



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AMİNOFENOLTİYOETANOL ÇEVRELİ YENİ
SİLİSYUM FTALOSİYANİNLERİN FARKLI
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ
FOTODİNAMİK TERAPİ (PDT)
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ceren SARI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AMİNOFENOLTİYOETANOL ÇEVRELİ YENİ
SİLİSYUM FTALOSİYANİNLERİN FARKLI
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ
FOTODİNAMİK TERAPİ (PDT)
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ceren SARI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2021

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ceren SARI'nın hazırladığı “Aminofenoltiyetanol Çevreli Yeni Silisyum Ftalosyaninlerin Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki Fotodinamik Terapi (PDT) Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.07.2021

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 Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve 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 kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06/07/2021
Ceren SARI

İthaf

Doktora tezimi; kötülerin dünyasında iyi olarak kalabilmenin tek yolunun, hangi koşulda ve kimlerle karşı karşıya olduğuna bakmaksızın dik durmaktan geçtiğini öğreten babama ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamı gerçekleştirirken tecrübesiyle her daim yanımda olan, fikir veren, yol gösteren ve bana karşı güveninden hiçbir zaman tereddüt etmediğim değerli tez danışmanım Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan KALAY, Dr. Öğr.Üyesi Tuba DİNÇER, Dr. Öğr.Üyesi Bayram TORAMAN ve Dr. Öğr.Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim. Çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. İsmail DEĞİRMECİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

İnişler ve çıkışlarla dolu olan bu akademik yolculukta birlikte çalışmış olmaktan keyif aldığım, beni tüm inişlerde yukarıya doğru çeken, kişisel ve akademik hayatımda dostum olarak kalacaklarına inandığım Dr. Ceren SÜMER, Dr. Öğr. Üyesi Gülden BUDAK, Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL, Dr. Pelin KÜÇÜK TETİK'e ve değerli ailelerine tüm samimiyetimle teşekkür ederim. Bu süreçte plansızca karşılaştığım zorluklar karşısında yanımda olan ve birlikteyken kendimi her daim iyi hissettiğim Dr. Adem YILDIRIM ve çok değerli eşi Cemile KARABOĞA YILDIRIM'a gönülden teşekkür ederim. Birlikte çalıştığımız süre boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Asiye Büşra BOZ ER'e ve İdris ER'e teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimde yanımda olan tüm bölüm arkadaşlarıma katkıları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca almış olduğum tüm kararlarda arkamda duran, bana olan inançlarını daima koruyan, her türlü zorluğu çekilir kılan ve onlara sahip olduğum için kendimi dünyanın en şanslı insanı hissettiğim anne ve babam Necle-Vehbi SARI'ya, ablam ve değerli eşi Selcen SARI AYTEKİN – Sabri AYTEKİN'e sonsuz teşekkür ederim. Son olarak, hayatıma sihirli değneği ile dokunup harikalar diyarına çeviren dünya tatlısı yeğenim Aren AYTEKİN'in varlığına minnettarım.

Bu çalışmayı 219S120 numaralı proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Ceren SARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xii

ÖZET

xv

ABSTRACT

xvi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

2

2.1. Meme Kanseri

2

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

3

2.1.2. Etiyoloji

3

2.2. Fotodinamik Terapi (PDT)

4

2.2.1. PDT'nin Etki Mekanizması

5

2.3. Fotosensitizer Maddeler

6

2.3.1. Ftalosiyaninler

8

2.3.2. Schiff Bazları

8

2.4. Işık Kaynağı

10

2.5. PDT ile Uyarılan Hücre Ölümü

11

2.5.1. Apoptoz

11

2.5.2. Otofaji

13

2.5.3. Nekroz

14

2.6. Poli (ADP Riboz) Polimeraz (PARP) ve PDT İlişkisi

15

2.7. Fotosensitizer Maddelerin Sentezine Yönelik Ön Veriler

17

3. GEREÇ ve YÖNTEM

19

3.1. Gereç

19

3.1.1. Hücre Hatları

19

3.1.2. Kimyasallar	19
3.1.3. Kitler	19
3.1.4. Sarf Malzemeler	20
3.1.5. Cihazlar	20
3.1.6. Solüsyonlar ve Besiyerleri	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	22
3.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının Belirlenmesi	22
3.2.3. PDT Yöntemi	23
3.2.4. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Analizi	23
3.2.5. Annexin V/7AAD Boyama Yöntemi ile Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi	24
3.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki Değişimlerin İncelenmesi	24
3.2.7. Hücre İçi ROS Oluşumunun Mikroskopik Olarak Analiz Edilmesi	25
3.2.8. Kesilmiş (Cleaved) PARP1 Analizi	25
3.2.9. Koloni Formasyon Analizi ile Hücrelerin Koloni Oluşturma Kabiliyetlerinin İncelenmesi	26
3.2.10. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Yöntemi ile Hücre Hareketinin İncelenmesi	26
3.2.11. Transwell Migrasyon Assay ile Hücre Migrasyon Kabiliyetindeki Değişimlerin İncelenmesi	27
3.2.12. Matrijel İnvazyon Assay ile Hücre İnvazyon Kabiliyetindeki Değişimlerin İncelenmesi	28
3.2.13. İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR	30
4.1. Hücrelerin Kültürdeki Özellikleri ve Morfolojileri	30
4.2. Hücrelerin İkilenme Zamanları	30
4.3. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	30
4.4. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Oluşturduğu Apoptotik Popülasyonların Annexin V/7AAD Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi	34
4.5. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Olan Etkilerinin Belirlenmesi	38
4.6. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücre İçi ROS Oluşumuna Etkisinin Mikroskopik Olarak İncelenmesi	39

4.7. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Kesilmiş (Cleaved) PARP1 Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi	40
4.8. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Koloni Oluşturma Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi	44
4.9. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Hareket Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi	47
4.10. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Migrasyon Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi	51
4.11. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin İnvazyon Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Meme anatomisi	2
Şekil 2. PDT'nin fotofiziksel ve fotokimyasal mekanizmaları	6
Şekil 3. Schiff bazlarının sentez şeması	9
Şekil 4. Farklı dalga boylarındaki ışığın dokulardaki yayılımı	10
Şekil 5. Apoptotik yollar ve ilişkili hücresel yapılar	12
Şekil 6. 5A bileşiğinin eldesi	18
Şekil 7. 5B bileşiğinin eldesi	18
Şekil 8. Farklı dozlardaki 5A ve 5B muamelesinin karanlık ortamdaki hücre canlılığına etkisi	32
Şekil 9. Farklı dozlardaki 5A ve 5B muamelesinin PDT sonrası hücre canlılığına etkisi	33
Şekil 10. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gerçekleşen apoptotik hücre popülasyonlarındaki yüzdelik değişimler	38
Şekil 11. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gelişen mitokondriyal membran potansiyeli değişimleri	39
Şekil 12. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gerçekleşen kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimler	44
Şekil 13. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi	47
Şekil 14. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının yara alanındaki değişimlere etkisi	51
Şekil 15. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının migrasyondaki değişimlere etkisi	54
Şekil 16. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının invazyondaki değişimlere etkisi	57

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Hücre hatlarının büyüme eğrileri ve ikilenme zamanları	30
Resim 2.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi	35
Resim 3.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi	36
Resim 4.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi	37
Resim 5.	MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında PDT'nin neden olduğu ROS oluşumunun konfokal mikroskop görüntüleri	40
Resim 6.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi	41
Resim 7.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi	42
Resim 8.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi	43
Resim 9.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi	45
Resim 10.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi	45
Resim 11.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi	46
Resim 12.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi	48
Resim 13.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi	49
Resim 14.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi	50
Resim 15.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi	52

Resim 16.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi	52
Resim 17.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi	53
Resim 18.	MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi	54
Resim 19.	MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi	55
Resim 20.	MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi	56



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

5A, 5B	Aminofenoltiyetanöl çevreli silisyum ftalosiyanınler
7-AAD	7-amino-aktinomisin D
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AKT	Protein kinaz B
AMPK	5'-adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
Bak	Bcl-2 homolog antagonist öldürücü
Bax	Bcl ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücre lenfoma 2
BER	Baz eksizyon onarımı
BRCA	Meme kanseri geni
BSA	Bovın serum albümin
CHOP	C/EBP homolog protein
DISC	Ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Endo G	Endonükleaz G
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal bovin serum
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
H₂DCFDA	2', 7'-diklorofloresan diasetat
hEGF	İnsan epidermal büyüme faktörü
HIF1α	Hipoksi ile indüklenebilen faktör-1
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz

MCF-10A	Normal meme epitel hücreleri
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	M.D. Anderson metastatik meme kanseri
mTOR	Rapamisinin memeli hedefi
MTT	Methylthiazole tetrazolium
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDT	Fotodinamik terapi
Pen/strep	Penisilin/streptomisin
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SiPc	Silisyum ftalosiyanın
TRAIL	TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV-IR	Ultraviyole ışınlama
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Simgeler	
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
g	Gram
j/cm²	Jul/santimetre kare
kDA	Kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece

Formüller

$^1\text{O}_2$	Reaktif singlet oksijen
N_2	Nitrojen
NAH	Sodyum hidrür
SiPCCl_2	Silisyum Ftalosiyenin Diklorür



ÖZET

Aminofenoltiyetanol Çevreli Yeni Silisyum Ftalosyaninlerin Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki Fotodinamik Terapi (PDT) Etkinliğinin Araştırılması

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve metastatik özelliklerin kazanılması ile karakterize patolojik bir durumdur. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser olarak dünya genelinde ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Meme kanserindeki yeni tedavi arayışlarında, klasik tedavilere ek olarak kanser hücrelerini seçici şekilde öldürebilen yöntemler üzerinde durulmaktadır. Bunlar içinde en çok araştırılan yöntemlerden biri de fotodinamik terapidir (PDT). Belirli bir dalga boyundaki ışığın ve bu ışığa duyarlı olan moleküllerin birlikte kullanıldığı PDT’de, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle hücre hasar meydana gelir ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu tez çalışmasında, ilk kez sentezlenen aminofenoltiyetanol çevreli yeni silisyum ftalosyanin (SiPc) moleküllerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A normal meme hücre hattındaki PDT etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, SiPc moleküllerinin hem kanser hücreleri hem de normal hücreler üzerindeki antiproliferatif, antitümöral ve antimigratif özellikleri belirlenmiştir. Hücre canlılığı ve hücre ölümü çalışmalarıyla SiPc moleküllerinin kanser hücrelerinde doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği ve hücre ölümünü indüklediği gözlenmiştir. Bu moleküllerin PDT ile kullanılması halinde hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı, hücre içi ROS oluşumuna neden olduğu ve farklı hücre ölüm süreçlerinde rol alan poli ADP riboz polimeraz 1 (PARP1)’in kesilmiş formunun ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır. Ayrıca, kanser hücrelerinin uzun süreli kültürlerindeki koloni oluşumunun ve yara iyileşmesi modeli kullanılarak incelenen hücre hareketi azaldığı belirlenmiştir. Transwell sistemler ile modellenen migrasyon ve invazyon deneylerinde ise kanser hücre hatlarının migratif ve invaziv kabiliyetlerinin kısıtlandığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması ile yeni sentezlenmiş olan SiPc moleküllerinin antitümöral özellikleri ilk kez belirlenmiş ve bu moleküllerin tedavide kullanılmak üzere ilaç adayı moleküller olabileceklerine dair ilk veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Fotosensitizer ajanlar, Reaktif oksijen türleri, Toksisite

ABSTRACT

Investigation of Photodynamic Therapy (PDT) Efficiency of Novel Aminophenol Thioethanol Substituted Silicon Phthalocyanines on Different Breast Cancer Cell Lines

Cancer is a pathological condition characterized by uncontrolled cell growth and metastatic properties. Breast cancer is the most common type of cancer in women and causes a serious health problem worldwide. Among the treatment studies in breast cancer, the methods that can selectively kill cancer cells are emphasized. One of the most prominent methods is photodynamic therapy (PDT). In PDT, light-sensitive molecules and light at certain wavelengths are used together, cellular damage occurs upon the production of reactive oxygen species (ROS), thus cell death happens. In this study, we aimed to investigate the PDT activity of novel aminophenolthioethanol-substituted silicon phthalocyanines (SiPc) in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and MCF-10A normal breast cell line. In this context, antiproliferative, antitumoral, and antimigrative properties of SiPc molecules were determined. In the cell viability and cell death studies, it was observed that SiPc molecules exhibited a dose-dependent cytotoxic effect on cancer cells and induced cell death. When these molecules are used in combination with PDT, it has been observed that they reduce the mitochondrial membrane potential in cells, cause intracellular ROS formation and increase the cleaved form of poly ADP ribose polymerase 1 (PARP1), which is involved in different cell death processes. It was also determined that cancer cells reduce their colony-forming properties in long-term culture and restrict cell movement, which was studied using wound healing model. Transwell-modeled migration and invasion experiments determined that cancer cell lines limit their migration and invasion capabilities. To conclude, antitumoral properties of the newly synthesized SiPc molecules were determined for the first time and preliminary data showed that these molecules could be drug candidates in treatment.

