj ile uzaklaştırıldı. 3 kere PBS ile yıkandı. 1 ml ROS boyası içeren PBS hücrelere eklendi. 30 dakika 37°C'de karanlıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS uzaklaştırılıp taze PBS ile 3 kez yıkandı. Lameller alkol ile yıkanış lam üzerine yerleştirildi. Floresan mikroskopta 490-520 nm dalga boyu ışıkta görüntüleme yapıldı.

### **3.2.8. Wound Healing (Yara İyileşme) Yöntemi ile Hücre Hareketinin Belirlenmesi**

MCF-7 ve MDA-MB-231 metastatik hücre hatlarında SiPc'lerin metastaza etkilerini incelemek için yara iyileşme deneyi gerçekleştirildi. Deneyde 70 bin hücre/ml ışığa maruz bırakıldı ve karanlık kontrol grubu olacak şekilde 24 kuyucuklu pleylere ekildi. %80 yoğunluğa ulaşan hücreler etkin dozdaki fotosensitizerler uygulanarak 4 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 10 j/cm<sup>2</sup> ışığa maruz bırakıldılar. Karanlık kontrol grubu hücreleri ve ışık alan hücrelerde 200 µl pipet ucuyla düz bir çizik oluşturuldu. Çizik oluşturulduktan

sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Ortama serumsuz besiyeri eklenerek 0. saat görüntüleri invert mikroskopta fotoğraflandı. Etüve kaldırılan hücreler 24, 48 ve 72. saatte tekrar fotoğraflandırılarak göç etme oranları ImageJ programı ile belirlendi. Belirlenen değerler doğrultusunda, yaranın iyileşme yüzdeleri Microsoft Excel programında;

Yara iyileşme (%) =  $[1 - (24. saatteki çizimin açıklığı) / (0. saatteki çizimin açıklığı)] \times 100\%$  formülüyle hesaplandı (88, 89).

### 3.2.9. Western Blot Yöntemi

#### 3.2.9.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu

6 kuyucuklu pleytlere ekilen muamelesiz, muameleli, karanlık ve ışık uygulanmış hücreler tripsinize edilerek ependorflara toplandı. 2 kez soğuk PBS ile yıkandı ve 4°C soğutmalı santrifüjde 1200 rpm hızda 5 dk santrifüj ettirildi süpernatant pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan RIPA patlatma tamponu (Tablo 3) hücre pelletine 200 µl eklendi ve pipetaj yapıldı. Ependorflar buz içerisine yerleştirilerek 30 dk orbital çalkalayıcıda sallandı. 30 dk sonra sonikatörde hücreler 5 s uygulama 25 s ara vermek üzere 5 kere sonike edildi. İşlem tamamlandıktan sonra soğutmalı santrifüjde maksimum hızda 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant hazırlanan yeni tüplere aktarıldı. Hazırlanan örnekler -20°C de muhafaza edildi.

**Tablo 3.** RIPA patlatma tamponunun içeriği

İçerik	Konstantrasyon (mM /X)	Son konsantrasyon	Karışımın içeriği
RIPA buffer	10X	1X	0.400 ml
EDTA	500 mM	2 mM	0.016 ml
PI wo 10 mM EDTA	10X	1X	0.400 ml
NaPPi	10X	1X	0.400 ml
NaF	50X	1X	0.080 ml
NaVan	100X	1X	0.040 ml
PMSF	100X	1X	0.040 ml
ddH <sub>2</sub> O			2.624 ml
<b>Toplam</b>			<b>4 ml</b>

### 3.2.9.2. BCA Kiti ile Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Protein lizatının konsantrasyonunun ölçülmesi için BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti kullanıldı. Firmanın önerdiği şekilde ölçüm yapıldı. İlk olarak konsantrasyonu bilinen BSA (2 mg/ml) standartından 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml'lik dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan standart ile konsantrasyonu ölçülecek protein lizatından 96 kuyucuklu pleyte 25 µl/kuyucuk olacak şekilde koyuldu. Kite bulunan solüsyon A'dan 50 kat ve solüsyon B'den 1 kat eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan protein lizatı ve BSA standartı bulunan kuyulara 200 µl eklendi. Yeşil renk olan çalışma solüsyonu protein yoğunluğu ile mor renge dönüştü. Bu renk değişimi 562 nm dalga boyunda pleyt okuyucuda ölçüldü. Standart kullanılarak OD değeri ve protein konsantrasyonuna dayalı standart eğrisi Excel programında oluşturuldu. Protein konsantrasyonları bu standart eğri kullanılarak hesaplandı.

### 3.2.9.3. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

#### Ayrırma Jeli

Protein düzeyinde incelenecek apoptotik belirteç proteinleri olan 35 kDa moleküler ağırlığındaki kaspaz-3, 89 kD moleküler ağırlığındaki PARP1 ve 116 kD moleküler ağırlığındaki kesilmiş PARP1 proteinlerinin moleküler ağırlıklarına göre %10 ve %7.5 konsantrasyonlarda jeller hazırlandı. Jel hazırlanmada kullanılan kısa ve uzun camlar temizlenip jel hazırlama standına yerleştirildi. Tablo 4'deki ajanlar ve miktarları ile birlikte jeller hazırlandı. Hazırlanan jel dikey şekilde yerleştirilmiş camlara dökülerek kalan kısmı dolduracak kadar izopropanol ile hava teması engellendi.

**Tablo 4.** %10'luk ve %7.5'luk ayırma jelinin içeriği

İçerik	%10 (1 mm)	%7.5
ddH <sub>2</sub> O	2.43 ml	2.73 ml
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	1.25 ml	0.94 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml
%10 SDS	0.05 ml	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	5 µl	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>

## Yükleme Jeli

45 dk sonra ayırma jelinin polimerleştiği kontrol edildi ve polimerleşen jelden izopropanol uzaklaştırılarak distile su ile temizlendi. Yükleme jeli Tablo 5’de belirtilen ajanlar ile hazırlanarak ayırma jelinin üstündeki boluğa döküldü. Camlar arası 1 cm boşluğa uygun 15 kuyucuklu taraklar yükleme jeli döküldükten sonra camlar arasına tam oturacak şekilde yerleştirildi. 45 dk polimerleşme için beklendi.

**Tablo 5.** %5’lik yükleme jeli içeriği

İçerik	%5, 1X (1mm)
ddH <sub>2</sub> O	3.14 ml
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.50 ml
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
TEMED	3 µl
<b>Toplam</b>	<b>5 ml</b>

### 3.2.9.4. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Hazırlanan örnekler 5X yükleme boyası ilave edilerek son hacim 1X olacak şekilde 20 µl boya 5 µl örnek yeni tüplere koyuldu. Boya ihtiva eden yeni tüpler 95°C de 6 dk kaynatıldı. Önceden hazırlanmış 15 kuyucuklu %10’luk ve %5’lik jellere belirlenen hacimlerde yükleme yapıldı. Yürütme bufferı içine yerleştirilen protein yüklü jeller önce 75 voltta 15 dk, sonra 100 voltta 60-90 dk yürütüldü.

### 3.2.9.5. Islak Blotlama

Yürütülme işlemi biten SDS-PAGE jellerinin görüntüleme için PVDF (Poli-viniliden florür) membrana sandviç modeli oluşturularak aktarımı gerçekleştirildi. Bu amaçla 2 adet sünger yatak, 4 adet whatman kağıdı transfer mebranında ıslatıldı. PVDF membran önce metanolde sonra transfer tamponunda ıslatıldı. 2 cam arasında bulunan jel bir spatula yardımı ile ayrılıp düz yüzey yukarda kalacak şekilde ıslatılmış whatman kağıdına koyuldu. Blotlama kasedi üzerine yerleştirilmiş 1 sünger yatak ve 2 whatman kağıdı üzerine yerleştirilen jelin üstüne hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek PVDF membran



yerleştirildi. Tekrar transfer tamponu ile ıslatılarak üst tarafada 2 adet whatman 1 adet sünger yerleştirilip sandviç modeli oluşturuldu. Blotlama kasedi, anot siyah tarafta ve katot kırmızı tarafta olacak şekilde transfer tamponu içeren tanka yerleştirildi. Tank buz haznesi içerisinde ve magnetik karıştırıcı bulunduracak şekilde hazırlandı. Transfer +4°C’de 100 voltta bir saat yapıldı. Blotlama işlemi gerçekleştikten sonra membran TBST ile yıkandı. Bloklama için %5 süt tozu/TBST ile 1 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

3 adet primer antikor ve uygun sekonder antikor ürün katoloğundaki bilgiler doğrultusunda dilüsyonlar hazırlandı. Bloklama işlemi tamamlanandıktan sonra proteinlerin immünoblot işlemlerinde membranlar hazırlanan primer antikorlar ile 1 saat yıkandıktan sonra yarım saat TBST ile yıkandı. Aynı işlem sekonder antikorlarda gerçekleştirildi. Yıkamalar tamamlandıktan sonra membranlar üzerine Clarity™ Western ECL Substrate eklendi ve ChemiDoc MP görüntüleme sisteminde görüntülendi.

### **3.2.10. İstatistiksel Analizler**

Çalışmadaki deneylerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism programı ile yapıldı. Programda her grup için p değeri, t test (nonparametric test) ile hesaplandı ve 0.05’ten küçük olan istatistiksel değeri anlamlı, 0.05’ten büyük olanlar ise anlamsız olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, piperazin çevreli SiPc'nin 680 nm dalga boyundaki ışık ile etkileşimi sonucu meme kanseri hücre hatlarında ROS oluşumu ve bunu takiben hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi amaçlanmıştır. Yeni sentezlenmiş SiPc'lerin normal meme hücrelerini etkilemeden kanser hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin incelendiği bu çalışmada, karanlık kontrol grubu (SiPc ile muamele edilen ve ışığa maruz bırakılmayan), muamelesiz grup (SiPc ile muamele edilmeyen ve ışığa maruz bırakılan), muameleli grup (SiPc ile muamele edilen ve 680 nm dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan) ve hiçbir uygulama yapılmayan hücre grupları olmak üzere dört farklı çalışma grubu kullanıldı. SiPc'lerin etkin doz değerleri, MTT canlılık testiyle belirlendi. Belirlenen etkin dozlardaki SiPc moleküllerinin, 680 nm dalga boyunda ve  $10\text{j}/\text{cm}^2$  enerji yoğunluğundaki ışık varlığında hücrelere uygulanmasının ardından apoptotik hücre yüzdeleri Annexin V/7AAD testi ile belirlendi. Hücrelerde oluşan ROS, H<sub>2</sub>DCFDA boyası ile floresan mikroskopta tespit edildi. PDT'nin hücre hareketi üzerindeki etkisi, metastatik hücre hatları olan MDA-MB-231 ile MCF-7 hücrelerinde ve kontrol olarak kullanılan MCF-10A normal meme hücrelerinde wound healing (yara iyileşme) yöntemiyle incelendi. Çalışmada ayrıca pro-apoptotik bir protein olan kaspaz-3 ile apoptoz indikatörü PARP1 ve kesilmiş PARP1 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim western blot yöntemiyle incelendi.

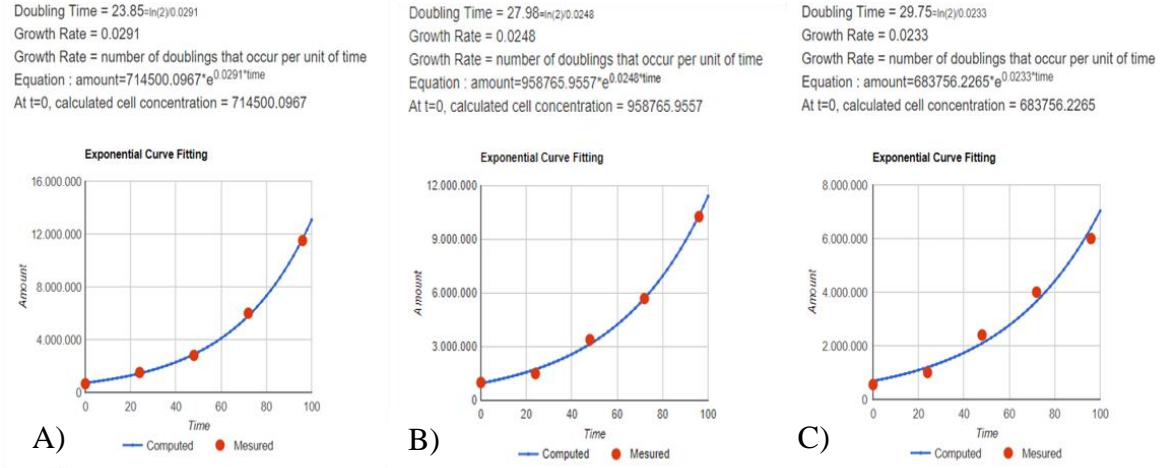
### 4.1. Hücrelerin Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri

Çalışmada, meme kanseri özelliği taşıyan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan MCF-10A normal meme hücre hattı olmak üzere üç farklı hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hatları epitel kökenli olup adheren hücre özelliği göstermektedir.