Key Words: Apoptosis, Photosensitizing agents, Reactive oxygen species, Toxicity

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Erken semptomların yetersizliği meme kanseri tanısını geciktirmekte ve bu durum tedavinin de gecikmesine neden olmaktadır (1). Günümüzde tedavi amaçlı uygulanan ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler sağ kalımı desteklese de hastada ciddi akut ve kronik yan etkiler oluşturmaktadır (2). Güncel kanser tedavileri arayışında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, istenmeyen yan etkileri azaltacak ve en etkili terapötik sonucu sağlayacak yöntemleri uygulamaktır. Fotodinamik terapi (PDT), son yıllarda gerçekleştirilen anti kanser tedavi çalışmaları arasında invaziv olmayan ve oldukça seçici bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. PDT, belirli bir dalga boyundaki ışığın ve bu ışık ile uyarılan fotosensitizer moleküllerin, hücre içindeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini hızlandırdığı ve sonuç olarak kanser hücrelerini seçici şekilde öldürdüğü uygulamaları içerir. Tek başına tedavi edici özelliği bulunan PDT'nin; kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yaklaşımların etkisini artırmak için kombine tedavi yaklaşımı olarak da kullanıldığı bilinmektedir (3).

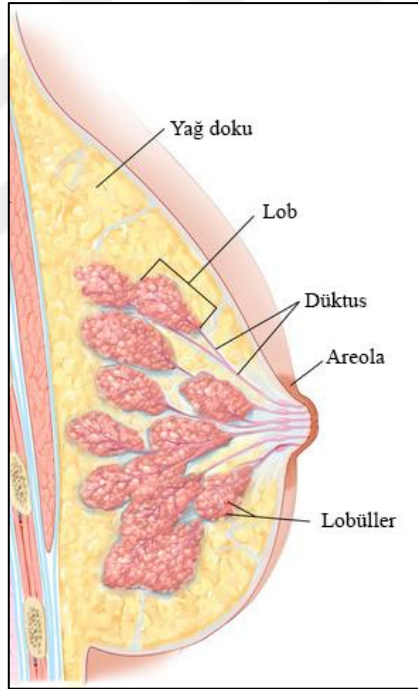
PDT odaklı yaklaşımlardaki en önemli değişken, kullanılmakta olan ışığa duyarlı fotosensitizer moleküllerdir. Bu moleküller içinde gruplandırılan ftalosiyanimler, PDT etkinliği yüksek olan ve anti kanser çalışmalarda etkili sonuçlar veren fotosensitizer moleküller olarak bilinmektedir (4). Ftalosiyanim halkasına aksiyal ve periferik konumlarından farklı kimyasal modifikasyonlar uygulanabilmekte ve bu şekilde fotokimyasal, fotofiziksel ve optik özelliklerinde istenen değişiklikler yapılabilmektedir. Çalışmamızda, aminofenoltioetanol çevreli yeni silisyum ftalosiyanim (SiPc) moleküllerinin PDT ile MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A normal meme hücre hattında oluşturduğu antiproliferatif ve antitümöral etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında ilk olarak, aminofenoltioetanol çevreli SiPc moleküllerinin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında doza bağlı olarak gerçekleşen sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmiştir. Hücrelerdeki kesilmiş poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) oluşumu ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler tespit edilmiştir. Hücre içerisindeki ROS oluşumu konfokal mikroskop ile analiz edilmiştir. Hücrelerin koloni oluşturma, hareket, migrasyon ve invazyon kabiliyetlerindeki değişimler incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme yapısı; glandüler, duktal, bağ ve yağ dokulardan oluşmaktadır. Memenin fonksiyonel birimi, yağ doku ile çevrili epitelyal kanallardan oluşan meme bezidir. Glandüler ve yağ dokular, bağ dokusu tarafından bir arada tutulur. Kadınlarda meme ucundan çıkan çok sayıda lob, daha küçük yapıdaki lobüllere sahiptir. Bu meme lobüllerinde, hormonal sinyallere yanıt olarak süt üretiminin gerçekleştiği terminal duktal lobüler ünite bulunur. Erkeklerdeki meme yapısı anatomik olarak kadın memesine benzese de loblar, süt üreten bezler, kanallar ve sütü lobüllerden meme uçlarına taşıyan terminal duktal lobüler ünite yoktur (5) (Şekil 1).



Şekil 1. Meme anatomisi (Paruch'tan, 6)

Meme kanseri, kadınlarda yaygın olarak görülen ve yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Tümöral yapının bulunduğu bölgeye göre invaziv ve invaziv olmayan meme kanseri olmak üzere ikiye ayrılır. İnvaziv olmayan kanserlerde tümör hücreleri, bulunduğu lobül veya kanallardan dokuya uzanmamış haldedir. İnvaziv meme kanserlerinde ise, lobüllerin veya süt kanallarının içindeki kanser hücreleri meme dokusunun çevresine doğru ilerlemiştir. İnvaziv kanserde hücreler, bağışıklık sistemi veya sistemik dolaşım yoluyla vücudun farklı

bölgelerine geçebilmektedir. İnvaze olan kanser hücreleri, ikincil organlarda yeni kanser türlerine neden oldukları için daha tehlikelidir. Bu hücreler genellikle akciğer, karaciğer, beyin ve kemiklere yayılım gösterir (7).

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Meme kanseri, dünya çapında yaygın olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Kanser Ajansı'nın (IARC) ortaklığında hazırlanmış olan global kanser verilerine göre, akciğer kanserinden sonra en çok görülen kanser türü, vakaların %11.6'sını oluşturan meme kanseridir. Meme kanseri, kadınlardaki kanserlerin %24.2'sini oluşturur ve kadınlarda en sık görülen kanser türü olma özelliğini gösterir. Kanser kaynaklı ölümlerde ise akciğer kanseri ilk sıradayken, %6.6 oranıyla meme kanseri ikinci sırada yer alır (8).

Güncel verilere göre meme kanseri insidansının en yüksek olduğu ülkeler, Avrupa ve Kuzey Amerika ülkeleridir. İnsidansın en düşük olduğu ülkeler ise Güney Asya ülkeleri ile Orta Afrika, Doğu Afrika ve Batı Afrika ülkeleridir (8).

2.1.2. Etiyoloji

Meme kanseri etiyolojisi çok faktörlüdür. Çevresel faktörlerin yanı sıra, hormonal etkiler ve gen düzeyindeki değişimler de meme kanseri oluşumunda rol oynar (9, 10).

Aile öyküsü, meme kanseri etiyolojisinde ilk akla gelen faktörlerden biridir. Ailesinde meme kanseri öyküsü bulunan kadınlarda, bu hastalığa yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Meme kanserine yakalanmış birinci dereceden bir akrabası olan kadınlarda bu risk yaklaşık iki kat, birinci dereceden iki akrabası olan kadınlarda ise yaklaşık beş kat artar (11). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'unun meme kanseriyle ilişkili BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir. Kalıtsal BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların, 70 yaşına kadar göğüs kanserine yakalanma olasılığı %50 civarındadır (11-13).

Östrojen maruziyeti kadınlarda artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle menopozdan sonra beş yıldan fazla hormon replasman tedavisi gören kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı bilinmektedir (9, 10). Kadınlarda östrojeninin çoğu yumurtalıklar tarafından üretilse de yağ dokusu bazı hormonları östrojene dönüştürebilmektedir. Fazla yağ dokusuna sahip olmak, kadınlarda östrojen düzeyini yükselterek meme kanserine yakalanma olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle, obezite veya

yüksek yağ içeren beslenme stilinin uygulanması meme kanserinde risk faktörü olarak kabul edilmektedir (10, 14).

Irka dayalı genetik farklılıklar ve beslenme kültüründeki değişiklikler, alkol ve sigara kullanımı, egzersiz eksikliği ve çevre kirliliği gibi faktörlerin de meme kanseri risk oranını etkilediği bilinmektedir (15).

2.2. Fotodinamik Terapi (PDT)

PDT, normal koşullarda toksik olmayan ve yalnızca belirli dalga boyundaki ışık ile aktifleşen bir fotosensitizer maddenin sistemik, lokal veya topikal olarak uygulanması esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Işık ile uyarılan moleküller, hedef dokularda reaktif oksijen türlerinin (radikaller, singlet oksijen, triplet türler) oluşumuna neden olarak hücre ölümüne ve doku harabiyetine yol açmaktadır (16-18).

PDT'nin temelleri, 1960 yılında Lipson ve arkadaşları tarafından hematoporfirin türevinin keşfedilmesi ile atılmış, Dougherty ve arkadaşlarının hem temel bilimlerde hem de klinik uygulamalarda gerçekleştirdiği öncü çalışmalar ile geliştirilmiştir (19-22). Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA), 1980'li yıllarda hematoporfirin türevi olan "Photofrin" isimli ilacın klinik uygulamasına onay vermesini takiben preklinik ve klinik çalışmalarda kullanılmak üzere çeşitli fotosensitizerler geliştirilmiş ve bazılarının farklı kanser türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (23-30). PDT'nin günümüzdeki klinik uygulamalarının en yaygın olduğu alan dermatolojidir. Bowen hastalığı, skuamöz hücreli karsinom, yüzeysel bazal hücreli karsinom, aktinik keratoz ve kutanöz B hücreli lenfoma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (31-41). Yüzeysel onkolojik lezyonlarda invaziv bir yaklaşım içermeyen ve etki düzeyi yüksek olan PDT, fiber optik sistemlerle birleştirilen lazerler gibi ışık kaynakları sayesinde mesane, yumurtalıklar, sindirim kanalları veya beyin gibi derin yerleşimli tümörlere de erişim sağlayabilmektedir (42-44).

PDT tek başına uygulanabildiği gibi cerrahi, kemoterapi, radyoterapi veya immünoterapi gibi diğer terapötik yöntemler ile kombinasyon halinde de kullanılabilir (45, 46). Kemoterapötik ilaçlarla PDT kombinasyonunun sinerjistik etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (47, 48). Kombine tedavide düşük konsantrasyonlarda kemoterapötik kullanılarak kanser hücrelerini öldürmek mümkündür. Bu durum, ortaya çıkabilecek yan etki riskini de azaltmaktadır (44, 49). Ayrıca, kanser hücrelerinde radyoterapi ve kemoterapiye karşı gelişen direnç neden olan mutasyonların çoğu, PDT'ye karşı direnç oluşturmaz. Böyle bir durumda, geleneksel tedaviden sonra

nükseden tümörlere karşı PDT kullanımının son derece etkili olacağı görüşü hakimdir. PDT, tümör rezeksiyonunun ardından kullanıldığında ise temizlenen tümöral dokudan geriye kalan kanser hücrelerini yok etmeye yardımcı olmaktadır (17, 50, 51).