### 4.2. Hücre Kültürü

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan MCF-10A normal meme hücre hattı, ATCC tarafından önerilen besiyerleri ile kültüre edildi. Hücrelerin yoğunluk ve canlılıkları her gün mikroskopik olarak kontrol edildi. Flask yüzeyinde yoğunlaşmanın yaklaşık %70-80 düzeyine ulaştığı durumlarda hücreler yıkanıp tripsinize edilerek pasajlandı. Çalışmaya, hücrelerin büyüme karakteristiklerini belirlemek için sayılarını iki katına çıkardıkları zamanın (doubling time) tespiti ile başlandı. Hücrelerin ikilenme zamanlarının tespiti için 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücre sayımı yapılarak büyüme eğrileri çizildi. İkilenme zamanları, MCF-10A hücre hattında; 23.85 saat, MCF-7

hücre hattında; 27.98 saat ve MDA-MB-231 hücre hattında; 29.75 saat olarak belirlendi (Resim 1).



**Resim 1.** Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri. A) MCF-10A, B) MCF-7, C) MDA-MB-231

### 4.3. Canlılık Analizleri

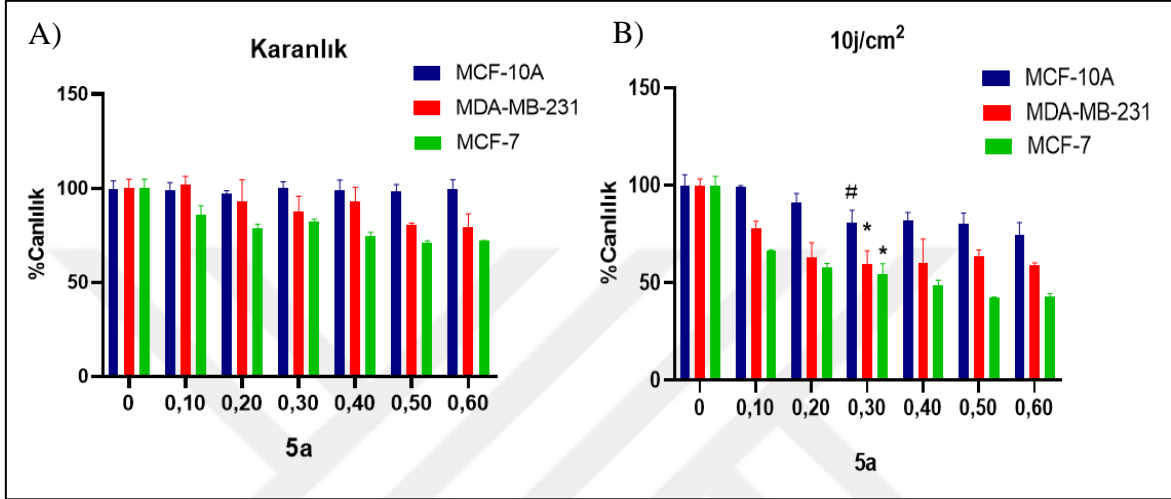
#### 4.3.1. Piperazin Çevreli Silisyum Ftalosiyanınların Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

##### 4.3.1.1. 5a ve 5b'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

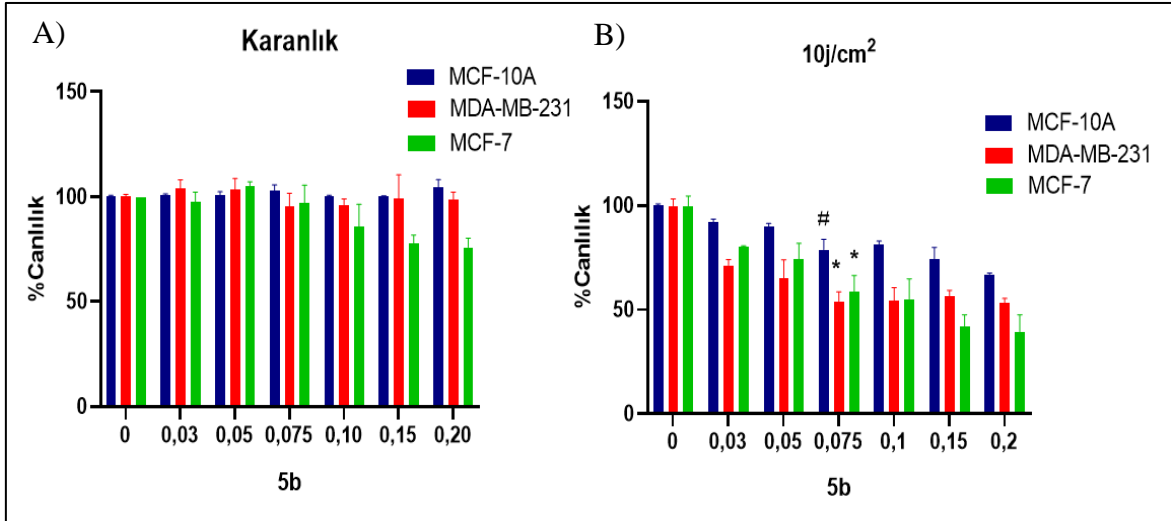
5a ve 5b fotosensitizer bileşiklerinin, MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin tespiti MTT hücre canlılık testi ile gerçekleştirildi. 5a için 0.10-0.60  $\mu\text{M}$ , 5b için ise 0.03-0.20  $\mu\text{M}$  arasında değişen dozlar kullanıldı. PDT uygulamalarında, 10  $\text{j}/\text{cm}^2$  enerji yoğunluğunda ve 680 nm dalga boyunda ışık kullanıldı. Kullanılan üç hücre hattında da, 5a ve 5b muamelesi yapıldı fakat ışığa maruz bırakılmayan karanlık kontrol gruplarında yüksek oranlarda (%95) canlılık görüldü (Resim 2-3).

5a maddesinin etkin dozu olarak belirlenen 0.30  $\mu\text{M}$  dozu uygulandığında, MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarındaki canlılık yüzdeleri sırasıyla %80.9, %59.4 ve %54.5 olarak belirlenmiştir. 5a muamelesi yapılan fakat ışık uygulanmayan karanlık kontroller ve 5a muamelesi yapılmayıp sadece ışık uygulanmış kontrol hücrelerinde ise genel olarak ortalama %95 canlılık verileri elde edilmiştir (Resim 2).

5b maddesinin etkin dozu ise 0.075  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiş ve bu dozun ışık eşliğinde uygulandığı MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında belirlenen canlılık yüzdeleri sırasıyla %80, %54 ve %58.6 olarak bulunmuştur. 5b muamelesi yapılan fakat ışık uygulanmayan karanlık kontroller ile 5b muamelesi yapılmayıp sadece ışık uygulanmış kontrol hücrelerinde ise ortalama %95 canlılık verileri elde edilmiştir (Resim 3).



**Resim 2.** Farklı dozlardaki 5a bileşiğinin hücre canlılığına etkisi. A) Karanlık kontrol grubu hücreleri, B) PDT grubu hücreleri, # $p < 0.05$ , \* $p < 0.001$

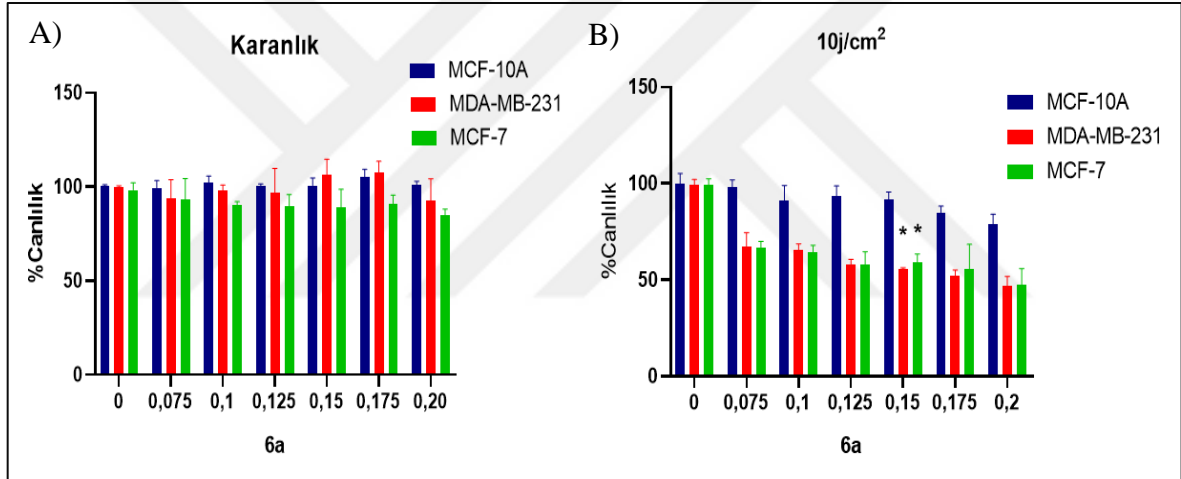


**Resim 3.** Farklı dozlardaki 5b bileşiğinin hücre canlılığına etkisi. A) Karanlık kontrol grubu hücreleri, B) PDT grubu hücreleri, # $p < 0.05$ , \* $p < 0.001$

#### 4.3.1.2. 6a ve 6b'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

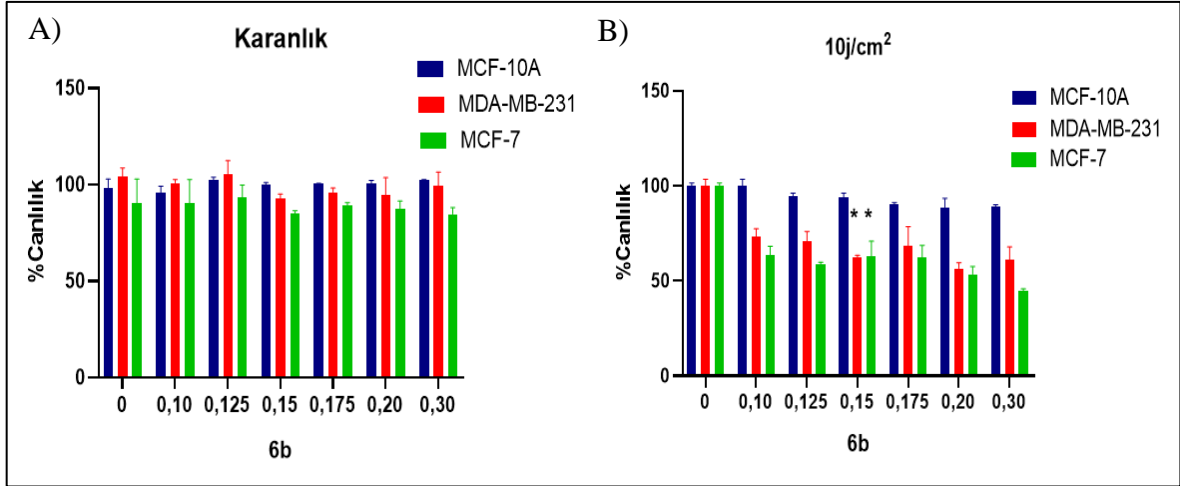
6a ve 6b fotosensitizerlerinin, MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin tespiti MTT hücre canlılık testi ile gerçekleştirildi. 6a ve 6b maddesi için 0.075- 0.20  $\mu\text{M}$  arası değişen dozlar kullanıldı. PDT uygulamalarında, 10  $\text{j}/\text{cm}^2$  enerji yoğunluğunda ve 680 nm dalga boyunda ışık kullanıldı.

6a maddesi için 0.15  $\mu\text{M}$  etkin doz fotosensitizer uygulandığında MCF-10A hücre hattında %91.6 canlılık belirlenirken, MDA-MB-231 hücre hattında %55.5, MCF-7 hücre hattında %57.6 canlılık belirlenmiştir. Karanlık kontroller, muamelesiz hücreler ve sadece ışık uygulanmış hücrelerde canlılık ortalama %95 canlılık sonuçları elde edilmiştir (Resim 4).