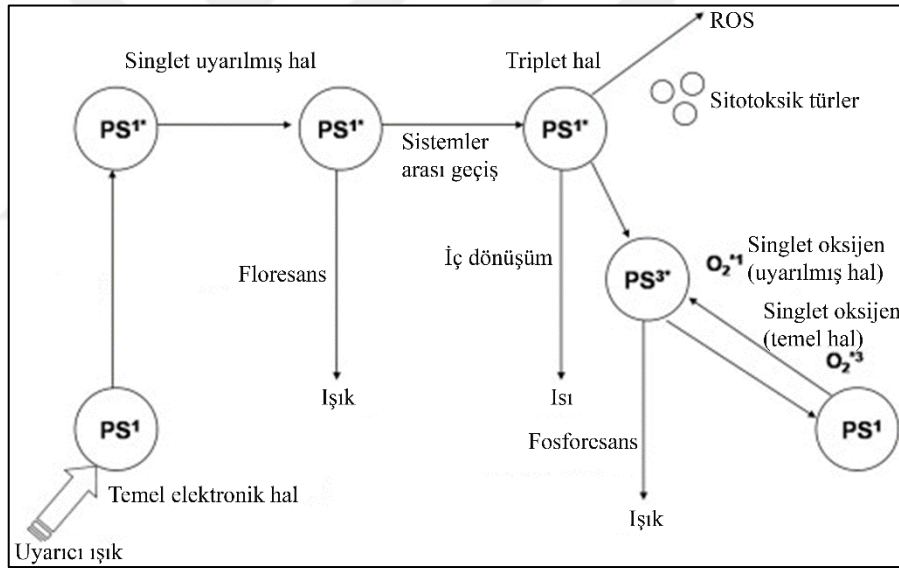
PDT'nin geleneksel anti kanser tedavilere kıyasla en önemli avantajı hem fotosensitizere hem de ışığa maruz kalan fonksiyonel dokular üzerindeki zayıf toksik etkileri ve düşük sistemik toksisite sayesinde normal dokuları koruma yeteneğidir (52, 53). Ayrıca, tümöral dokularda biriken fotosensitizerin ışıkla aktive olması sonucu oluşan singlet oksijen molekülleri, genellikle kısa yarı ömürleri ve 20-200 nanometre arasında değişen etki yarıçapları ile hücre içinde sınırlı kalır. Bu nedenle foto aktivasyonu takiben sadece fotosensitizer molekülleri biriktiren tümör hücreleri zarar görmektedir (52, 54-56). PDT'nin antitümöral etkileri, tümör hücreleri üzerinde oluşan sitotoksosite ve tümör vaskülaritesinde hasar meydana gelmesi ile karakterizedir. PDT uygulaması ile sistemik bağışıklığın gelişmesine yol açabilecek güçlü bir inflamatuvar reaksiyonun oluşumu bu etkiyi tamamlar. Ayrıca, hücre içindeki nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi biyomoleküllerin oksidasyonunu sağlayarak, farklı sinyalleşme kaskadlarının işleyişinde değişimlere neden olmaktadır (16, 57).

2.2.1. PDT'nin Etki Mekanizması

PDT, biyolojik bir etki oluşturmak için fotofiziksel ve fotokimyasal süreçleri birleştirir. Fotosensitizerin ışıkla uyarıldığı fiziksel süreç, uyarılmış fotosensitizerin hücresel substratlar veya moleküler oksijen ile fotokimyasal reaksiyonu neticesinde kanser hücrelerinin ölümü ile sonuçlanmaktadır (58).

Temel elektronik haldeki fotosensitizer, düşük enerjili moleküler orbitalde zıt dönüşlerde iki elektrona sahiptir. Işığın emilmesi üzerine bu elektronlardan biri, dönüşünü değiştirmeden daha yüksek enerjili moleküler yörüngeye uyarılır (singlet uyarılmış hal). Singlet uyarılmış haldeki fotosensitizerler kısa ömürlüdür, bu nedenle hücresel substratlar ile reaksiyona giremez. Uyarılmış fotosensitizer temel hale geri dönmek için ya ışık biçiminde enerji yayar (floresans) ya da iç dönüşüm yoluyla ortama ısı enerjisi vererek bozunmaya uğrar. Bunun yanı sıra, singlet uyarılmış haldeki fotosensitizer sistemler arası geçişe de uğrayabilir. Sistemler arası geçişte, uyarılmış elektronun dönüşü tersine çevrilir. Böylece, nispeten daha uzun ömürlü olan uyarılmış triplet hali oluşturabilir. Ayrıca triplet haldeki fotosensitizer temel haline geri dönmek için, enerjisini ışıma ile (fosforesans) veya ısı şeklinde açığa çıkararak dağıtır (58) (Şekil 2).

Biyolojik ortamda gerçekleşen PDT esnasında, uyarılmış triplet haldeki fotosensitizer iki tür reaksiyona uğrayabilir. İlk olarak, elektronların transferi yoluyla hücrel substratlarla (hücre zarı veya hücre içinde görevli farklı biyomoleküller) doğrudan reaksiyona girerek ROS oluşturmaktadır (Tip I reaksiyon). Bir diğer reaksiyonda ise, enerjiyi moleküler oksijene aktararak reaktif singlet oksijenin (1O_2) oluşumuna yol açmakta (Tip II reaksiyon) ve ortaya çıkan singlet oksijen, hücrel zarlarda bulunan lipidler ve proteinler gibi biyomoleküllere yüksek düzeyde zarar vermektedir. Her iki reaksiyonda da biyomoleküllere verilen hasar nekroz, apoptoz veya otofaji ile sonuçlanan tümör hücrelerinin ölümü, vasküler tahribat sonrası oluşan tümör iskemisi ve tümör antijenlerine karşı immün yanıtın oluşturulmasını tetikler. Tip I ve Tip II reaksiyonlar aynı anda meydana gelebilmekte ve bu süreçlerin gerçekleşme sıklığı kullanılan fotosensitizerin türüne, substrat ve oksijen konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir (23, 46, 58).



Şekil 2. PDT'nin fotofiziksel ve fotokimyasal mekanizmaları (Robertson'dan, 59)

2.3. Fotosensitizer Maddeler

PDT'deki temel unsurlardan biri, belirli dalga boylarındaki ışığı absorbe ederek singlet oksijen ve ROS oluşturan reaksiyonları tetikleyen fotosensitizer maddelerdir. Araştırmacılar, PDT tedavisi için onaylanmış ilk fotosensitizer olan Photofrin'in ardından daha verimli fotosensitizerlerin sentezlenmesi için çalışmalarına devam etmektedir. İdeal bir fotosensitizerin; yüksek düzeyde kimyasal saflık, oda sıcaklığında stabilite, kolay sentezlenebilirlik, yalnızca belirli bir dalga boyunda aktifleşme, karanlık koşullarda

minimum sitotoksiste, vücut dokularında kolay çözünürlük, neoplastik dokular için yüksek seçicilik ve yüksek fotokimyasal reaktivite gösterebilme gibi özelliklere sahip olması istenir. Fotosensitizerlerin maksimum ışık absorpsiyonu 600-800 nm dalga boyları arasında olmalıdır. 800 nm'nin üzerinde bir dalga boyundaki ışığın absorbe edilmesi, singlet oksijen ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarmak için gerekli enerjiyi sağlayamaz (53).

Birinci nesil fotosensitizerler olarak bilinen hematoporfirin ve Photofrin yıllar içinde farklı kanser türleri üzerinde çalışılmış olsa da düşük kimyasal saflıkları, kırmızı ışık bölgesindeki düşük absorpsiyon nedeniyle zayıf doku penetrasyonu, tümör hücrelerine gösterdikleri zayıf seçicilik ve ışığa duyarlılığın uzun süre devam etmesi nedeniyle beklenen etkiyi gösterememiştir (58, 60). Birinci nesil fotosensitizerlerin geliştirilmesi ile yüksek kimyasal saflığa sahip, daha uzun dalga boyunu absorbe edebilen, karanlık sitotoksitesi düşük ve singlet oksijen üretiminde daha yüksek verimliliğe sahip olan ikinci nesil fotosensitizerler ortaya çıkmıştır. İkinci nesil fotosensitizerlerin dezavantajı intravenöz uygulamalarda önemli ölçüde sınırlayıcı bir faktör olan sudaki zayıf çözünürlükleridir (53, 58). Bu nedenle, ikinci nesil fotosensitizerlerin kimyasal karakteristiklerinde yapılan değişiklikler sonucu, tümör dokusuna yüksek afinite gösteren fakat sağlıklı dokularda yoğun bir şekilde birikim yapmayan üçüncü nesil fotosensitizerler ortaya çıkmıştır (53). Tümör hücrelerindeki yüksek metabolik aktivite, vasküler sızıntı, lenfatik drenaj eksikliği, artmış LDL ekspresyonu ve azalmış pH, bu fotosensitizerlerin tümöral dokularda seçici olarak birikmesini sağlayarak, sağlıklı hücrelerde yüksek düzeyde bir tahribata neden olmadan kanser hücrelerinin öldürülmesine yol açar (52, 61). Bunun yanı sıra, farklı nano moleküller ile kompleks haline getirilerek singlet oksijen ve ROS oluşturma kapasitelerinin artırılması, bu fotosensitizerlerin sitotoksik verimini oldukça yükseltmektedir (62).

Günümüzde araştırılmakta olan pek çok fotosensitizer, hücrenin farklı kısımlarında birikim göstermektedir. Bu nedenle, fotosensitizer moleküllerin membran afinitesi, tümör dokusundaki lokalizasyonları açısından önemlidir. Bir fotosensitizerin membran afinitesi, amfifilik karakteri tarafından belirlenir. Amfifilik özellikler, molekülün çeşitli pozisyonlarında çözücüyle bağımsız olarak etkileşime giren hidrofilik ve hidrofobik grupların mevcudiyeti ile tanımlanır. Amfifilik moleküller, biri su gibi polar çözücüler için yüksek bir afiniteye sahip olan, diğeri ise hidrokarbonlar, eterler ve esterler gibi polar olmayan çözücülere güçlü afinite gösteren iki ayrı kovalent bağlı bileşen içerir. Hidrofilik kısım suda çözünür hale getirilerek ilaç verilmesini kolaylaştırırken, hidrofobik kısım

molekölün hücreye girişini ve birikmesini kolaylaştırır. Bunun yanı sıra, amfifilik özelliği düşük olan fotosensitizerlerde gözlenen agregasyon, moleküllerin triplet yarı ömrünü kısaltmakta ve singlet oksijen kuantum verimini azaltmaktadır. Bu nedenle, amfifilik fotosensitizerler hidrofobik veya hidrofilik fotosensitizerlere kıyasla daha yüksek bir fotodinamik aktiviteye sahiptir (52, 63-68).

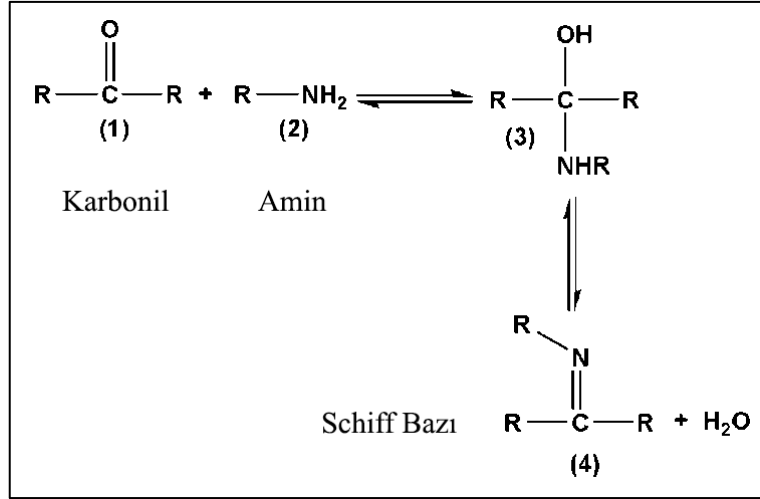
2.3.1. Ftalosiyaninler

Klinik kanser tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış olan Photofrin gibi porfirin bazlı fotosensitizerlerin çoğu, neden oldukları deri fototoksitesisi nedeniyle ftalosiyanin sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (69). Ftalosiyaninler, nitrojen atomları ile bağlanan dört izoindol biriminden oluşan aromatik makro halkalı bileşiklerdir. Kısa dalga boyu aralığındaki (400-600 nm) ışığı güçlü bir şekilde absorbe etmedikleri için güneş ışığına bağlı fototoksitesite riskini barındırmazlar (70). Ftalosiyaninlerin uzun dalga boyundaki absorpsiyonları (600-800 nm) nedeniyle düşük dozlarda kullanılsalar da yüzeysel ve derin yerleşimli tümörleri yok edebilme kabiliyetleri, PDT çalışmalarında bu bileşikleri ön plana çıkarmaktadır (71-74). Ayrıca, ftalosiyaninlerin makro halka yapısı, merkezi boşlukta silisyum, çinko, alüminyum gibi pek çok metal iyonunu barındırabilmektedir. Merkezi metal iyonlarından kaynaklanan yüksek triplet ve singlet oksijen kuantum verimleri, ftalosiyaninleri PDT için ideal fotosensitizerler haline getirmektedir (75).

2.3.2. Schiff Bazları

Tıp, eczacılık, kimya ve endüstri alanlarında yaygın bir kullanımı olan Schiff bazları, ilk olarak 1864 yılında Alman kimyager Hugo Schiff tarafından literatüre kazandırılmıştır. Schiff bazları; aminlerin, aldehit veya ketonlar ile belirli koşullar altındaki kimyasal reaksiyonunun ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Yapısal olarak, aldehit ve ketonlardaki C=O grubu oksijeninin, tepkime sonucu nitrojen ile yer değiştirmesini ve bir su molekülünün açığa çıkmasını içerir. Aldehit ile tepkimesi sonucu azometin bağı oluşurken, keton ile tepkimesi sonucu imin bağı oluşmaktadır (76).

Schiff bazlarının oluşumu, iki ana basamak ile gerçekleşmektedir. Aminlerin karbonil bileşikleriyle reaksiyonu sonucu, ilk etapta bir karbonilamin ara bileşiği oluşur. Elde edilen bu bileşik kararsızdır ve dehidrasyon ile su molekülünü kaybederek Schiff bazını oluşturur (Şekil 3).



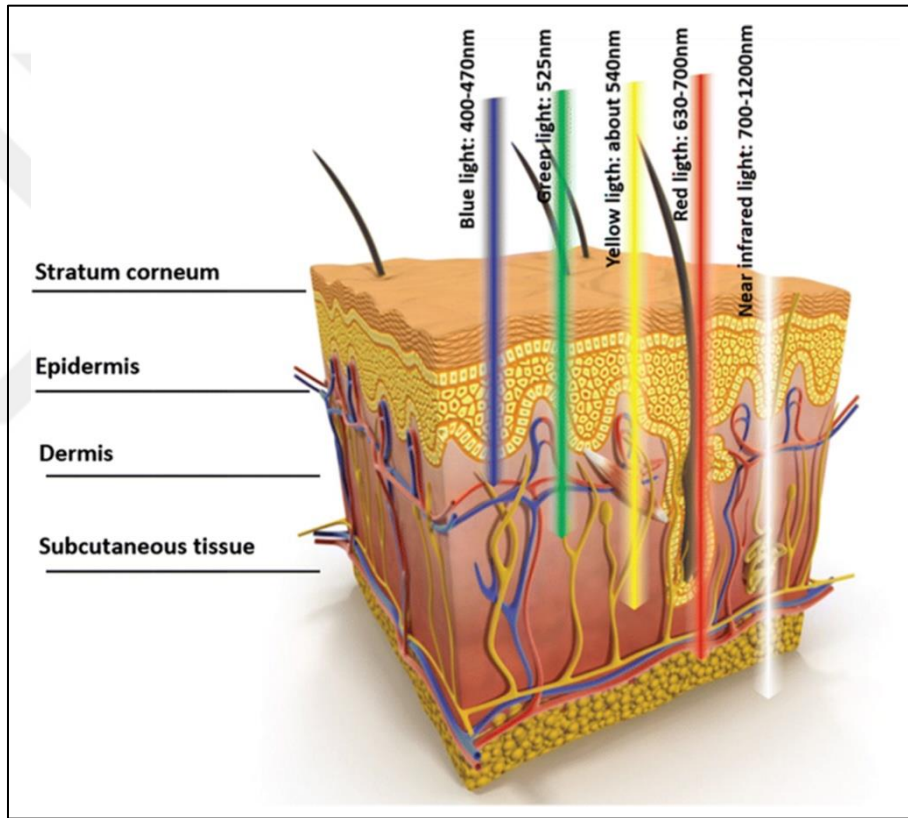
Şekil 3. Schiff bazlarının sentez şeması (Anis'ten, 77)

Ligand olarak kullanılabileceği ilk kez Pfeiffer tarafından gösterilen Schiff bazlarının metalik türevleri antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antitümöral olarak biyolojik sistemlerde uygulanabilirliğe sahiptir. Schiff bazları, düşük pH'da daha hızlı hidrolize olabilen bir bağ yapısına sahiptir. Kanser hücrelerinin, çevre dokulardaki hücelere kıyasla daha düşük pH değerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, Schiff bazları kullanılarak pH'ya duyarlı ilaç taşıma araçlarının tasarımı, kanserde tedavi verimliliğini artırmaktadır. Çalışmalar, küçük moleküller olmasına rağmen farklı biyolojik aktivitelere sahip olan Schiff bazlarının, çeşitli malign tümörlere karşı sitotoksik ajan olarak kullanılabileceğini ve komplekste bulunan metal iyonlarının, bileşiğin etkinliği üzerinde önemli bir role sahip olduğunu bildirmektedir (78-88).

Schiff bazlarının antitümöral etkileri, PDT'deki kullanım alanının temelini oluşturur (76, 89). Özellikle ftalosiyanın çok yönlü kimyasal yapılarının bir sonucu olarak Schiff bazı türevlerinin ftalosiyanın halkasına dönüştürülmesi, kontrollü supramoleküler yapıların oluşumunu sağlayarak bileşiğin işlevselliğini ve uygulanabilirliğini artırır (90, 91). Bu bağlamda, farklı metal merkezli Schiff bazı ligand sistemlerine sahip ftalosiyanın, PDT'de etkili birer anti kanser ajan olarak kullanılması için tüm gereksinimleri karşıladığı düşünülmektedir (76, 89, 92-94). Schiff bazlarının farklı gruplarla kompleks haline getirilen türevlerinin fotosensitizer olarak kullanıldığı ve PDT aracılığıyla farklı kanser türleri üzerinde sitotoksik ve antitümöral etkiler oluşturduğu literatürdeki çalışmalar ile gösterilmiştir (94-97).

2.4. Işık Kaynağı

PDT'nin ana bileşenlerinden biri, fotosensitizer molekülleri etkinleştiren ışıktır. Kullanılması gereken dalga boyu, fotosensitizerin elektron absorpsiyon spektrumuna göre değişmektedir. PDT'nin etkinliği, ışık penetrasyon derinliğine bağlıdır. PDT’de genellikle “terapötik pencere” olarak adlandırılan 600-800 nm dalga boyları arasındaki ışık kullanılır. Bu dalga boyları aralığında derin dokulara penetrasyon sağlanır, ROS ve singlet oksijen üretimi gerçekleşir (Şekil 4). Daha kısa dalga boyları derin dokulara nüfuz edemez, daha uzun dalga boyları ise düşük enerjiye sahip olduğundan singlet oksijen üretemez (49, 98).



Şekil 4. Farklı dalga boylarındaki ışığın dokulardaki yayılımı (Sorbellini'den, 99)

Dermatolojik uygulamalarda gerekli olan geniş aydınlatma alanı, düşük maliyet ve kolay kullanım nedeniyle lazer olmayan ışık kaynakları tercih edilmektedir. Derin yerleşmiş tümörlere erişimde ve dokuya penetrasyonu artırmada, yüzey dokularını aşabilen yüksek enerjili lazerler gereklidir. Lazerler akciğer, mesane ve bağırsak gibi erişimi zor olan bölgelere ulaşmak ve saçılımdan kaynaklanan ışık kaybını azaltmak için bir veya daha fazla fiber optik cihaza bağlanabilir. Fiber optik ve mikroendoskopik teknolojideki gelişmeler

nedeniyle, interstisyel, endoskopik, intraoperatif veya laparoskopik ışık dağıtım sistemleri ile PDT uygulamaları gerçekleştirilmektedir (16, 58, 100, 101).

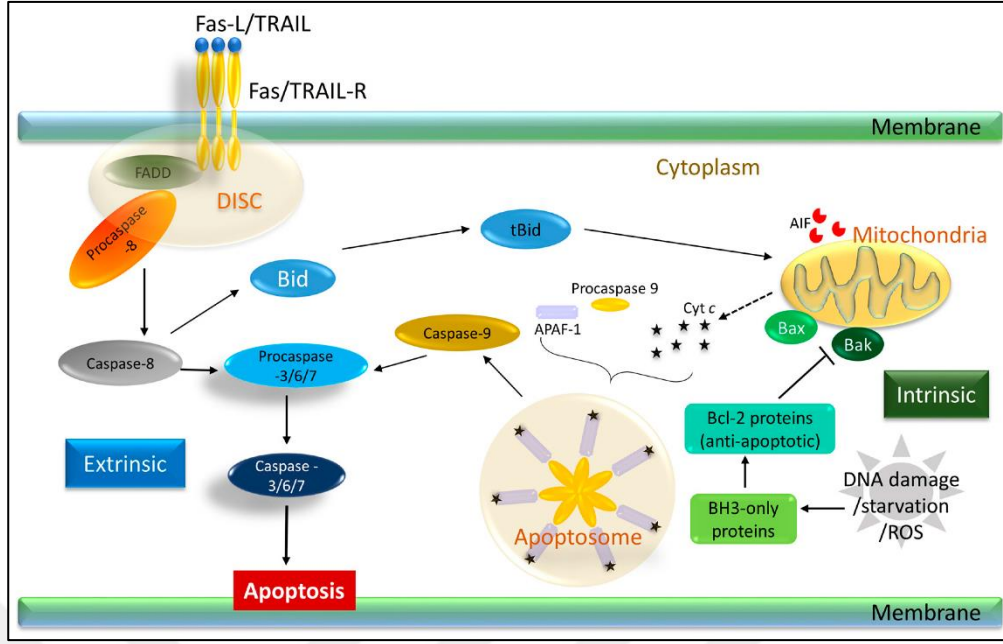
2.5. PDT ile Uyarılan Hücre Ölümü

Hücre ölümü, anormal veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla doku homeostazını sağlayan temel bir biyolojik süreçtir. PDT'nin, apoptotik ve apoptotik olmayan (nekroz veya otofaji gibi) yollarla ilişkili farklı hücresel sinyal yollarını tetikleyerek kanser hücrelerini öldürdüğü bilinmektedir (50). Bunun yanı sıra, kanser hücrelerine besin ve oksijen sağlayan vasküler sisteme zarar vererek kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerini de kısıtlamaktadır (102, 103). PDT'nin hücrelerde oluşturduğu sitotoksik yanıtlar, kullanılan fotosensitizerin biyokimyasal özelliklerine ve konsantrasyonuna, ışık kaynağı ve ışınlanma koşullarına, tedavi edilen hücrelerin genotipi ve oksijen seviyeleri gibi bazı deneysel koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (58).

2.5.1. Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, kanser tedavilerinin birincil hedefidir ve PDT çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. PDT'nin çeşitli antiapoptotik proteinlerin foto hasarını indüklediği ve proapoptotik proteinleri aktive ettiği bilinmektedir (104-110). PDT, fotosensitizerin hücre içi lokalizasyonuna bağlı olarak farklı apoptotik yolları tetikleyebilir. PDT indüklü apoptoz, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile (hücre dışı yolak) ya da sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı yoluyla (hücre içi yolak) başlatılabilir (111-115).

Hücre dışı yolak, ölüm ligandlarının (FasL, TRAIL vb.) hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (Fas, TRAIL reseptörü vb.) bağlanmasıyla tetiklenir. Ölüm reseptörleri bir araya gelerek ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksini (DISC) oluşturur ve başlatıcı kaspaz olan prokaspaz 8'i aktifleştirir. Hücre içi yolda ise mitokondri kritik bir rol alır. Ölüm uyarıları, farklı sinyal yollarını aktive ederek mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesine neden olur. Mitokondriyal zarın geçirgenleşmesi ile intermitokondriyal membran boşluğunda depolanan sitokrom c gibi proapoptotik moleküllerin sitozolik salınımı gerçekleşir. Serbest kalan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanır. Bu kompleks prokaspaz 9 ile bir araya gelerek apoptozu oluşturur. Nihayetinde hem hücre dışı hem de hücre içi yolda kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazlar aktifleşir ve hücresel substratları parçalar (58, 116-120) (Şekil 5).