**Resim 4.** Farklı dozlardaki 6a bileşiğinin hücre canlılığına etkisi. A) Karanlık kontrol grubu hücreleri, B) PDT grubu hücreleri, \*p<0.001

6b maddesi için belirlenen etkin doz olan 0.15  $\mu\text{M}$  fotosensitizer ile hücreler muamele ettirilerek PDT gerçekleştirilmiştir. MTT sonucu, MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında PDT sonrası canlılık yüzdeleri sırasıyla %93.8, %61.6 ve %58.6 olarak belirlenmiştir. Karanlık kontroller, muamelesiz hücreler ve sadece ışık uygulanmış hücrelerde canlılık ortalama %95 sonuçlar vermiştir (Resim 5).

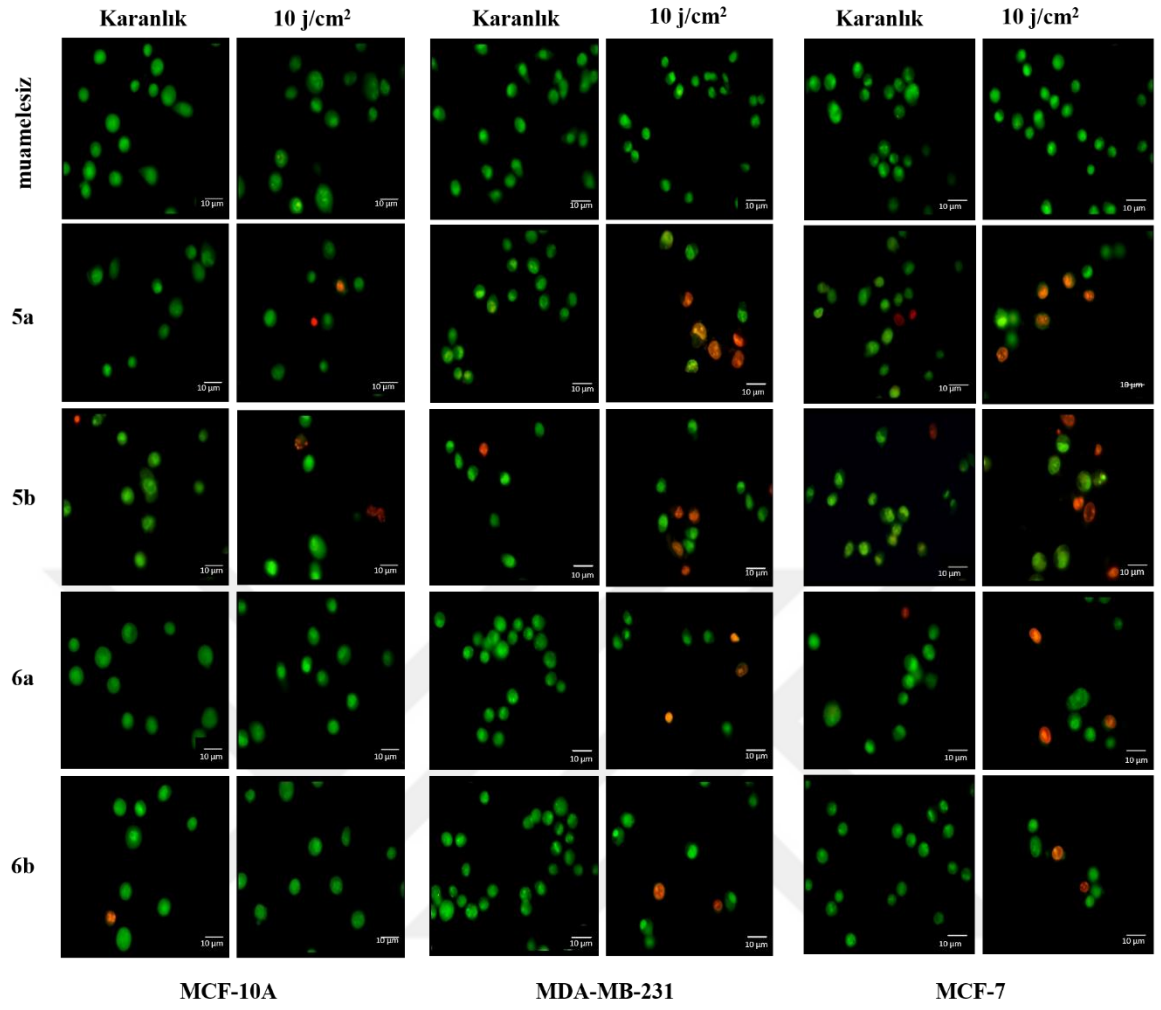


**Resim 5.** Farklı dozlardaki 6b bileşiğinin hücre canlılığına etkisi. A) Karanlık kontrol grubu hücreleri, B) PDT grubu hücreleri, \*p<0.001

#### 4.4. Apoptotik analizler

##### 4.4.1. AO/EB boyama ile PDT'nin apoptozu indüklediğinin belirlenmesi

6 kuyucuklu pleytlere ekilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına, 5a, 5b, 6a ve 6b maddeleri belirlenen etkin dozlarda uygulandı. PDT sonrası etüvde 1 gece inkübe edilen hücreler, 1 ml PBS içerisinde süspanse edildi. 20 µl hücre ve 10 µl AO/EB boyasından lam üzerine yayıldı, pipetajdan sonra lamelle kapatılıp 40x objektif gücünde floresan mikroskopta görüntülendi. 10 j/cm<sup>2</sup> ışık ve 5a, 5b, 6a ve 6b fotosensitizer muameleli, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin AO/EB boyamasında mikroskobik görüntülerinde; turuncu renkte görülen apoptotik hücreler ile yeşil renkte görülen sağlıklı hücrelerin MTT sonuçlarıyla uyumlu yüzdelerde olduğu belirlendi. Fakat fotosensitizer muamelesiz hücrelerde ve ışık uygulanmayan muameleli karanlık kontrol grubunda yeşil renkte görülen hücrelerin ise fazla oranda olduğu saptandı. MCF-10A hücrelerinde ise 10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanan 5a, 5b muameleli gruplarda az sayıda turuncu boyanan hücreler gözlemlendi. 10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanan 6a ve 6b muameleli grupları ile muameleli olup ışığa maruz bırakılmayan karanlık kontrol grubunda yeşil renkte görülen hücrelerin sayıca fazla olduğu belirlendi (Resim 6).

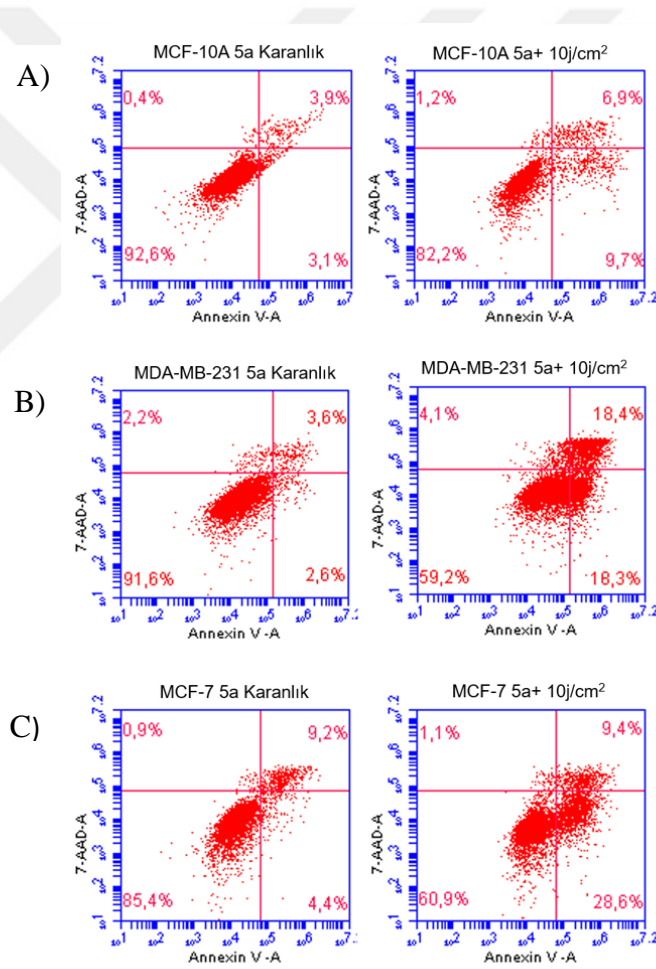


**Resim 6.** PDT ve kontrol gruplarının, AO/EB boyama ile elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri. MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında fotosensitizer muamelesi+10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanmış, muamelesiz+10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanmış ve muamelesi- muamelesiz karanlık kontrollerinin AO/EB boyama sonucu floresan mikroskop 40X objektif gücünde görüntülenen görüntüleri.

#### 4.4.2. Annexin V/7-AAD Testi ile Sağlıklı ve Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde 5a, 5b, 6a ve 6b bileşiklerinin  $10\text{j}/\text{cm}^2$  ışık ile oluşturdukları apoptotik hücre ölümü ve ışığa maruz bırakılmamış fotosensitizer muameleli kontrollerin canlılık oranları Annexin V/7-AAD testi ile belirlendi.

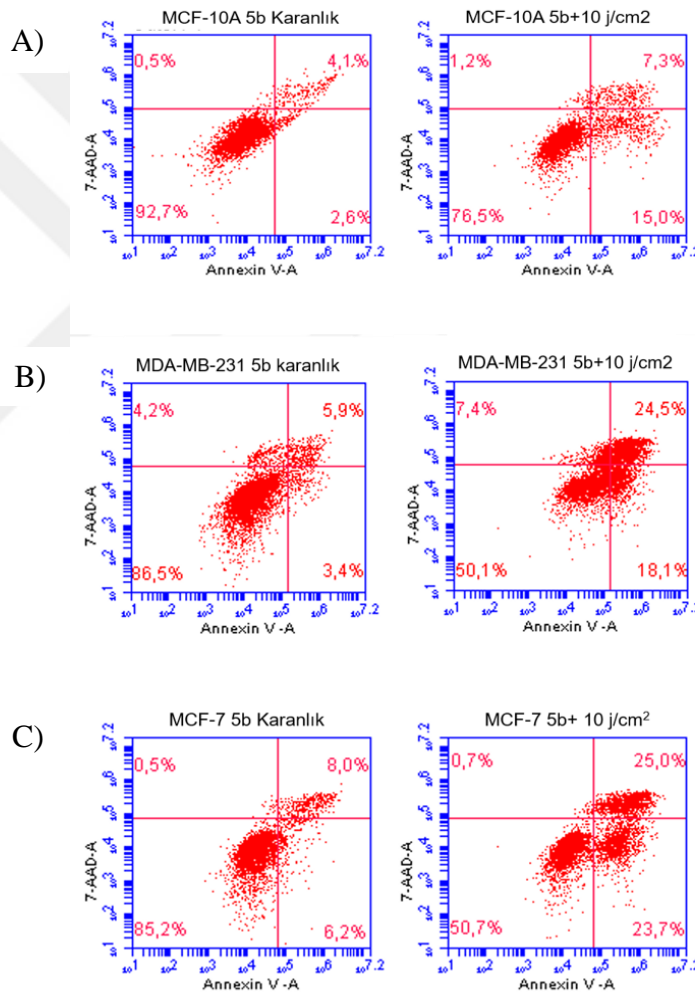
5a maddesinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattlarının Annexin V/7-AAD sonuçlarında, karanlık kontrollerinde ortalama %89 canlılık görülürken,  $10\text{j}/\text{cm}^2$  ışık uygulandığında MCF-7 %60.9, MDA-MB-231 %59.2 canlılık ve MCF-10A'da %82.2 canlılık belirlendi (Resim 7).