Şekil 5. Apoptotik yollar ve ilişkili hücresel yapılar (Dasgupta'dan, 118)

Apoptozun gerçekleşmesinde önemli bir fonksiyona sahip olan kaspazlar, korunmuş bir sistein proteaz ailesi üyeleridir. Kaspazlar, katalitik olarak inaktif zimojenlerdir ve apoptoz sırasında proteolitik aktivasyona girerler. Efektör kaspazların (kaspaz 3, 6 veya 7 gibi) aktivasyonu, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 veya kaspaz 9 gibi) tarafından gerçekleştirilir. Aktifleşen kaspazlar aşağı yönlü bir kaspaz kaskadı oluşturarak hücresel substratların bölünmesi ile apoptozu teşvik eder. Bu şekilde, hücresel bileşenlerin kontrollü yıkımına izin veren bir sinyal kaskadı ortaya çıkar ve hücre ölümü gerçekleşir. Apoptotik hücrelerde, hücre zarının iç yaprağındaki fosfatidilserinlerin dış yaprağa geçişiyle, fagositlerin hücreleri yutmasını sağlayan "beni ye" sinyali ortaya çıkar (121). Bu sayede, ölen hücrelerin paketlenmesi ve fagositler tarafından yutulması sağlanarak çevre doku ölü hücrelerden temizlenir (122).

PDT indüklü apoptotik mekanizmaların bir kısmı, kullanılan fotosensitizerin kimyasal yapısı ve çalışılan hücrelerin genetik çeşitliliği gibi nedenlerle kaspaz bağımsız bir şekilde gerçekleşebilir (123, 124). Kaspaz bağımsız apoptozda, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G (Endo G) gibi kaspaz bağımsız hücre ölümü efektörlerinin mitokondriden salınımı gerçekleşmektedir. PDT'nin özellikle oksidatif stres veya ER stresi oluşturduğu durumlarda etkinleşen bu ölüm efektörleri, mitokondriyal membran geçirgenliğinin de artması ile nükleusa taşınır. Hücrede bir kaspaz kaskadı aktifleşmeden gerçekleşen bu translokasyonun ardından kromatin kondenzasyonu ve DNA

fragmentasyonu gerçekleşir. Literatürdeki PDT çalışmalarından elde edilen bilgiler doğrultusunda, özellikle AIF'nin çeşitli fotosensitizerler tarafından aktive edilebileceği bilinmektedir (58, 125-128).

PDT ile aktive edilen kaspaz bağımlı ve bağımsız mekanizmaların deneysel koşullara, kullanılan fotosensitizerin fotofiziksel özelliklerine ve çalışılan hücre tipine bağlı olarak hem ayrı zamanlarda hem de aynı anda aktifleştirilmesi mümkündür. Bu nedenle, PDT'nin neden olduğu apoptotik hücre ölümünün multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (106, 129, 130).

2.5.2. Otofaji

Otofaji, gelişim ve homeostazda önemli bir rol oynayan, hücresel ürünlerin sentezi, bozunması ve geri dönüşümü arasında denge sağlanmasına izin veren, temelde hayatta kalma yanlısı olan katabolik bir hücresel geri dönüşüm mekanizmasıdır (131-135). Besin yoksunluğu çeken hücrelerde protein sentezi için yapı taşları sağlamak üzere aktive edilen otofaji, aynı zamanda yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinleri ya da hasarlı organelleri (endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi) parçalamak için kullanılır (136, 137).

Otofaji, hücresel substratların lizozomal parçalanmasını içeren bir süreçtir. Otofajik süreç genel olarak üç farklı mekanizma ile sürdürülür. Makro otofajide, otofagozom adı verilen bir çift membranlı yapı hedef bölgeyi çevreler ve içeriğini sitoplazmanın geri kalanından ayıran bir vezikül oluşturur. Bu vezikül lizozoma taşınarak otofagolizozomları oluşturur. Otofagolizozomların içeriğindeki hücresel bileşenler asidik lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanır. Mikro otofajide, hücresel bileşenler lizozomal zarda oluşan bir girinti ile lizozom tarafından doğrudan yutulur. Şaperon aracılı otofajide ise belirli peptid dizilerine sahip sitozolik proteinler, reseptör aracılı bir sinyalle seçici olarak lizozoma taşınır (138-140).

Otofaji ile ilişkilendirilen hastalıklardan biri kanserdir. Otofajinin düzenlenmesinde kritik bir rolü olan Beclin-1, ilk aşamalarda tümör büyümesini baskılasa da tümöral yapı agresif bir şekilde büyümeye devam ettikçe, otofajik mekanizmanın bu yapıya hayatta kalması için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlamaya çalıştığı tespit edilmiştir (141). Ek olarak, otofajinin apoptotik yolları bloke ettiği ve böylece kanser hücrelerini kemoterapi, radyoterapi ve çeşitli hedefe yönelik anti kanser tedavilerden korumaya çalıştığı gösterilmiştir (141-144). Buna rağmen, kontrolsüz veya bozulmuş otofaji, sitoplazmik materyalin toplu halde bozunması yoluyla hücre ölümüne neden olur (145-147).

PDT'nin otofaji ile ilişkisi tam olarak anlaşılmamış olsa da oksidatif hasarın derecesine bağlı olarak otofajinin sonuçları değişkenlik göstermekte, koruyucu bir mekanizma şeklinde veya otofajik hücre ölümü şeklinde görülebilmektedir (148-151). Otofaji her şeyden önce bir hayatta kalma mekanizmasıdır. PDT ile tetiklenen otofaji, hücrelerin oksidatif stresle başa çıkma ve hayatta kalmaya yönelik son girişimi olması açısından hücre ölümü sinyallerini inhibe etmeye ve tedaviye direnç gösterilmesine katkıda bulunabilir. PDT'nin, AMPK yolağını yukarı yönlü düzenleyerek veya AKT-mTOR yolağını baskılayarak makro otofajiyi aktive edebileceği bildirilmiştir. Ek olarak, PDT sonucu oluşan hücresel foto oksidasyon neticesinde otofajik mekanizmanın NFkB, MAPK ve HIF1 α aracılığıyla transkripsiyonel seviyede düzenlendiği bilgisi literatürde mevcuttur. Bununla birlikte; PDT'ye maruz kalma süresi, kullanılan fotosensitizerin fizikokimyasal yapısı ve uygulama dozu, hedef organeller veya çalışılan hücre tipleri gibi farklı deneysel koşullarda, otofajinin bir ölüm yolağı olarak devreye girdiği durumlar da görülmektedir. Son raporlar, PDT indüklü foto stresin ERK/CHOP/AKT/mTOR sinyalleşmesi aracılığıyla otofajik hücre ölümünü düzenleyebileceğini göstermektedir (152). Bax ve Bak gibi bazı proapoptotik faktörlerden yoksun olan kanser hücrelerinde de PDT indüklü otofajik hücre ölümü görülmüştür (153-155).

2.5.3. Nekroz

Nekroz; piknotik nükleus, sitoplazmik şişme, sitoplazmik zarların ve organellerin aşamalı olarak parçalanması ile karakterize bir hücre ölümüdür. ATP'nin hızlı bir şekilde tükenmesi ve biyoenerjetik mekanizmaların bozulması nedeniyle hücrenin metabolik yetmezliğe girmesi primer nekroza neden olmaktadır. (156). Primer nekroza ilaveten, apoptotik hücrelerin fagositler tarafından başarılı bir şekilde ortadan kaldırılamadığı durumlarda, hücre zarının geçirgen hale geldiği ve apoptozun alternatif bir sonucu olarak ele alınabilen sekonder nekroz (geç apoptoz) görülmektedir (157, 158). Sekonder nekroz; sitoplazmik şişme, membranların geçirgen hale gelmesi ve hücre içi bileşenlerin salınımı dahil olmak üzere programlanmış nekrozla örtüşen bazı özellikler gösterse de, primer nekroza daha az immünojenik olduğu düşünülmektedir (156, 159).

PDT'nin neden olduğu hücresel nekrozu inceleyen az sayıda çalışma olsa da ilgilenilen hücre tipi, apoptoz mekanizmasının varlığı veya yokluğu, kullanılan fotosensitizerin hücre içi lokalizasyonu, fotosensitizeri aktive etmek için uygulanan ışık dozu gibi faktörlerin önemli birer etken olduğu bilinmektedir (125). Yüksek dozdaki

fotosensitizer konsantrasyonu, yüksek ışık akışı ya da her ikisinin aynı anda kullanılmasının nekrotik hücre ölümüne eğilimi artırdığı, daha düşük dozlarda uygulanan PDT'nin hücreleri apoptotik ölüme daha yatkın hale getirdiği düşünülmektedir (131). Hücredeki antioksidan enzimlerin yıkılmasına neden olacak düzeyde ROS oluşumu, PDT indüklü nekrozun ana nedenidir. Hücre zarında lokalize olan fotosensitizerler kullanıldığında oluşan zar bütünlüğünün kaybı ve hücre içi ATP'nin hızlı bir şekilde tükenmesi, apoptotik hücre ölümünden nekrotik hücre ölümüne geçişi tetikleyebilir (125, 160). PDT'nin yüksek dozlarının, kaspazlar gibi apoptotik kaskadın temel bileşenlerini fotokimyasal olarak inaktive etmesi de mümkündür (161). Bunların yanı sıra, PDT sırasında üretilen ROS dahil çeşitli faktörler, aynı hücre popülasyonunda hem apoptozu hem de nekrozu tetikleyebilir (162).

Nekroz, uzun yıllar boyunca belirli bir mekanizmaya dayanmayan tesadüfi bir hücre ölüm şekli olarak kabul edilse de son yıllarda elde edilen veriler doğrultusunda, nekroptoz adı verilen özelleşmiş ve programlanabilen bir hücre ölümü tanımlanmış ve apoptoz ile bazı düzenleyici yolları (ölüm reseptörleri sinyalleşmesi gibi) paylaşabileceği belirtilmiştir (58, 163-166). Normal doku yenilenmesi ve bağışıklık tepkisi sırasında gözlenen nekroz örnekleri bu durumu destekler. Buna rağmen, PDT'yi takiben programlanmış nekrotik hücre ölümüne aracılık eden bir biyokimyasal yolak henüz tanımlanmamıştır. Nekroptozun ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasıyla, PDT başta olmak üzere gelecekteki tedavi stratejilerinde önemli bir hedef mekanizma olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (136).

2.6. Poli (ADP Riboz) Polimeraz (PARP) ve PDT İlişkisi

PARP ailesi, ADP ribozunun hedef proteinlere transferini katalize eden (poli ADP-ribozilasyon) bir enzim ailesidir. PARP'ların temel görevi, DNA hasarının olduğu durumlarda aktifleşerek DNA tamirine katılmaktır (167-169). En iyi tanımlanmış PARP izoformları olan PARP1 ve PARP2'nin, DNA tamirinin yanı sıra hücre proliferasyonu ve hücre ölümü dahil birçok hücresel süreçte önemli rolleri olduğuna dair bilimsel veriler mevcuttur (169, 170).

DNA lezyonlarının hücrelerdeki PARP seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu bilinmektedir (171). PARP, esas olarak baz eksizyon onarımının (BER) gerçekleşmesini sağlayarak DNA'daki tek zincir kırıklarına yanıt veren BER kompleksinin bir bileşenidir (172). Özellikle PARP1'in tek zincir ve çift zincir kırıklarında aktifleşerek hem baz eksizyon

hem de nükleotid eksizyon onarımında rol aldığı gösterilmiştir (173). DNA hasarına neden olan ajanlar ve radyasyon benzeri ışımlar PARP1'i uyarmaktadır (170, 174).