**Resim 7.** Hücre hatlarında 5a bileşiminin gerçekleştirdiği apoptotik oranlar. A) MCF-10A normal hücre hattı, B) MDA-MB-231, C) MCF-7 kanser hücre hatları

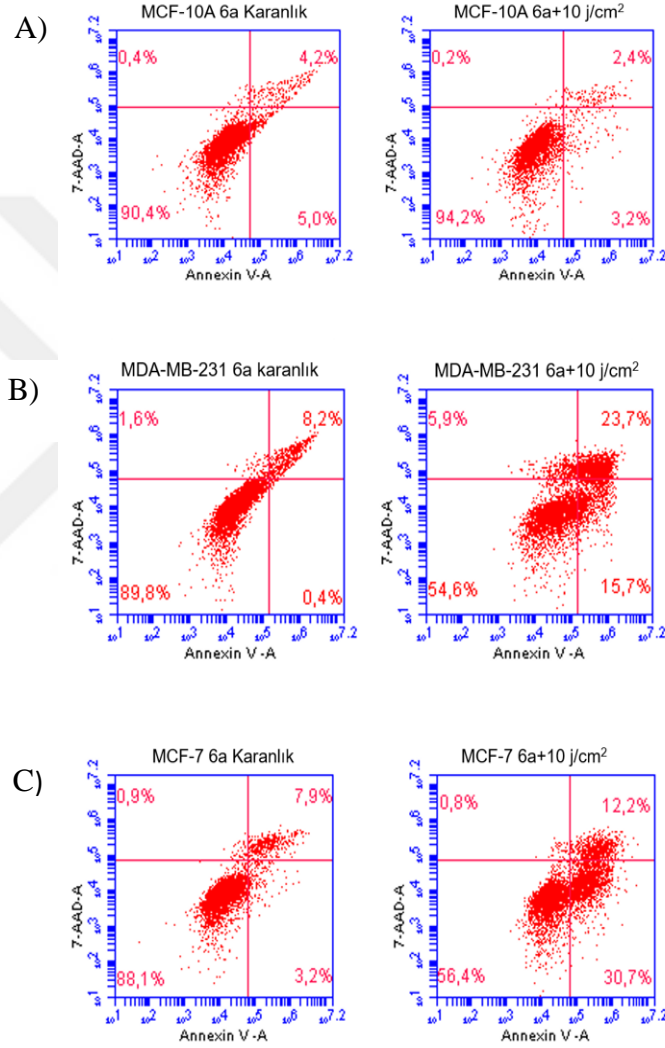


5b fotosensitizeri kullanılan üç hücre hattına etkin dozlarla muamele edildi. Muameleli karanlık kontrollerinde ortalama %88 canlılık saptandı. Karanlık kontrollerde canlılık değerleri MCF-7’de %85.2 ve MDA-MB-231 hücresinde %86.5 olarak belirlendi. 10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanan hücrelerde ise canlılığın azaldığı apoptotik ve ölü hücrelerinin arttığı belirlendi. Apoptotik ve ölü hücre oranları MCF-7 hücre hattında %49.3, MDA-MB-231 hücre hattında %40.8 olarak sonuçlandırıldı. MCF-10A hücre hattı için karanlık kontroller %92.7, 10 j/cm<sup>2</sup> ışık uygulanmış fotosensitizer muameleli gruplarda ise canlılık ise %82.2 olarak belirlendi (Resim 8).



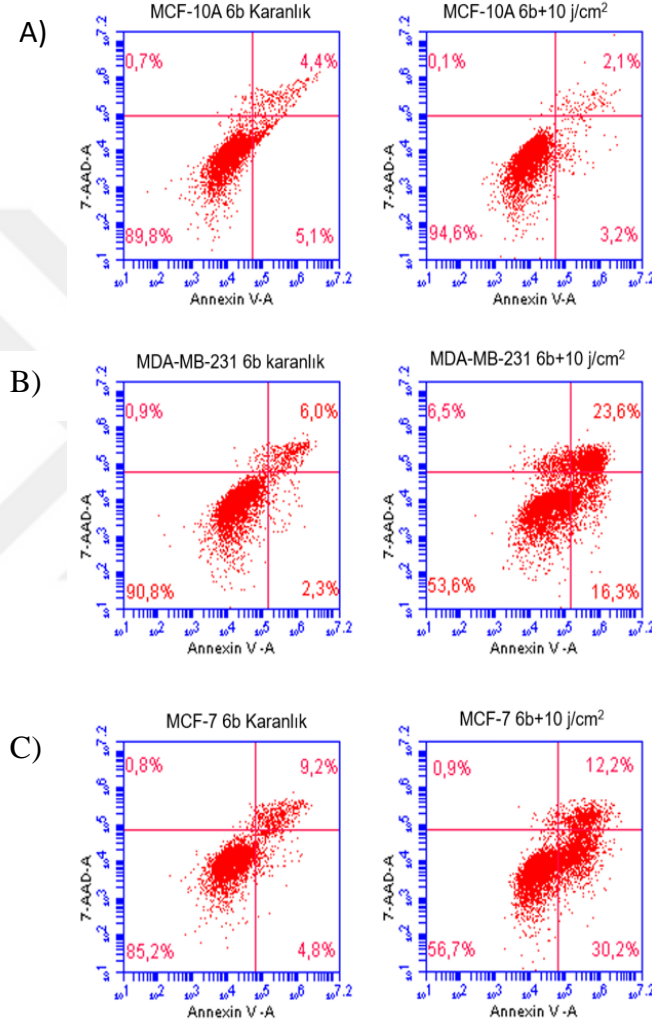
**Resim 8.** Hücre hatlarında 5b bileşiğinin gerçekleştirdiği apoptotik oranlar. A) MCF-10A normal meme hücre hattı, B) MDA-MB-231, C) MCF-7 kanser hücre hatları

6a fotosensitizeri muameleli  $10 \text{ j/cm}^2$  ışık uygulanmış PDT'nin indüklediği apoptoz oranları Annexin V/7-AAD testine göre, MCF-7 hücre hattında %43.6, MDA-MB-231 hücre hattında ise %45.4 belirlendi. Bu hücre hatlarının karanlık kontrollerinde sırasıyla %88.1 ve %89.8 canlılık ölçüldü. Sağlıklı hücre hattı MCF-10A'da ise apoptotik hücre ölümü gözlenmeyip karanlık kontrolde ve ışıklı muamele ortalama %92 canlılık saptandı (Resim 9).



**Resim 9.** Hücre hatlarında 6a bileşiminin gerçekleştirdiği apoptotik oranlar. A) MCF-10A normal meme hücre hattı, B) MDA-MB-231, C) MCF-7 kanser hücre hatları

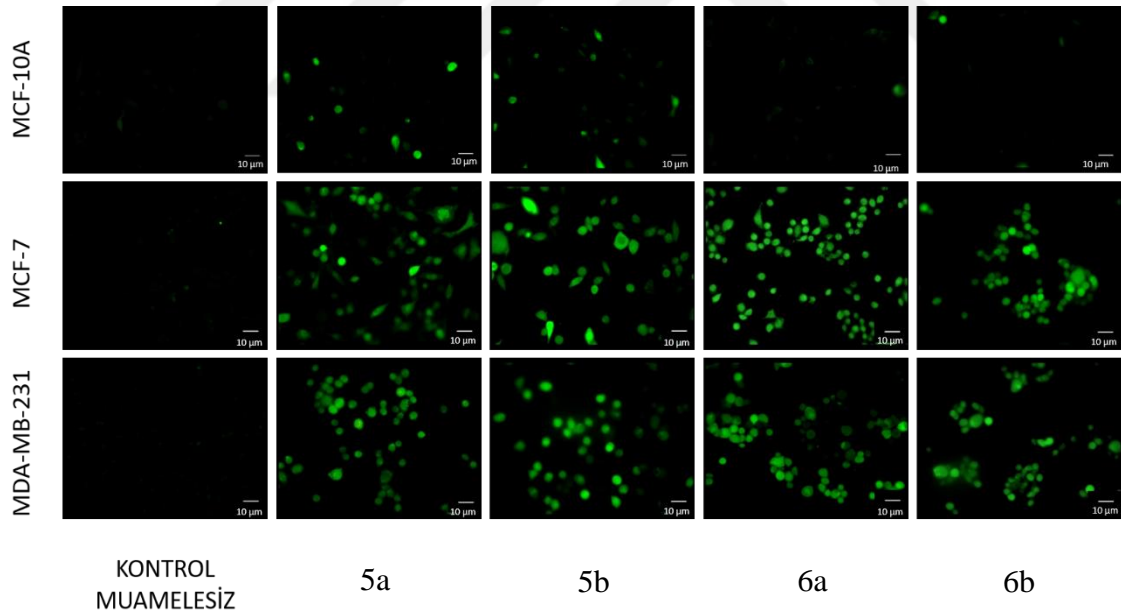
6b fotosensitizeri muameleli  $10 \text{ j/cm}^2$  ışık uygulanmış MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarındaki apoptoz oranlarına bakıldığında, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında apoptotik oran sırasıyla %43.3 ve %46.4 olarak belirlendi. Karanlık kontroller ortalama %87 ve MCF-10A hücre hattı gruplarında ortalama %92.2 üstü canlılık, ortalama %7.8 apoptoz oranı belirlenmiştir (Resim 10).



**Resim 10.** Hücre hatlarında 6b bileşiğinin gerçekleştirdiği apoptotik oranlar A) MCF-10A meme hücre hattı, B) MDA-MB-231, C) MCF-7 meme kanser hücre hatları

#### 4.5. Reaktif Oksijen Miktarının H<sub>2</sub>DCFDA Boyası ile Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan fotosensitizer maddelerin hücre içinde moleküler oksijenden reaktif oksijen oluşturmaları floresan mikroskopta H<sub>2</sub>DCFDA boyası kullanılarak görüntülendi. Lamellerin üzerine ekilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin fotosensitizer muameleli ve muamelesiz gruplarına 10j/cm<sup>2</sup> ışık uygulandı. Hazırlanan H<sub>2</sub>DCFDA boyası 3 µM konsantrasyonda PDT uygulanmış hücre gruplarına uygulandı ve floresan mikroskopta 20x objektif büyütme gücünde görüntülendi. İncelenen PDT uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının bulunduğu lamellerin karanlık kontrollerinde ışığa gözlenmezken, fotosensitizer muameleli hücre gruplarında ROS oluşumunu gösteren yeşil ışığa alındı. MCF-10A hücrelerinin 5a, 5b maddeleriyle muamele ettirilip 10 j/cm<sup>2</sup> ışığa maruz bırakıldığında ROS oluşumunu gösteren yeşil ışığa az miktarda görüntülendi. MCF-10A hücrelerine uygulanan 6a ve 6b maddelerinde ve fotosensitizer muamelesiz sadece ışığa maruz bırakılmış kontrollerde ise herhangi bir ROS ışımaları görülmedi (Resim 11).

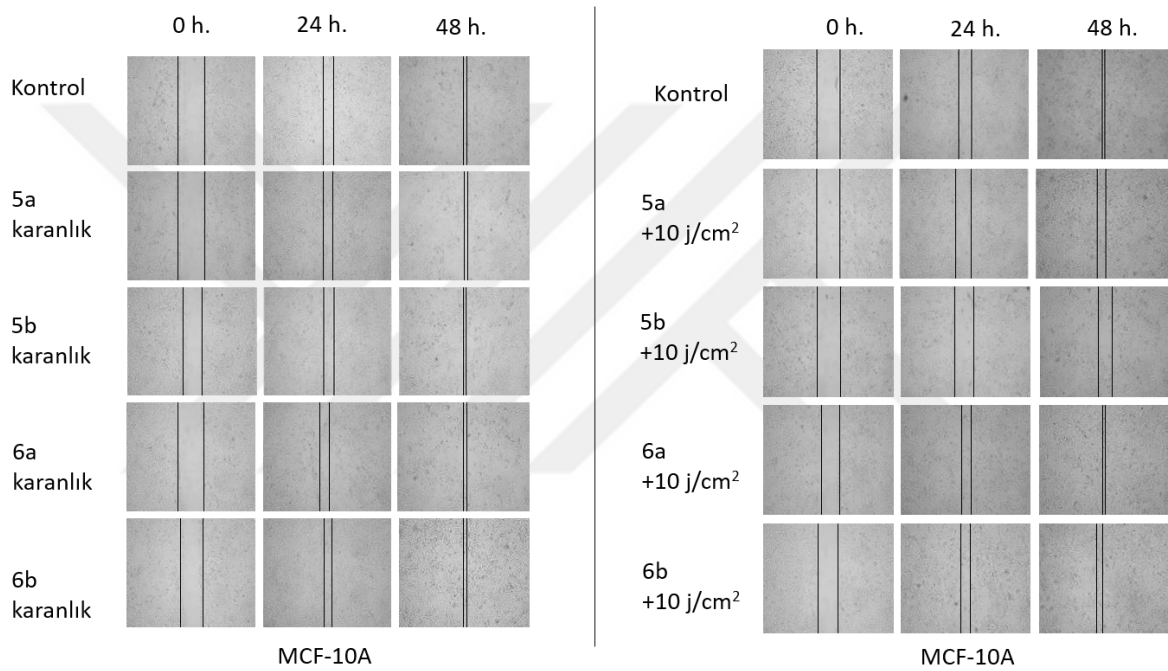


**Resim 11.** Hücre hatlarında PDT sonrası ROS oluşumunun floresan mikroskop görüntüleri

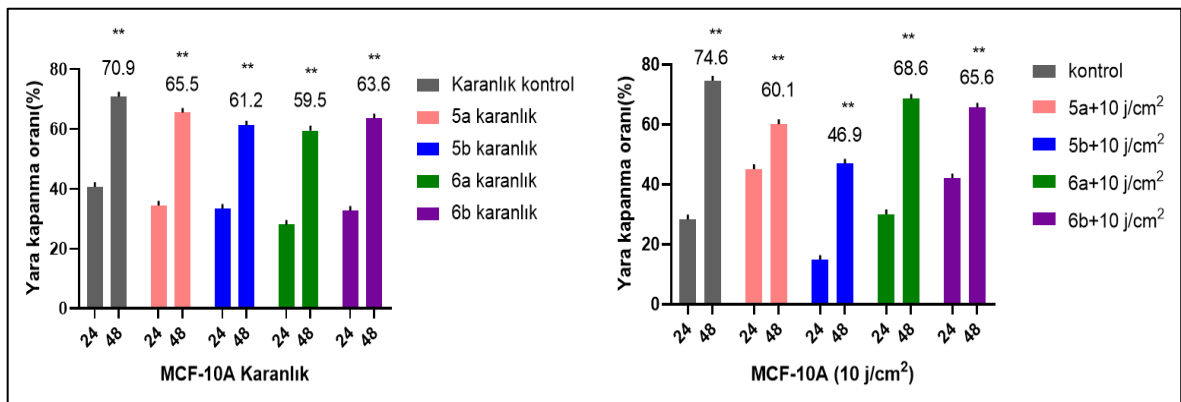
#### 4.6. PDT'nin MCF-10A, MDA-MB-231 Ve MCF-7 Üzerinde Hücre Hareketine Etkisinin Wound Healing (Yara İyileşme) Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan metastatik meme kanseri hücre hatları MCF-7, MDA-MB-231 ve kontrol olarak MCF-10A meme hattı üzerinde PDT'nin hücre hareketine etkisine analiz