PARP1, DNA'daki hasar onarımını tamamlamak için ATP ve NAD⁺'ye ihtiyaç duyar. DNA'sı ciddi şekilde hasar görmüş hücreler, yüksek NAD⁺ tüketimiyle sonuçlanan ve ATP havuzlarını tüketen PARP1 aktivitesine sahiptir. Bu yüksek düzeydeki PARP1 aktivasyonu devam ederse, hücredeki ATP yoksunluğu nedeniyle partanatoz olarak bilinen bir tür düzenlenmiş nekroz mekanizması görülür (175-177). PARP bağımlı hücre ölümü olarak da isimlendirilen bu hücre ölümünde, ultraviyole ışınlama (UV-IR), alkile edici ajanlar ya da ROS oluşumu gibi DNA hasarı oluşturan uyarıcılar PARP1 hiperaktivasyonuna neden olur. Bu hiperaktivasyon, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı nedeniyle AIF salınımını tetikler (178-180). Mitokondri dışı zarından salınan AIF, DNA kırıklarına neden olabilir ve AIF aracılı DNA degradasyonu, PARP'ları daha fazla aktive ederek bir kısır döngü başlatabilir (181). Tüm bu süreçler, PARP1'in kaspazlar (çoğunlukla kaspaz 3 ve kaspaz 7) tarafından hızla kesilerek inaktive edilmesi ile tersine çevrilebilir. Hücre ATP ve NAD⁺'in yoksunluğuna girmeden önce aktifleşen kaspazlar, PARP1'i keserek inaktive eder (175, 182). PARP1'lerin apoptoz aktivasyonu nedeniyle kaspazlar tarafından kesilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken evresinin bir belirtisi olarak gösterilmektedir. Bu durum, hücredeki ATP'nin aşırı PARP aktivasyonu yoluyla tükenmesini önleyerek hücre ATP'yi korur. ATP'nin bu yolla korunması ise apoptoz için gereken enerjiyi sağlamış olur (183, 184). Daha önce yapılmış bazı çalışmalar kaspaz dirençli PARP ekspresyonunun olduğu fibroblastlarda, NAD⁺ ve ATP'nin devamlı tükenmesi sonucu nekrotik hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermiştir (182). PARP1 ekspresyonu inhibe edilmiş farelerden elde edilen fibroblastların ise ATP yoksunluğu yaşamadığı ve nekrotik hücre ölümüne karşı korunduğu, bu hücrelerde apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği rapor edilmiştir (177, 182).

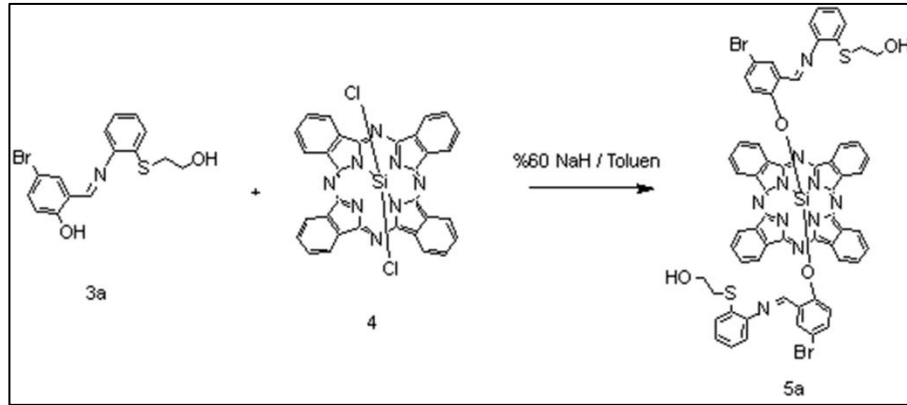
Kanser hücrelerindeki ROS oluşumu, DNA'da tek zincir ve çift zincir kırıklarına bağlı hasarları indüklemekte fakat aşırı ROS üretiminin hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (185, 186). PARP inhibisyonunun anti kanser tedavi yaklaşımlarına bu açıdan olumlu katkısı olacağı üzerinde durulmaktadır. DNA'daki zincir kırıklarını algılayan ve onarımını düzenleyen bir protein olan PARP, oksidatif DNA hasarına karşı gelişen hücresel yanıtta önemli bir rol oynar (187-189). PARP inhibe edildiğinde oksidatif DNA hasarında gerçekleşen artışın, mevcut hasarın tamir edilememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (190). PARP inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılan kemoterapi

ve radyoterapide tedavi yanıtının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (191-193). PARP'ların inhibe edilmesi, bu tedavi yaklaşımlarında hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri artırmıştır (170, 174). PDT'nin temel işleyiş mekanizması hücre içindeki singlet oksijen ve ROS seviyelerini artırarak hücre ölümünü teşvik etmeye yöneliktir (194). Kullanılan fotosensitizerlerin çoğu mitokondri, lizozom veya endoplazmik retikulum dahil olmak üzere diğer hücre içi membranlara bağlanmaktadır. Özellikle mitokondriye lokalize olan fotosensitizerlerin aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonuna ve sitokrom c salınımına neden olur. Bunun sonucunda aktifleşen kaspazların hedefinde ise PARP proteinleri bulunmaktadır. PDT esnasında hızla oluşan yüksek seviyedeki ROS, hücre ölüm uyarısının verilmesi ve PARP'ların inaktive edilmesiyle başarılı bir hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlamaktadır. (191, 194, 195).

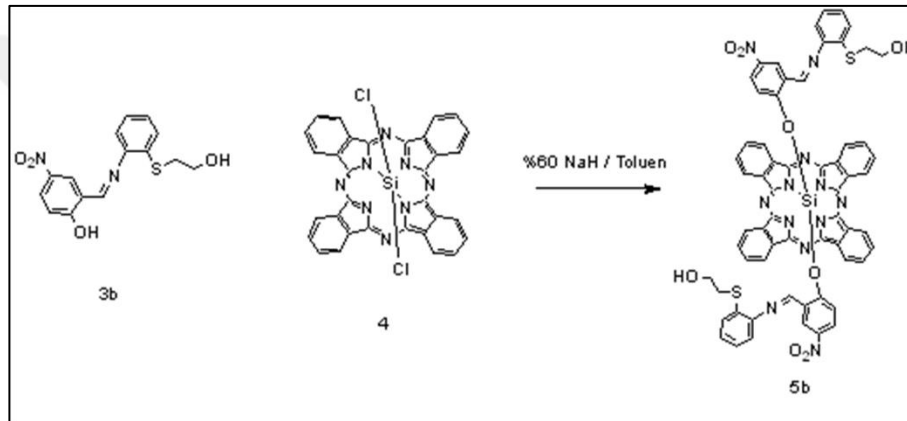
2.7. Fotosensitizer Maddelerin Sentezine Yönelik Ön Veriler

Çalışmada kullanılan aminofenoltiyetanol çevreli orijinal fotosensitizer maddelerin sentezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Fotosensitizerlerin sentezlenmesi için, 5-bromo-2-hidroksibenzaldehit (1a) ve 2-hidroksi-5-nitrobenzaldehyt (1b) bileşikler ticari olarak satın alınmıştır. 4-bromo-2-[(2-[(2-hidroksietil)tio]fenil}imino)metil]fenol (2 nolu bileşik) literatürde belirtildiği şekilde çoğaltılmıştır (196). 2 nolu bileşiğin, 1a ve 1b ile kuru etanol ve katalizör olarak asetik asit ortamında ayrı ayrı kaynatılmasıyla 3a ve 3b bileşikler elde edilmiştir. Amfifilik özellikteki aminofenoltiyetanol çevreli Schiff bazları olan 5A ve 5B, çözücü olarak kullanılan kuru toluen içerisinde, NaH varlığında, SiPcCl₂ ile (4 nolu bileşik) ve kaynama sıcaklığında (N₂ atmosferinde) iki gün ısıtılarak elde edilmiştir (Şekil 6, Şekil 7).



Şekil 6. 5A bileşiğinin eldesi



Şekil 7. 5B bileşiğinin eldesi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada, meme kanseri hücre hatları MCF-7 (ATCC® HTB-22™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) ve normal meme hücre hattı MCF-10A (ATCC® CRL-10317™) kullanılmıştır. Tüm hücre hatları tez danışmanının hücre koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H ₂ DCFDA)	Sigma, D6883
Bovın serum albümin (BSA)	Amresco, 0332
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 41640
Etanol	Merck, 1.00983.2500
Fetal bovin serum (FBS)	Gibco, 10500064
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Gibco, 14190144
Hidroklorik asit	Merck, 1.00317.2500
Hidrokortizon	Sigma, H 0888
Horse serum	Thermo, 16050130
İnsan epidermal büyüme faktör (hEGF)	Thermo, PHG0313
İnsülin	Sigma, I9278
Klorotoksin	Sigma, C8052
Kristal viyoleto solüsyonu	Sigma, HT90132
Metanol	Merck, 1.06009.2500
Penisilin/streptomisin (pen/strep)	Biological Industries, 0331
Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)	AppliChem, A2231
Tripsin-EDTA	Biological Industries, 741152

3.1.3. Kitler

Alexa Fluor 647 mouse anti-cleaved PARP	BD Biosciences, 558710
Matrigel basement membrane matrix	Corning, 356234
PE-Annexin V apoptosis detection kit I	BD Biosciences, 559763
TMRE-mitochondrial membrane potential assay kit	Abcam, ab113852

3.1.4. Sarf Malzemeler

Enjektör (5 ve 10 mL)	Ayset, Türkiye
Ependorf tüpler (1.5 mL)	Greiner, Almanya
Falkon tüpler (15 ve 50 mL)	Nest, Çin
Flask (25 cm ² T25 ve 75 cm ² T75)	Greiner, Almanya
Pastör pipet	Isolab, Almanya
Pipet ucu (10, 200, 1000 µL)	Axygene, Almanya
Pleyt (6, 24 ve 96 kuyucuklu)	Greiner, Almanya
Serolojik pipet (5, 10 ve 25 mL)	Greiner, Almanya
Transwell membran insert (8.0 µM)	Corning, ABD

3.1.5. Cihazlar

Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik, Türkiye
Buz makinesi	Scottman, İngiltere
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch, Türkiye
Derin dondurucu (-86 °C)	Thermo, ABD
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
ELISA pleyt okuyucu	Eppendorf, Almanya
Etüv	Heraeus, Almanya
Florometre	Molecular Devices, ABD
Flow sitometri	BD, ABD
Hassas terazi	Ahaus, ABD
İnvert mikroskop	Nikon, Japonya
Klas II steril kabin	Metisafe, Türkiye
Konfokal mikroskop	Leica, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo I EC, ABD
Semikondüktör lazer	LumaCare LC 122, ABD
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804, Almanya
Su banyosu	Memmert, Almanya
Vorteks	Labinco L-46, Hollanda
Yüksek Devirli Santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya

3.1.6. Solüsyonlar ve Besiyerleri

5A İçeren Solüsyon

Toz haldeki 5A'dan (1243.085 g/mol) 8.7 mg tartılarak 7 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM stok). Hazırlanan çözelti oda ısısında ve karanlıkta muhafaza edildi.

5B İçeren Solüsyon

Toz haldeki 5B'den (1175.288 g/mol) 8.6 mg tartılarak 7.3 mL DMSO içerisinde çözüldü (1 mM stok). Hazırlanan çözelti oda ısısında ve karanlıkta muhafaza edildi.

RPMI 1640 Besiyeri

44.5 mL RPMI 1640 besiyeri içerisine 5 mL FBS ve 0.5 mL pen/strep ilave edilerek +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

DMEM/F12 Besiyeri

46.410 mL DMEM/F12 besiyerine; 2.5 mL horse serum, 500 µL pen/strep, 50 µL insülin, 25 µL hidrokortizon (1 mg/mL stok), 10 µL hEGF (100 µg/mL stok) ve 5 µL klorotoksin (1 mg/mL stok) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (hEGF)

1 mL PBS içerisine 0.1 mg hEGF eklendi (100 µg/mL stok). +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

Hidrokortizon

1 mL absolut alkol içerisine 1 mg hidrokortizon eklendi. Oluşan çözeltinin üzerine 19 mL DMEM/F12 besiyeri ilave edilerek 50 µg/mL hidrokortizon ve besiyeri karışımı hazırlandı. +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

Klorotoksin

Liyofilize olarak satın alınan 1 mg klorotoksin, 1 mL steril su içerisine eklendi ve +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

MTT Solüsyonu

Ticari olarak temin edilmiş olan toz haldeki MTT den 0.1 g tartılarak 20 mL PBS içerisinde çözöldü. Çözelti filtre edildi ve ependorf tüplere aktararak alikotlandı. -20 °C'deki derin dondurucu dolapta muhafaza edildi.

H₂DCFDA Solüsyonu

Ticari olarak satın alınmış ve moleküler ağırlığı 487.29 g/mol olan toz haldeki H₂DCFDA'dan 5.8 mg tartılarak 2.97 mL DMSO içerisinde çözöldü (4 mM stok). Hazırlanan çözelti +4 °C'deki buzdolabında 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 kültüre edilerek, 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. MCF-10A normal meme hücreleri, son hacimde %5 horse serum, %1 pen/strep, 10 µg/mL insülin, 20 ng/mL hEGF, 0.5 ng/mL hidrokortizon ve 100 ng/mL klorotoksin içeren DMEM/F12 besiyeri ile kültüre edilerek, 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

Hücreler her gün mikroskopik olarak kontrol edildi ve flasktaki yoğunlukları incelendi. Hücre kültür flasksındaki yoğunluk yaklaşık %80'e ulaştığında pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için, flasktaki besiyerinin tamamı bir pipet ile çekildi ve flaskın iç yüzeyi PBS ile temizlendi. PBS'nin flasktan uzaklaştırılmasının ardından, hücrelerin tutunduğu alan üzerine tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37 °C'deki etüvde yaklaşık iki dakika inkübe edildi. Tripsin-EDTA yardımıyla flask yüzeyinden ayrılan hücreler mikroskopta kontrol edildi ve tripsinin etkisini bloke etmek üzere flask içerisine %10 FBS içeren besiyeri ilave edildi. Ardından, flask içerisinden bir pipet yardımıyla toplanan hücreler 15 mL falkon tüplere aktararak, 1200 rpm'de beş dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve taze besiyeri ile süspanse edilen hücreler yeni flasklara aktarıldı. Flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüve yerleştirildi ve hücreler inkübasyona bırakıldı.

3.2.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının Belirlenmesi

Tüm çalışma boyunca gerçekleştirilecek analiz yöntemlerinde belirleyici olması açısından hücrelerin ikilenme zamanları tespit edildi. Bunun için, flasklarda kültüre edilen

hücreler tripsinize edilerek toplandı ve flow sitometri cihazında sayım yapıldı. Tüm hücre hatları için 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayılmak üzere dört adet T75 flaska, her bir flaskta 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimin yapıldığı ilk sayı (1×10^6) 0. saat değeri olarak kabul edildi. 24 saat sonunda, 24. saat analizi için etiketlenmiş olan flasktaki hücreler tripsinize edilerek sayıldı ve bu seri 96 saat için etiketlenen flasktaki hücreler tripsinize edilene kadar devam etti. Belirlenen hücre sayıları ve inkübasyon süreleri göz önüne alınarak büyüme eğrileri çizildi ve ikilenme zamanları belirlendi.

3.2.3. PDT Yöntemi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri, deneysel analizlerin gerekliliğine uygun şekilde farklı pleytlere ekilerek 37 °C'deki etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkanan hücrelere farklı dozlarda (0.25-10 μ M) 5A veya 5B içeren besiyeri eklenerek aynı koşullardaki etüvde 16 saatlik inkübasyona bırakıldı.

PDT gerçekleştirilmeden önce, pleytin her kenarına, köşesine ve orta alanlarına düşen ışık miktarı bir ışık sensörü ile ölçüldü. PDT'de kullanılması planlanan ışık dozuna (10 j/cm^2) uygun biçimde; " $\text{j/cm}^2 = \text{mW.t (sn)}$ " formülü üzerinde, pleytlere ışınlama yapılacak zaman aralığı hesaplandı. Etüvdeki inkübasyon süresi biten hücreler, semikondüktör lazer aracılığı ile 680 nm dalga boyundaki LED ışığa maruz bırakıldı. Hücreler, PDT uygulamasının sona ermesiyle 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüve yerleştirildi ve 16 saat inkübe edildi.

3.2.4. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Analizi

Çalışmada fotosensitizer olarak kullanılan 5A ve 5B'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde canlılığa olan etkisi MTT hücre canlılık analizi ile incelendi. Hücreler 96 kuyucuklu pleytlere, her kuyuda yaklaşık 7×10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin pleytlere tutunması için yaklaşık 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından, hücreler farklı dozlarda (0.25-10 μ M) 5A ve 5B içeren taze besiyerleri ile ayrı ayrı muamele edilerek 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm^2 enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edilerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat boyunca tekrar inkübe edildi. Ardından, hücreleri içeren her bir kuyucuğa 0.5 mg/mL MTT ilave edilerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde üç saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda, her kuyucuktaki MTT içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100 μ L DMSO ilave edilerek 20 dakika boyunca çalkalayıcı

üzerinde bekletildi. Kuyucukların absorbands değerleri, 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre, hücre canlılığı üzerinde etkili olan dozlar tespit edildi.

3.2.5. Annexin V/7AAD Boyama Yöntemi ile Apoptotik Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 5A ve 5B'nin MCF-7, MDA-MB-231 MCF-10A hücrelerinde oluşturacağı apoptotik hücre popülasyonlarının tespiti "Annexin V/7-AAD" flow sitometrik işaretleme yöntemi ile analiz edildi. Hücreler, 6 kuyucuklu pleytlere her kuyuda yaklaşık 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücreler 1.5 µM 5A veya 5B içeren taze besiyerleri ile ayrı ayrı muamele edilerek 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde tekrar inkübe edildi. Hücreler daha sonra 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışığa maruz bırakıldı. PDT işleminin ardından hücreler, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sona erince hücreler tripsinize edildi ve pellet soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Yıkamaların ardından hücreler, kit içeriğinde bulunan "Annexin binding buffer" ile süspanse edilerek, endorf tüplere her bir hücre örneğinden 100 µl alındı. Bu hücre örneklerine 5 µl Annexin V ve 5 µl 7-AAD ilave edilerek yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, örnekler flow sitometri cihazında analiz edildi.

3.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki Değişimlerin İncelenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde, 5A veya 5B muamelesi ve PDT uygulaması sonrası meydana gelen mitokondriyal membran potansiyeli değişimleri "TMRE-mitochondrial membrane potential assay kit" kullanılarak tespit edildi. Bunun için, 96 kuyucuklu pleytlere her kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve pleytler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. Hemen ardından, hücreler 1.5 µM 5A veya 5B içeren taze besiyerleri ile muamele edilerek 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde tekrar inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler PDT işlemi gereğince, 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi. PDT işleminin ardından hücreler, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sona erince, kit protokolü doğrultusunda her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 500 nM olacak şekilde TMRE eklendi ve 30 dakika boyunca karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak, kit içeriğindeki carbonyl cyanide-4-

(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP) son konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde kullanıldı. İnkübasyon zamanı sona erdiğinde, kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar %0.2 BSA içeren 100 μ l PBS ile iki kez yıkandı. Son olarak, pleytler mikro pleyt okuyucuda Ex/Em = 549/575 nm dalga boylarında florometrik olarak analiz edildi.

3.2.7. Hücre İçi ROS Oluşumunun Mikroskopik Olarak Analiz Edilmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri, sterilize edilmiş ve 6 kuyucuklu pleytlere yerleştirilmiş lamellere, her bir kuyuda 25×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 1.5 μ M 5A veya 5B içeren taze besiyerleri ile muamele edilerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, H₂DCFDA son konsantrasyonu 2 μ M olacak şekilde PBS içerisinde çözöldü. Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile iki kez yıkandı. Her kuyucuğa, H₂DCFDA içeren PBS solüsyonundan 1 mL eklendi. Pleytlerin tamamı alüminyum folyo ile kaplanarak 20 dakika boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Hemen ardından, kuyucuklardaki PBS uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile iki kez yıkandı. Pleyt kuyucukları içerisine yerleştirilmiş lameller sivri uçlu bir pens yardımıyla kuyucuklardan çıkarıldı ve alkol ile sterilize edilmiş lamaların üzerine yerleştirildi. Preparatlar, konfokal mikroskopta 490-520 nm dalga boyu aralığında incelendi.

3.2.8. Kesilmiş (Cleaved) PARP1 Analizi

Hücrelerdeki kesilmiş PARP1 miktarının tayini için, apoptotik mekanizma sonucu oluşan 89-kDa moleküler ağırlıktaki kesilmiş PARP1 fragmanını tanıyan “Alexa Fluor 647 mouse anti-cleaved PARP” floresan işaretli antikor kullanıldı. Öncelikle 6 kuyucuklu pleytlere her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. Ardından hücreler 1.5 μ M 5A veya 5B içeren taze besiyerleri ile muamele edilerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat boyunca tekrar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi. PDT uygulamasının ardından, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından, hücreler tripsinize edildi ve soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Yıkamaların ardından hücreler Cytofix/Cytoperm solüsyonu ile süspanse edildi ve 20 dakika boyunca buzda bekletildi. Bu

sürenin sonunda hücreler santrifüj edildi ve iki kez Perm/Wash tamponu ile yıkandı. İki yıkamanın ardından tekrar Perm/Wash tamponu ile süspanse edilen hücrelerden 100 µL alınarak ependorf tüplere aktarıldı. Bu örnek tüplerine, kit içeriğinde bulunan Alexa Fluor 647 mouse anti-cleaved PARP1 antikorundan 5 µL ilave edildi. Tüpler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Ardından örnek tüplerinin içine 1 mL Perm/Wash tamponu ilave edildi ve örnekler son kez santrifüj edildi. Süpernatantı tüplerden uzaklaştırılan örnekler 0.5 mL Perm/Wash tamponu ile süspanse edilerek flow sitometri cihazında analiz edildi.

3.2.9. Koloni Formasyon Analizi ile Hücrelerin Koloni Oluşturma Kabiliyetlerinin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan 5A ve 5B'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetlerine etkisi, koloni formasyon analizi ile incelendi. Hücreler, 6 kuyucuklu pleytlere her kuyuda yaklaşık 25×10^4 hücre olacak şekilde ekilerek 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1 µM konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamele edildi ve 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi. Hemen ardından hücreler tripsinize edildi ve 6 kuyucuklu pleytlere her kuyuda yaklaşık 5×10^2 hücre/2 mL besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde yedi günlük inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra, 1:1:8 oranında metanol, asetik asit ve distile su içeren fiksatif solüsyonu ile 25 dakika boyunca fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyon süresi tamamlanınca hücrelerin üzerindeki solüsyon uzaklaştırılarak kuyucuklara kristal viyoleto (%0.5) boyası ilave edildi ve hücreler 20 dakika boyunca boyada bekletildi. Boyama süresi sona erince hücrelerin üzerindeki boya uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile boya kalıntıları temizlenene kadar yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından pleytler harici bir kamera ile fotoğraflandı ve Image J programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.10. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Yöntemi ile Hücre Hareketinin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin hareket kabiliyetlerine etkisi yara iyileşmesi yöntemi ile incelendi. Hücreler, 24 kuyucuklu pleytlere her kuyuda yaklaşık 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilerek 16 saat