edildi. PDT uygulanan ve karanlık kontrol hücrelerinin bulunduğu pleytte 200 µl pipet ile çizik oluşturuldu ve hücrelerin bulunduğu kuyucuklara serumsuz besiyeri eklendi. İlk çizim 0. saat olarak fotoğraflandırıldı. 24, 48 ve 72. saatlerde fotoğraflandırılarak oluşturulan yaranın iyileşme oranları değerlendirildi. SiPc ve ışık uygulanan hücrelerde kapanma yok veya çok az iken, kontrol grubu metastatik meme kanseri hücrelerinde proliferasyon ve hücre göçü gözlemlendi. MCF-10A hücre hattında ise karanlık ve PDT uygulaması ile bir etki gözlenmemiş ve proliferasyon devam edip 48 saat içinde çizik kapanmıştır (Resim 12 ve 13).

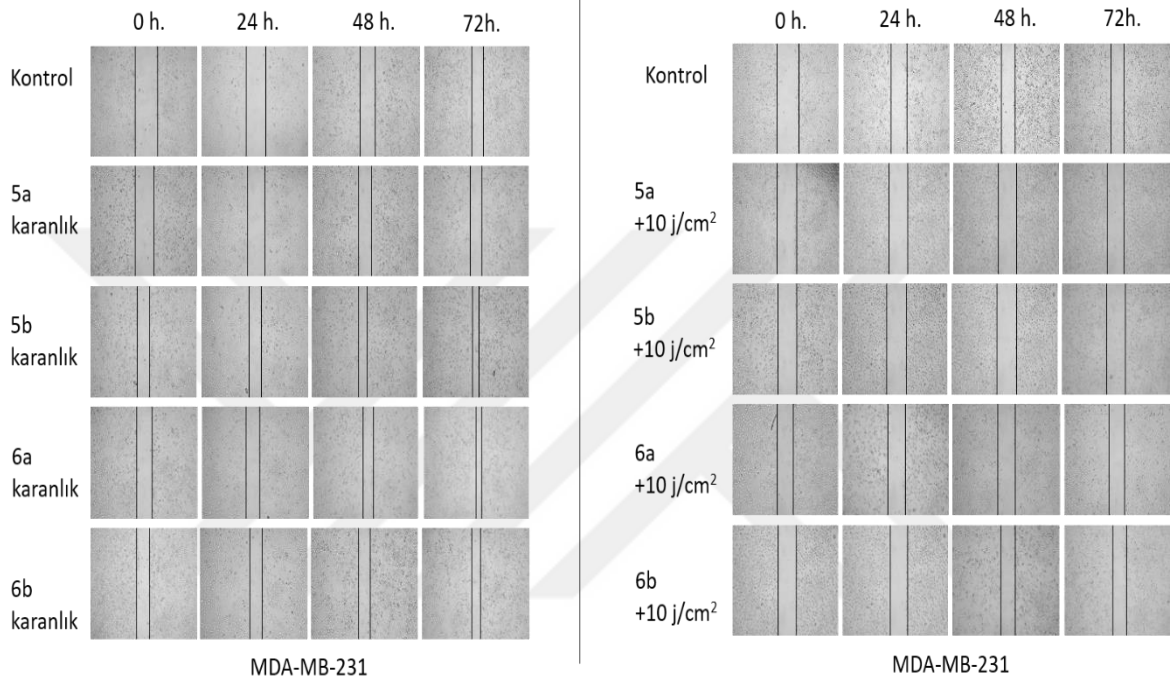


**Resim 12.** MCF-10A hücre hattında oluşturulan çizik kapanma görüntüleri

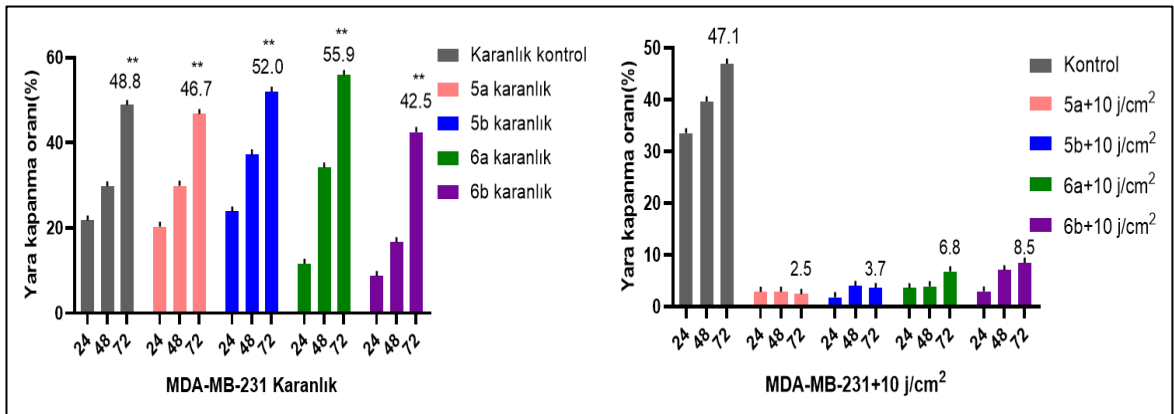


**Resim 13.** MCF-10A hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri \*\*p<0.001

SiPc uygulanmış ve  $10 \text{ j/cm}^2$  ışığa maruz bırakılmış MDA-MB-231 hücre hatlarında oluşturulan yara 72 saate kadar kapanma görülmemiştir. SiPc uygulanmış karanlık kontrol grupları, fotosensitizer uygulanmamış ışığa maruz bırakılmış kontrol grupları ve hiçbir uygulamaya maruz kalmamış kontrol gruplarında ise 72 saat sonunda ortalama %50 yara kapanma saptanmıştır (Resim 14 ve 15).

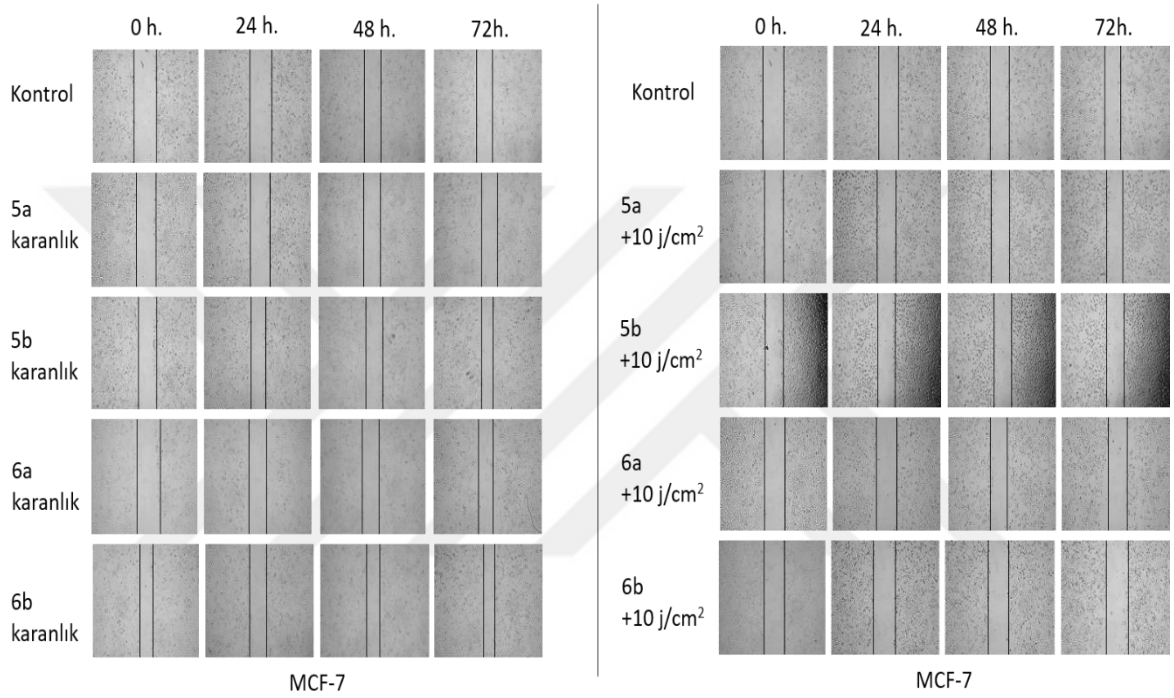


**Resim 14.** MDA-MB-231 hücre hattında oluşturulan çizginin kapanma görüntüleri

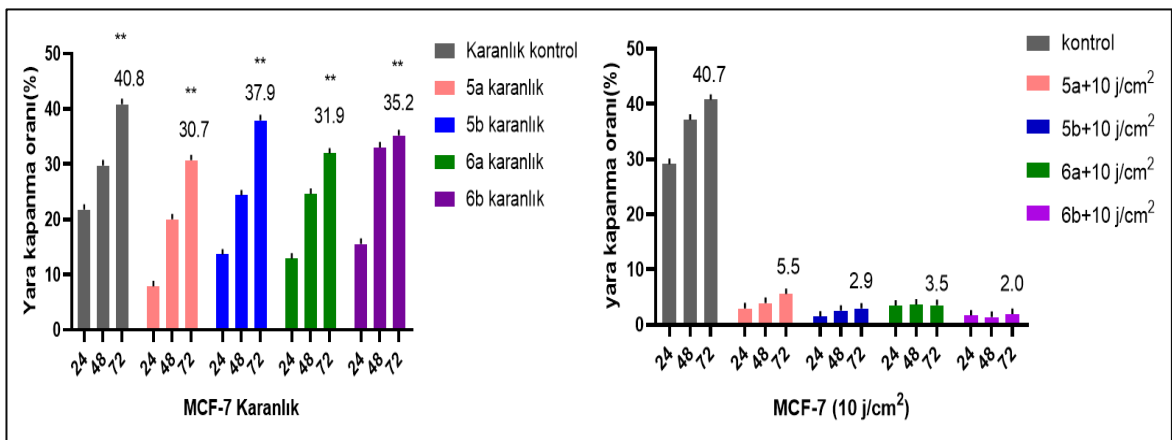


**Resim 15.** MDA-MB-231 hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri \*\*p<0.001

SiPc uygulanmış ve  $10 \text{ j/cm}^2$  ışığa maruz bırakılmış MCF-7 hücre hatlarında oluşturulan yara diğer meme kanseri hücre hattına benzer şekilde 72 saate kadar kapanma ortalama %3 oranında görülmüştür. SiPc uygulanmış karanlık kontrol grupları, fotosensitizer uygulanmamış ışığa maruz bırakılmış kontrol grupları ve hiçbir uygulamaya maruz kalmamış kontrol gruplarında ise 72 saat sonunda ortalama %35 yara kapanma saptanmıştır (Resim 16 ve 17).



**Resim 16.** MCF-7 hücre hattında oluşturulan çizik kapanma görüntüleri

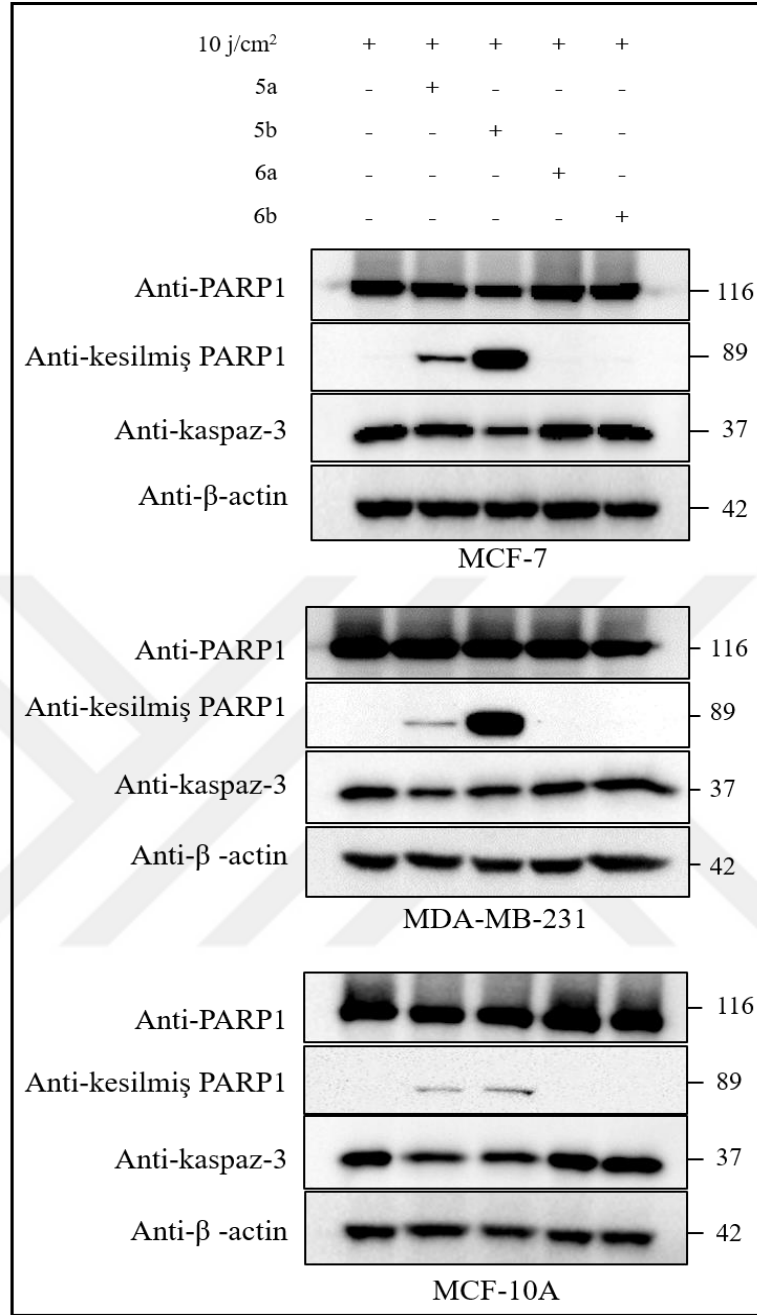


**Resim 17.** MCF-7 hücre hattında yara iyileşme yüzdeleri \*\*p<0.001

#### 4.7. Apoptotik Protein Ekspresyonların Western Blot Analizi İle Analizi

Apoptotik belirteçler olan PARP, kesilmiş PARP ve kaspaz-3 proteinlerinin PDT uygulaması sonucu ekspresyonlarındaki değişimler western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. MCF-10A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında, muamelesiz kontrol grubu, 0.30  $\mu\text{M}$  5a, 0.075  $\mu\text{M}$  5b, 0.15  $\mu\text{M}$  6a ve 0.15  $\mu\text{M}$  6b fotosensitizer muamelesi ve 10  $\text{j}/\text{cm}^2$  ışık uygulanmış PDT grubu olacak şekilde çalışıldı. Üç hücre hattındaki farklı gruplar toplanıp protein izolasyonları gerçekleştirildi. İzole edilen proteinlerle western blot yapılarak, uygun antikorları ile işaretlendi ve analiz edilen proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimler image Lab programı kullanılarak görüntüledi. Total PARP1 ve total kaspaz-3 bantları kullanılan tüm hücre hatlarında ve tüm gruplarda görüldü. Kesilmiş PARP1 bandı ise 5a ve 5b muamelesiyle yapılan PDT sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında görüntülenirken MCF-10A hücre hattında da daha az yoğunlukta görüntülenmiştir. Kesilmiş PARP1 proteini seviyelerinde, 5b muameleli PDT grubu hücrelerinde artış görülürken, kaspaz-3 ve total PARP1 bantlarında diğer gruplardaki ekspresyonlara oranla azalma görülmüştür. 6a ve 6b bileşenleri gerçekleştirilen PDT uygulanmış hücre hatlarında ise total PARP1 ve kaspaz-3 ekspresyonları görüntülenmiş fakat kesilmiş PARP1 bantları görülmemiştir (Resim 18).





**Resim 18.** PDT'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında apoptotik proteinlerin ekspresyonları üzerine etkisi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görölme insidansına sahip olması ve yüksek ölüm oranlarının görölmesi nedeniyle erken teşhisin önemli olduğu bir kanser türüdür. Tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapide istenmeyen yan etkiler görölmekte ve hastaların yaşam kalitesi olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle PDT, alternatif tedavi arayışlarında ilgi gören yaklaşımlardan biri olmuştur. PDT’de, zararsız görünür dalga boyundaki ışık ve ışık ile aktifleşmediği sürece etkisi olmayan moleküllerin kullanılması yan etki riskini en aza indirmektedir. Buradaki en önemli unsurlardan biri kullanılan fotosensitizerlerdir. Literatürde farklı fotosensitizerler ile yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara meme kanseri hücre hatlarında çalışılmış, Miller ve ark. tarafından Pc4 olarak adlandırdıkları ftalosiyanın türevi, Santos ve ark. metilen blue türevi, Wyss ve ark. klorin türevi fotosensitizerleri gibi birçok çalışma örnek verilebilir (90-92). Fotosensitizerler etki ve geliştirilme durumlarına göre üç sınıfa ayrılmışlardır. Bu üç sınıftan ilki olan birinci nesil fotosensitizerler zamanla geliştirilerek ikinci ve üçüncü nesil fotosensitizerler ortaya çıkmıştır (93). Fotosensitizerler geliştirilirken kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemesi gibi özelliklere sahip olmaları beklenmektedir (94). Bunun yanı sıra kimyasal yapıları son derece önem arz etmektedir. Fotosensitizerlerin lipofilik, hidrofilik veya amfifilik türleri sentezlenmektedir. Sentezlenen bu fotosensitizerler, farklı yapılarından dolayı hücre membranını geçebilme kabiliyetleri, hücre içindeki lokalizasyon bölgeleri ve agrege olup olmamaları gibi farklı davranışlar sergilemektedir. Bunların dışında fotosensitizerlerin absorpsiyon değerleri, reaktif oksijen türlerini oluşturma kabiliyetleri, istenilen dokuda yeterli sürede kalmaları ve vücuttan atılma süreleri gibi farklı durumlar söz konusudur (31, 95). PDT’deki diğer unsurlar ise kullanılan ışığın görünür dalga boyunda zararsız olması ve sağlıklı dokuda oluşacak harabiyetin minimum düzeye indirilebilmesidir (29).

Çalışmamızda, piperazin çevreli silisyum ftalosiyaninlerin meme kanseri hücre hatlarındaki PDT etkinliği araştırılmıştır. Piperazin molekülünün klinikteki bazı kanser ilaçlarının yapısında bulunduğu bilinmektedir (43). Kullandığımız fotosensitizerlerin omurgası olan ftalosiyaninler, yapısı bakımından bileşik oluşturmaya elverişli oluşunun yanında yüksek kırmızı ışık emilimi ve reaktif oksijen türleri oluşturma verimliliği bakımından PDT’de kullanılmaya elverişlidir (38, 44).

Çalışmanın ilk aşamasında, dört adet piperazin çevreli fotosensitizer molekülün (5a, 5b, 6a ve 6b) MDA-MB-231, MCF-7 meme kanseri ve MCF-10A normal meme hücre hatlarında  $10 \text{ j/cm}^2$  ışık gücündeki hücre canlılığına etkileri ve etkin dozları MTT testi ile belirlenmiştir. Bu etkin dozlar hücrelere uygulandığında, SiPc kullanılmadan yalnızca ışık uygulanan kontrol hücrelerinde ve hem SiPc hem de ışık uygulanan (PDT grubu) normal meme hücrelerinde %80'in üzerinde canlılık değerleri elde edilmiştir. PDT uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde ise ortalama %50 oranında ölüm görülmüştür. Çalışmamız için ilk kez sentezlenen fotosensitizerlerle elde ettiğimiz PDT sonuçları literatürle kıyaslandığında, kullandığımız fotosensitizerlerin karanlık toksisitesinin olmaması ve tümör dokusunu sağlıklı dokuya kıyasla daha çok etkilemesi optimal bir fotosensitizerde olması gereken özellikler ile uyum göstermektedir (23, 96).

Hidrofobik yapıda olan 5a molekülünün kanserli hücreler üzerindeki etkin dozu  $0.30 \mu\text{M}$ , 5b molekülünün ise  $0.075 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. 5b bileşiğinin etkin dozu 5a bileşiğinden daha düşük konsantrasyonda olmasına rağmen, canlılık analizinde her iki fotosensitizer de kanser hücrelerinde ortalama %45 ölüme neden olmuştur. 5a ve 5b molekülleri sağlıklı meme hücrelerinde de düşük düzeyde (ortalama %15) ölüme sebep olmuşlardır. Bu moleküller piperazin çevreli hidrofobik yapıda olmalarına rağmen, 5b molekülünün 5a'ya göre daha yüksek sitotoksik etki göstermesinin; hidrofobik özelliğinin daha kuvvetli olmasına, moleküler geometrisine, daha fazla ROS üretimine ve daha çok agregre olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Fotosensitizerlerin hücre ortamındaki seçiciliği ve kanser hücrelerine afinitesinin artışı, kanser hücrelerindeki yüksek proliferasyon hızı ve vasküler geçirgenlikteki artışa bağlıdır. Diğer etken ise, normal hücredeki pH aralığı (7.2-7.5) ile kanser hücrelerindeki pH aralığının (yaklaşık 6.5) farklı oluşudur (32, 34).

Amfifilik yapıda olan 6a ve 6b moleküllerinin agregasyon oluşturmaması ve hücre membranından girişinin kolay olması gibi birçok avantajı vardır. Ayrıca katyonik oluşu, asidik hücre ortamına afiniteyi artırarak sağlıklı hücrelere etki etmeden kanserli hücreler üzerinde seçici aktivite göstermesini kolaylaştırır (28, 97, 98). 6a ve 6b fotosensitizerleri kullanıldığında, ışığa maruz bırakılmayan kontrol gruplarında ve hem SiPc hem ışık uygulanan (PDT grubu) normal meme hücrelerinde anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmemesine rağmen kanser hücrelerinde yüksek oranlarda (ortalama %45 ölüm) etki göstermişlerdir.

PDT ile uyarılan hücrelerde nekroz, apoptoz, otofaji gibi ölüm yolları bildirilmiştir (28, 30). Bu ölüm yollarından, üzerinde en çok çalışılan apoptozdur. Dört fotosensitizer ile yapılan PDT sonucunda hücrelerdeki apoptotik oluşum, akrinin oranj/etidyum bromür boyama tekniği ile mikroskopik olarak teyit edilmiştir.

Hücre ölümü kantitatif olarak Annexin V/7-AAD boyama yöntemi de analiz edilmiştir. PDT sonrasında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında %50'ye yakın hücre ölümleri tespit edilmiştir. MCF-10A hücre hattında ise 5a ve 5b molekülleri %15'e yakın hücre ölümüne neden olurken, 6a ve 6b molekülleri hem karanlık kontrollerde hem de PDT grubunda anlamlı düzeyde ölüme neden olmamıştır. Vittar ve ark. tarafından gerçekleştirilen PDT çalışmasında,  $10 \text{ j/cm}^2$  ışık gücünde çalışılan ftalosiyanın yapıdaki farklı bir fotosensitizerin, MCF-7c3 meme kanseri hücre hattındaki apoptotik etkileri Annexin V/7AAD testi ile incelenmiş benzer sonuçlar elde edilmiştir (24). Annexin V/7-AAD analizleri ve akrinin oranj/etidyum bromür boyama neticesinde elde edilen sonuçlar, MTT hücre canlılık testi sonuçlarımızı doğrulamıştır. Annexin V/7-AAD ve MTT hücre canlılık deneylerinde, 5a ve 5b bileşiklerinin 6a ve 6b bileşiklerinden daha farklı sonuçlar ortaya koymasının, aralarındaki amfifilik-hidrofobik farktan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Literatüre göre, hidrofobik fotosensitizerlerin hücreye nüfuz etme özelliği daha yüksek olsa da sulu ortamlarda topaklanma eğilimi ve hasta vücudunda daha uzun süre kalma, hızlı atılmama gibi istenmeyen özellikler gösterebilirler (23, 34, 58). Genellikle amfifilik fotosensitizerler hidrofilik ve hidrofobik fotosensitizerlere oranla daha etkili sonuçlar gösterirler. Bu sebeple amfifilik fotosensitizerler PDT çalışmalarında daha fazla tercih edilirler (99, 100).

PDT'nin çalışma prensibine göre, fotosensitizer moleküller uygun dalga boyundaki ışık ile uyarıldığında moleküller oksijen reaktif oksijene çevrilir. ROS ile etkileşimi neticesinde yeşil floresan ışımaya yapan  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  boyası, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına uygulanmış ve ROS oluşumu mikroskopik olarak teyit edilmiştir. Yapılan bu boyamada, kullanılan tüm hücre hatlarının fotosensitizer muamelesiz ışık uygulanmış kontrollerinde ışımaya görülmezken, sağlıklı meme hücrelerinin muameleli PDT gruplarında çok az da olsa ışımaya tespit edilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin PDT uygulanan gruplarında ise yoğun ışımalar gözlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu veri literatürle uyumlu olup kullanılan fotosensitizerlerin, özellikle kanser hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etkilerin ROS düzeyindeki teyidi niteliğindedir (38, 51).

MDA-MB-231 hücrelerinin, MCF-7 hücrelerine kıyasla hücre hareketi kabiliyeti açısından daha agresif olduğu bilinmektedir (101, 102). Çalışmamızda, PDT'nin hücre hareketine etkisini belirlemek amacıyla yara iyileşme deneyi gerçekleştirilmiştir. PDT uygulanmayan, karanlık ve muamelesiz kontrollerde 72. saat sonunda, MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan yara bölgesi yüksek oranda kapanırken, MCF-7 hücrelerinde kapanmanın daha az olduğu saptanmıştır. MCF-10A hücrelerinde ise, yara bölgesinin 48 saat içinde kapandığı gözlenmiştir. Bologna ve ark. MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde, potansiyel antitümör ajan olan platin ftalosiyaninleri kullanmış ve yara iyileşme deneyi gerçekleştirmişlerdir. MDA-MB-231 hücrelerinin kontrol grubunda kapanma gerçekleşirken, ftalosiyanin uygulanan grupta oluşturulan yara bölgesi kapanmamıştır. MCF-10A hücre hattında ise, her iki durumda da 24 saat içerisinde bu bölgede kapanma gerçekleşmiştir. Bu sonuç ftalosiyaninlerin normal hücre hattının proliferasyonuna hiçbir etkisi olmadığı şeklinde açıklanmıştır (103). Metastatik özellikte olmayan bu hücrelerde oluşturduğumuz yara bölgesinin kapanması, hem hücrelerin proliferasyon olmaları hem de ftalosiyaninlerin sağlıklı hücreler üzerindeki etki kabiliyetinin son derece sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır (51, 104).

Araştırmamızda kullandığımız yeni sentezlenen SiPc'lerin PDT uygulaması sonrası hücre canlılığına ve apoptoza etkisi, spektrofotometrik, mikroskopik ve flow sitometrik olarak tayin edilmiştir. Farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, hücrelerin farklı ölüm yollarından hangisini tercih ettiği çalışılan konular arasındadır. Bunun yanı sıra, apoptotik hücre ölümünün kaspaz bağımlı veya bağımsız şekilde sürdürülmesi de çalışmalara konu olan bir diğer sorudur (24, 91). Elde ettiğimiz veriler, piperazin çevreli SiPc moleküllerinin, kanser hücre hatları üzerinde PDT aracılığıyla oluşturduğu etkinin apoptotik hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Apoptotik hücre ölümünü tanımlamak için, PARP1, kesilmiş PARP1 ve kaspaz-3 proteinleri gibi çeşitli apoptotik belirteçlere bakılmaktadır. Bu proteinlerin PDT uygulamaları sonrasındaki ekspresyon farklılıklarının incelendiği çalışmalarda elde edilen sonuçlar, kullanılan fotosensitizerlere göre değişkenlik göstermektedir. Araştırmamızda; MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında belirlenen etkin dozlardaki fotosensitizerler ve 10 j/cm<sup>2</sup> kırmızı ışık uygulaması gerçekleştirilerek western blot yöntemi ile bu proteinlerin ekspresyonları analiz edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, üç hücre hattında da total PARP1 ve total Kaspaz-3 bantları görülmüştür. Apoptotik kaskada görevli bir protein olan kaspaz-3 ün aktif formunun, DNA kırığını onarmada görevli PARP1 proteinini keserek etkisiz hale getirdiği bilinmektedir

(105, 106). Kaspazlar üzerinden gerçekleşen apoptoz sonucunda, kesilmiş PARP1 miktarında artış, total PARP1 ve total kaspaz-3 miktarlarında ise azalış beklenmektedir. Western blot çalışmamız sonucunda, 5a ve 5b fotosensitizerlerinin kullanıldığı hücre gruplarında kesilmiş PARP1 bandı gözlenirken, 6a ve 6b fotosensitizerlerinin uygulandığı gruplarda ise kesilmiş PARP1 bandı gözlenmemiştir. 5a ve 5b fotosensitizerlerinin hidrofobik oluşu, 6a ve 6b fotosensitizerlerinin ise amfifilik oluşu bu iki yapı arasındaki en büyük farktır. Bu fark, kullanılan fotosensitizerlerin hücreler üzerinde farklı sonuçlar oluşturması, hücre içine alımlarının ve lokalizasyon bölgelerinin farklılığı ile ilişkilendirilebilir (24, 28, 91). Ayrıca, otofaji gibi farklı bir ölüm mekanizmasının kullanılması da literatürde kesilmiş PARP1'in oluşmama nedeni olarak öne sürülmektedir. Santos ve ark. tarafından gerçekleştirilen metilen blue ile MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarındaki PDT çalışmalarında, PDT sonrası kaspaz-3, -7, -8 ve -9 aktiviteleri analiz edilmiş ve anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda otofajik yolağın aktifleşebileceği düşünülmüştür (91). Başka bir çalışmada ise Furre ve ark., 5-aminolevulinik asit (ALA) ile gerçekleştirdikleri PDT çalışmasında PDT'nin kaspaz bağımlı apoptozun yanında AIF'ları uyararak kaspaz bağımsız apoptozu da indükleyebileceğini belirtmişlerdir (107). Çalışmamızda kullandığımız 6a ve 6b bileşiklerinin Annexin V/7-AAD sonuçlarında hücrelerde apoptozun indüklendiği net bir şekilde görülmüştür. Bu nedenle, 5a ve 5b fotosensitizerlerinin PDT aracılığıyla hücreler üzerinde oluşturduğu etkinin kaspaz bağımlı, 6a ve 6b fotosensitizerlerin oluşturduğu etkinin ise kaspaz bağımsız apoptoz olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, yeni sentezlenen piperazin çevreli silyum ftalosiyanınların (5a, 5b, 6a ve 6b) meme kanseri hücre hatları olan MCF-7, MDA-MB-231 ve sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A üzerindeki PDT etkinliği ilk kez gösterilmiştir. PDT eşliğinde uygulanan fotosensitizerlerin sağlıklı hücreler üzerindeki tahrip edici etkisinin, kanserle hücrelere kıyasla çok daha az olduğu, kanser hücrelerini fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptozu yönlendirdiği, bu hücrelerde ROS oluşumunu arttırdığı ve yara iyileşmesi modellerinde ise hücre hareketini kısıtladığı gösterilmiştir. Bu durum, kullanılan fotosensitizerlerin anti kanser ilaç çalışmalarında potansiyel terapötik aday olabileceğine dair umut vaat etmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Piperazin çevreli yeni silisyum ftalosiyanınlerin (SiPc) meme kanseri ve normal meme hücre hatlarındaki PDT uygulaması aracılığıyla gelişmesi beklenen antiproliferatif etkinin ve apoptozun araştırılması amaçlanan bu çalışmada, ilk olarak hücre canlılığı üzerine etkiler incelenmiştir. Yeni SiPc'lerin PDT etkinliğinin hücre kültüründeki etkileri kontrollü deneyler yapılarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında bu moleküllerin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla 3 boyutlu kültürler veya in vivo çalışmaların gerçekleştirilmesiyle PDT mekanizmasının daha iyi anlaşılabilir olacaktır.
2. PDT'nin, hücrelerin hareketlerine etkisini tespit etmek amacıyla wound healing (yara iyileşme) deneyi gerçekleştirilmiştir. Yara iyileşme deneyinden elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla hücre hareket ve göçünü analiz etmek için invazyon-migrasyon assay çalışmaları planlanmıştır.
3. PDT'nin oluşturduğu apoptozun, protein ekspresyon düzeyindeki etkileri için apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, PARP1 ve kesilmiş PARP1 proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimler analiz edilmiştir. PARP1 proteininin kaspazlar tarafından kesilmesi yalnızca 5a ve 5b fotosensitizerlerinin uygulandığı gruplarda görülmüştür. Kaspaz bağımlı apoptoz gerçekleştiğinin belirteci olan kesilmiş PARP1 bantlarının 6a ve 6b fotosensitizeri uygulanmış gruplarda görülmeşi, kaspaz bağımsız apoptoz yolağının aktif olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle kesilmiş PARP1 oluşumlarında görülen farkın daha iyi açıklanabilmesi için, kaspaz bağımsız apoptozda görevli proteinler üzerinden daha geniş çalışmalar yapılmalıdır.
4. Kullanılan tüm fotosensitizerlerin hücre içi lokalizasyonlarında farklılık görülebilmektedir. Fotosensitizerler, lokalize oldukları organelere göre (endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozom) farklı ölüm yollarını indükleyebilirler. Kullandığımız fotosensitizerlerin hücre içi lizozomal veya mitokondriyal lokalizasyonları, bu bölgelere özel floresan işaretçiler kullanılarak mikroskopik olarak tespit edilebilir.
5. PDT çalışmalarımızda farklı sonuçların elde edilmesi, hidrofobik-amfifilik olarak yapısal farklılıkta olan fotosensitizerler ile ilişkilendirebilir. Fotosensitizerlerin moleküler yapısı ve hidrofobik-amfifilik özellikleri hücre membranını geçme potansiyelini etkileyebilmektedir. Fotosensitizerlerin hücre içine alım yüzdelere tespit edebilmek için, muameleden sonra hücre lizisini takiben, kullanılan fotosensitizerlere uygun dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapılması öngörülmektedir.

6. Piperazin çevreli silisyum ftalosiyanimlerle gerçekleştirilmiş PDT'nin, klinikte kullanılmakta olan kemoterapik ajanlar ile çalışılması meme kanseri hücre hatlarında yeni SiPc'lerin etkinliğinin daha net anlaşılabilmesine imkan sağlayacaktır. Çalışmalar bu yönde genişletilirse yeni sentezlene SiPc molekülleriyle gerçekleştirilen PDT mekanizması daha detaylandırılabilir ve literatüre kazandırabilecek daha net veriler elde edilecektir.





## 7. KAYNAKLAR

1. Metri K, Bhargav H, Chowdhury P, Koka PS (2013). Ayurveda for chemo-radiotherapy induced side effects in cancer patients. *J Stem Cells* 8(2): 115-129.
2. Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, Joh T (2017). New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med* 5(8): 183.
3. Luo D, Carter KA, Miranda D, Lovell JF (2017). Jan. Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. *Adv Sci (Weinh)* 4(1): 1600106.
4. Colasanti A, Kisslinger A, Quarto M, Riccio P (2004). Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an in vitro human prostate model. *Acta Biochim Pol* 51(4): 1039-1046.
5. Brown SB, Brown EA, Walker I (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 5(8): 497-508.
6. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res* 1(2): 109-126.
7. Polyak K (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117(11): 3155-3163.
8. Yu K, Lee CH, Tan PH, Tan P (2004). Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. *Clin Cancer Res* 10(16): 5508-5517.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424.
10. Collaborators GBDRF (2015). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 386(10010): 2287-2323.
11. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144(8): 1941-1953.
12. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 85(22): 1819-1827.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69(1): 7-34.

14. McTiernan A (2003). Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* 8(4): 326-334.
15. MacMahon B, Cole P (1972). The ovarian etiology of human breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 39: 185-192.
16. MacMahon B, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Trichopoulos D, Valaoras VG, Yuasa S (1970). Lactation and cancer of the breast. A summary of an international study. *Bull World Health Organ* 42(2): 185-194.
17. Liu JY, Wang C, Zhu CH, Zhang ZH, Xue JP (2017). Preparation and In Vitro Photodynamic Activity of Glucosylated Zinc(II) Phthalocyanines as Underlying Targeting Photosensitizers. *Molecules* 22(5).
18. Edelson RL (1988). Light-activated drugs. *Sci Am* 259(2): 68-75.
19. Josefsen LB, Boyle RW (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs* 2008: 276109.
20. Josefsen LB, Boyle RW (2008). Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol* 154(1): 1-3.
21. Moan J, Peng Q (2003). An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res* 23(5A): 3591-3600.
22. Lamberti MJ, Vittar NB, Rivarola VA (2014). Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity. *World J Clin Oncol* 5(5): 901-907.
23. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 52(2): 339-352.
24. Vittar NB, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V (2010). Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int J Biochem Cell Biol* 42(7): 1123-1131.
25. Callaghan S, Filatov MA, Savoie H, Boyle RW, Senge MO (2019). In vitro cytotoxicity of a library of BODIPY-anthracene and -pyrene dyads for application in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 18(2): 495-504.
26. Agarwal R, Athar M, Bickers DR, Mukhtar H (1990). Evidence for the involvement of singlet oxygen in the photodestruction by chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate. *Biochem Biophys Res Commun* 173(1): 34-41.

27. Foote CS (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162(3857): 963-970.
28. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kedzierska E, Knap-Czop K, Kotlinska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J (2018). Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* 106: 1098-1107.
29. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 1(4): 279-293.
30. Abrahamse H, Hamblin MR (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J* 473(4): 347-364.
31. Allison RR, Sibata CH (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 7(2): 61-75.
32. Sengee GI, Badraa N, Shim YK (2008). Synthesis and biological evaluation of new imidazolium and piperazinium salts of pyropheophorbide-a for photodynamic cancer therapy. *Int J Mol Sci* 9(8): 1407-1415.
33. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)* 3(2): 2516-2539.
34. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2(2): 91-106.
35. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2(1): 1-23.
36. Ben Mihoub A, Larue L, Moussaron A, Youssef Z, Colombeau L, Baros F, Frochot C, Vanderesse R, Acherar S (2018). Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment. *Molecules* 23(8).
37. Pandey RK, Goswami LN, Chen Y, Gryshuk A, Missert JR, Oseroff A, Dougherty TJ (2006). Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 38(5): 445-467.

38. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA (2011). Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem Photobiol Sci* 10(5): 822-831.
39. Allison RR, Sibata C, Mang TS, Bagnato VS, Downie GH, Hu XH, Cuenca R (2004). Photodynamic therapy for chest wall recurrence from breast cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 1(2): 157-171.
40. Kou J, Dou D, Yang L (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* 8(46): 81591-81603.
41. Li Y, Yu Y, Kang L, Lu Y (2014). Effects of chlorin e6-mediated photodynamic therapy on human colon cancer SW480 cells. *Int J Clin Exp Med* 7(12): 4867-4876.
42. Taylor RD, MacCoss M, Lawson AD (2014). Rings in drugs. *J Med Chem* 57(14): 5845-5859.
43. Mallesha L, Mohana KN, Veeresh B, Alvala R, Mallika A (2012). Synthesis and in vitro antiproliferative activity of 2-methyl-3-(2-piperazin-1-yl-ethyl)-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one derivatives against human cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 35(1): 51-57.
44. Chaudhary P, Kumar R, Verma AK, Singh D, Yadav V, Chhillar AK, Sharma GL, Chandra R (2006). Synthesis and antimicrobial activity of N-alkyl and N-aryl piperazine derivatives. *Bioorg Med Chem* 14(6): 1819-1826.
45. Upadhayaya RS, Sinha N, Jain S, Kishore N, Chandra R, Arora SK (2004). Optically active antifungal azoles: synthesis and antifungal activity of (2R,3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-[2-[4-aryl-piperazin-1-yl]-ethyl]-tetrazol-2-yl/1-yl)-1-[1,2,4]-triazol-1-yl-butan-2-ol. *Bioorg Med Chem* 12(9): 2225-2238.
46. Yarosh HL, Katz EB, Coop A, Fantegrossi WE (2007). MDMA-like behavioral effects of N-substituted piperazines in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 88(1): 18-27.
47. Stebbins E, Jumani RS, Klopfer C, Barlow J, Miller P, Campbell MA, Meyers MJ, Griggs DW, Huston CD (2018). Clinical and microbiologic efficacy of the piperazine-based drug lead MMV665917 in the dairy calf cryptosporidiosis model. *PLoS Negl Trop Dis* 12(1): e0006183.
48. Stegmeier F, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M (2010). Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Clin Pharmacol Ther* 87(5): 543-552.
49. Dube E, Oluwole DO, Njemuwa N, Prinsloo E, Nyokong T (2019). Photophysicochemical and photodynamic therapy properties of metallophthalocyanines linked to gold speckled silica nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 25: 325-333.

50. Ranyuk E, Cauchon N, Klarskov K, Guerin B, van Lier JE (2013). Phthalocyanine-peptide conjugates: receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy. *J Med Chem* 56(4): 1520-1534.
51. Taratula O, Schumann C, Naleway MA, Pang AJ, Chon KJ, Taratula O (2013). A multifunctional theranostic platform based on phthalocyanine-loaded dendrimer for image-guided drug delivery and photodynamic therapy. *Mol Pharm* 10(10): 3946-3958.
52. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 61(4): 250-281.
53. Kessel D, Oleinick NL (2010). Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol Biol* 635: 35-46.
54. Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
55. Glick D, Barth S, Macleod KF (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221(1): 3-12.
56. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776(1): 86-107.
57. Manoto SL, Houreld N, Hodgkinson N, Abrahamse H (2017). Modes of Cell Death Induced by Photodynamic Therapy Using Zinc Phthalocyanine in Lung Cancer Cells Grown as a Monolayer and Three-Dimensional Multicellular Spheroids. *Molecules* 22(5).
58. Mehraban N, Freeman HS (2015). Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials (Basel)* 8(7): 4421-4456.
59. Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126(5): 1011-1022.
60. Norbury CJ, Hickson ID (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.
61. Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
62. Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684): 626-629.

63. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16): 2861-2874.
64. Fulda S, Debatin KM (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25(34): 4798-4811.
65. Walczak H, Krammer PH (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256(1): 58-66.
66. Shi Y (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 13(8): 1979-1987.
67. Porter AG, Janicke RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6(2): 99-104.
68. Yarrow JC, Lechler T, Li R, Mitchison TJ (2003). Rapid de-localization of actin leading edge components with BDM treatment. *BMC Cell Biol* 4: 5.
69. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci* 16(9): 20523-20559.
70. Kessel D, Luo Y (1999). Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 6(1): 28-35.
71. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 1(1): 1-21.
72. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434(7035): 917-921.
73. Jain PG, Patel BD (2019). Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents - A recent update. *Eur J Med Chem* 165: 198-215.
74. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26(8): 882-893.
75. Clark NJ, Kramer M, Muthurajan UM, Luger K (2012). Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes. *J Biol Chem* 287(39): 32430-32439.
76. Edinger AL, Thompson CB (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 663-669.

77. Zhuo Z, Song Z, Ma Z, Zhang Y, Xu G, Chen G (2019). Chlorophyllin e6mediated photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Oncol Rep* 41(4): 2181-2193.
78. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
79. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2004). *Cell Viability Assays*. (Eds: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Trask OJ, Jr., Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X). Assay Guidance Manual Bethesda (MD).
80. Arends MJ, Wyllie AH (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254.
81. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV (1994). A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 170(2): 145-157.
82. Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML (1997). Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 209(2): 111-123.
83. Gerber IB, Dubery IA (2003). Fluorescence microplate assay for the detection of oxidative burst products in tobacco cell suspensions using 2',7'-dichlorofluorescein. *Methods Cell Sci* 25(3-4): 115-122.
84. Brubacher JL, Bols NC (2001). Chemically de-acetylated 2', 7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 251(1-2): 81-91.
85. Riahi R, Yang Y, Zhang DD, Wong PK (2012). Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *J Lab Autom* 17(1): 59-65.
86. Mahmood T, Yang PC (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4(9): 429-434.
87. Sari C, Eyupoglu FC, Degirmencioglu I, Bayrak R (2018). Synthesis of axially disubstituted silicon phthalocyanines and investigation of photodynamic effects on HCT-116 colorectal cancer cell line. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 23: 83-88.

88. Liu YQ, Meng PS, Zhang HC, Liu X, Wang MX, Cao WW, Hu Z, Zhang ZG (2018). Inhibitory effect of aloe emodin mediated photodynamic therapy on human oral mucosa carcinoma in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother* 97: 697-707.
89. Wang FX, Chen MH, Lin YN, Zhang H, Tan CP, Ji LN, Mao ZW (2017). Dual Functions of Cyclometalated Iridium(III) Complexes: Anti-Metastasis and Lysosome-Damaged Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 9(49): 42471-42481.
90. Wyss P, Schwarz V, Dobler-Girdziunaite D, Hornung R, Walt H, Degen A, Fehr M (2001). Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer. *Int J Cancer* 93(5): 720-724.
91. Dos Santos AF, Terra LF, Wailemann RA, Oliveira TC, Gomes VM, Mineiro MF, Meotti FC, Bruni-Cardoso A, Baptista MS, Labriola L (2017). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer* 17(1): 194.
92. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, Colussi V, Kenney ME, Cooper KD, Oleinick NL (2007). Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 224(3): 290-299.
93. Yoon I, Li JZ, Shim YK (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc* 46(1): 7-23.
94. Orenstein A, Kostenich G, Roitman L, Shechtman Y, Kopolovic Y, Ehrenberg B, Malik Z (1996). A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. *Br J Cancer* 73(8): 937-944.
95. Nowak-Stepniowska A, Pergol P, Padzik-Graczyk A (2013). [Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications]. *Postepy Biochem* 59(1): 53-63.
96. Nyman ES, Hynninen PH (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 73(1-2): 1-28.
97. Friberg EG, Cunderlikova B, Pettersen EO, Moan J (2003). pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett* 195(1): 73-80.



98. Moan J, Peng Q, Evensen JF, Berg K, Western A, Rimington C (1987). Photosensitizing efficiencies, tumor- and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem Photobiol* 46(5): 713-721.
99. Margaron P, Gregoire MJ, Scasnar V, Ali H, van Lier JE (1996). Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 63(2): 217-223.
100. Boyle RW, Dolphin D (1996). Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 64(3): 469-485.
101. Holliday DL, Speirs V (2011).. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13(4): 215.
102. Liu K, Newbury PA, Glicksberg BS, Zeng WZD, Paithankar S, Andrechek ER, Chen B (2019). Evaluating cell lines as models for metastatic breast cancer through integrative analysis of genomic data. *Nat Commun* 10(1): 2138.
103. Bologna G, Lanuti P, D'Ambrosio P, Tonucci L, Pierdomenico L, D'Emilio C, Celli N, Marchisio M, d'Alessandro N, Santavenere E, Bressan M, Miscia S (2014). Water-soluble platinum phthalocyanines as potential antitumor agents. *Biometals* 27(3): 575-589.
104. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Jr., Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50(18): 6075-6086.
105. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13(3): 978-988.
106. Brauns SC, Dealtry G, Milne P, Naude R, Van de Venter M (2005). Nov-Dec. Caspase-3 activation and induction of PARP cleavage by cyclic dipeptide cyclo(Phe-Pro) in HT-29 cells. *Anticancer Res* 25(6B): 4197-4202.
107. Furre IE, Moller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q (2006). Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 11(11): 2031-2042.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

<b>Soyadı, Adı</b>	NALÇAOĞLU, Aleyna
<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Doğum tarihi ve yeri</b>	04/10/1994, Trabzon
<b>Medeni hali</b>	Bekar
<b>Telefon</b>	0462 278 2711
<b>E-Posta</b>	aleynanalca@gmail.com
<b>Yazışma adresi</b>	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

### EĞİTİM BİLGİLERİ

<b>Derece</b>	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	Halen
<b>Lisans</b>	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
<b>Lise</b>	Atatürk Sağlık Lisesi	2012

### YABANCI DİL

İngilizce (YÖKDİL: 76.25)