boyunca %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek %0.5 FBS içeren taze besiyeri eklendi ve 19 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi. Hücreler, 1 µM 5A veya 5B ile %0.5 FBS içeren taze besiyerleri kullanılarak ayrı ayrı muamele edildi ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi ve her bir kuyucuğa 200 µL’lik pipet uçları kullanılarak çizik atıldı. Hemen ardından, hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve entegre kameralı invert mikroskop aracılığıyla fotoğraflandı (0. saat). Fotoğraf çekiminin ardından hücrelerin üzerindeki PBS uzaklaştırıldı ve kuyucuklara %0.5 FBS içeren taze besiyeri eklendi. Hücreler 24 saat inkübe edildi. 24. saatte, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkandı ve tekrar fotoğraflandı (24. saat). Fotoğraf çekimini takiben hücrelerin üzerindeki PBS uzaklaştırıldı ve kuyucuklara yeniden %0.5 FBS içeren taze besiyeri eklendi. Hücreler yeni bir 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sona erince hücreler tekrar PBS ile yıkandı ve fotoğraflandı (48. saat). Hücrelerde oluşturulan çizik alanındaki değişimler, Image J programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.11. Transwell Migrasyon Assay ile Hücre Migrasyon Kabiliyetindeki Değişimlerin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan 5A ve 5B’nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin migrasyon kabiliyetlerine etkisi transwell insertler kullanılarak analiz edildi. Öncelikle hücreler 6 kuyucuklu pleytlere, her kuyucukta 25x10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. Hemen ardından, hücreler 1 µM 5A veya 5B içeren taze besiyeri ile muamele edilerek 16 saat boyunca 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde tekrar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi. PDT uygulamasını takiben hücreler tripsinize edildi. Migrasyon assay için kullanılacak olan insertler, 24 kuyucuklu pleytlere pens yardımı ile yerleştirildi ve insertlerin içine %1 FBS içeren 250 µL besiyeri eklendi. Ardından insertlerin yerleşik olduğu kuyucukların içine %5 FBS içeren 300 µL besiyeri eklendi. Tripsinize edilen hücrelerin insert içine ekimi, her insert için %1 FBS içeren 50 µL besiyerinin içinde 2 x10⁴ hücre olacak şekilde yapıldı. Hücreler 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sona erdiğinde öncelikle insertlerin içindeki, ardından kuyucukların içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. İnsertler pens yardımıyla kuyucuklardan çıkarıldı ve iç kısımları steril bir pamuklu çubuk ile dikkatli bir şekilde

temizlendi. İnsertler pens yardımıyla kuyucuklara tekrar yerleştirildikten sonra kuyucukların içine 300 µL soğuk metanol eklendi ve 15 dakika fiksasyona bırakıldı. Fiksasyonu takiben kuyucukların içindeki metanol uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 µL kristal viyoleto (%0.1) eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyama aşaması sona erince, insertler pens yardımıyla dikkatlice alındı ve distile su dolu bir beherin içerisine batırılarak yıkandı. Ardından temiz bir peçetenin üzerine, insertlerin alt kısımları üstte kalacak şekilde ters çevrilerek yerleştirildi ve yaklaşık bir saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan insertler pens yardımıyla alınarak pleytin temiz kuyucuklarına yerleştirildi ve entegre kameralı invert mikroskop aracılığıyla fotoğraflandı. Fotoğrafların analizi Image J programı ile gerçekleştirildi.

3.2.12. Matrijel İnvazyon Assay ile Hücre İnvazyon Kabiliyetindeki Değişimlerin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan 5A ve 5B'nin MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin invazyon kabiliyetlerine etkisi transwell insertler ve matrijel kullanılarak analiz edildi. İlk aşamada, 6 kuyucuklu pleytlere her kuyucukta 25×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 16 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 1 µM 5A veya 5B içeren taze besiyeri ile muamele edilerek 16 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin 16 saat sürecek inkübasyonları başlatıldığında, 24 kuyucuklu pleytlere transwell insertler yerleştirildi. Her insertin içine yalnızca besiyeri ile sulandırılmış ve son konsantrasyonu 1.25 mg/mL olan 50 µL matrijel eklendi. Matrijelleri içeren insertlerin olduğu 24 kuyucuklu pleytler, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 12 saat inkübe edilerek matrijellerin tam bir jel yapısına ulaşması sağlandı. Bu sürenin sonunda matrijellerin olduğu her bir inserte FBS içermeyen besiyerinden 100 µL eklenerek matrijeller rehidre edildi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 4 saat inkübe edildi.

Yaklaşık 16 saat süren inkübasyonun sonuna gelen hücreler, 680 nm dalga boyunda ve 10 J/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile muamele edildi. PDT uygulaması sona erince hücreler tripsinize edildi. Bu esnada, rehidrasyondaki inkübasyon süresi dolan matrijellerin üzerindeki fazla besiyeri, pipet ucu matrijele değmeyecek şekilde dikkatlice uzaklaştırıldı. İnsertlerin içine yerleşik olduğu kuyucuklara %5 FBS içeren 300 µL besiyeri ilave edildi. Matrijelleri içeren insertlerin üzerine, her insert için %1 FBS içeren 300 µL besiyerinin içinde 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde

16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sona erdiğinde öncelikle insertlerin içindeki, ardından kuyucukların içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. İnsertler pens yardımıyla kuyucuklardan çıkartılarak, iç kısımları steril bir pamuklu çubuk yardımı ile dikkatlice temizlendi ve matrijelden arındırıldı. İnsertler pens yardımıyla kuyucuklara tekrar yerleştirildi ve kuyucukların içine 300 µL soğuk metanol eklenerek 15 dakika fiksasyona bırakıldı. Fiksasyon süresi sona erince, kuyucukların içindeki metanol uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 µL kristal viyoleto (%0.1) eklenerek 15 dakika boya inkübasyonuna bırakıldı. Boyama aşamasının ardından, insertler pens yardımıyla alınarak distile su dolu bir beherin içerisinde yıkandı. Yıkamanın ardından temiz bir peçetenin üzerine, insertlerin alt kısımları üstte kalacak şekilde ters çevrilerek yerleştirildi ve yaklaşık bir saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan insertler pens yardımıyla alınarak pleytin temiz kuyucuklarına yerleştirildi ve entegre kameralı invert mikroskop aracılığıyla fotoğraflandı. Analizler Image J programı ile gerçekleştirildi.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler, triplikate içeren en az üç bağımsız çalışma ile desteklendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism programı ile gerçekleştirildi. Her hücre hattı için kontrol grubu ve PDT grubu arasındaki farklılıklar “t test” kullanılarak hesaplandı. Her grup için, p değeri 0.05’ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

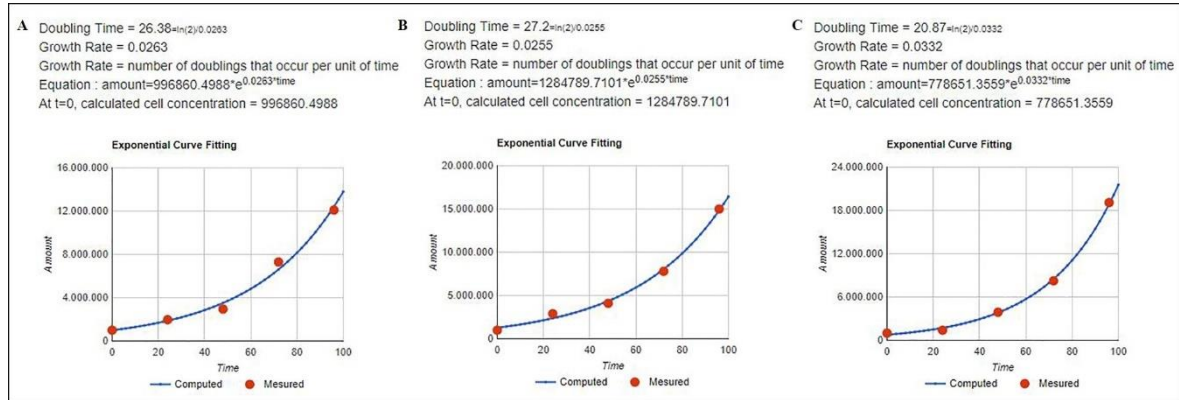
4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin Kültürdeki Özellikleri ve Morfolojileri

Çalışmada; MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve MCF-10A normal meme hücreleri kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, metastatik bölgeden elde edilmiş, epitelyal ve adheren karakteristiğe sahip kanser hücreleridir. MCF-7 hücreleri düşük metastatik potansiyele sahip zayıf agresif hücrelerdir. Buna karşın, MDA-MB-231 hücreleri yüksek migrasyon ve invazyon kapasitesine sahiptir (197, 198). MCF-10A hücreleri ise memedeki tümörjenik olmayan bölgeden elde edilmiş, epitelyal ve adheren karakteristiğe sahiptir.

4.2. Hücrelerin İkilenme Zamanları

Çalışmada kullanılan MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin, substitue SiPc'ler 5A ve 5B'ye karşı oluşturacağı anti kanser etkileri incelemenden önce, hücrelerin ikilenme zamanları belirlenerek büyüme özellikleri analiz edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda hücrelerin ikilenme zamanları sırasıyla; MCF-7 hücre hattında 26.38 saat, MDA-MB-231 hücre hattında 27.2 saat ve MCF-10A hücre hattında ise 20.87 saat olarak tespit edildi (Resim 1).



Resim 1. Hücre hatlarının büyüme eğrileri ve ikilenme zamanları. (A) MCF-7. (B) MDA-MB-231. (C) MCF-10A.

4.3. Aminofenoltiyetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Çalışmada fotosensitizer bileşikler olarak kullanılan aminofenoltiyetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri ve MCF-10A normal meme hücre

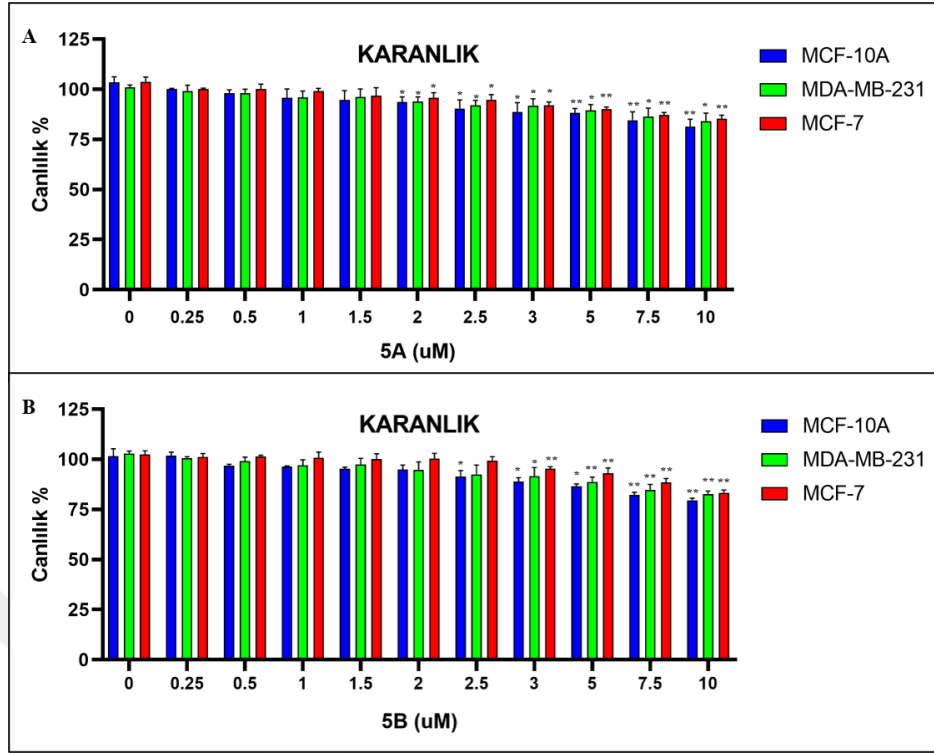
hatlarında PDT aracılığıyla oluşturduğu sitotoksik etkiler MTT hücre canlılık analizi ile belirlendi. Hücreler dört çalışma grubuna ayrıldı;

1. Fotosensitizer uygulanmayan ve ışığa maruz bırakılmayan grup (ana kontrol grubu)
2. Fotosensitizer uygulanmayan ve ışığa maruz bırakılan grup (ışık kontrol grubu)
3. Fotosensitizer uygulanan ve ışığa maruz bırakılmayan grup (karanlık kontrol grubu)
4. Fotosensitizer uygulanan ve ışığa maruz bırakılan grup (PDT grubu)

SiPc muameleli tüm hücre gruplarına 0.25-10 μM aralığında değişen dozlarda 5A veya 5B muamele edildi. Işığın kullanıldığı gruptaki hücreler, 680 nm dalga boyunda ve 10 j/cm^2 enerji yoğunluğundaki ışığa maruz bırakıldı.

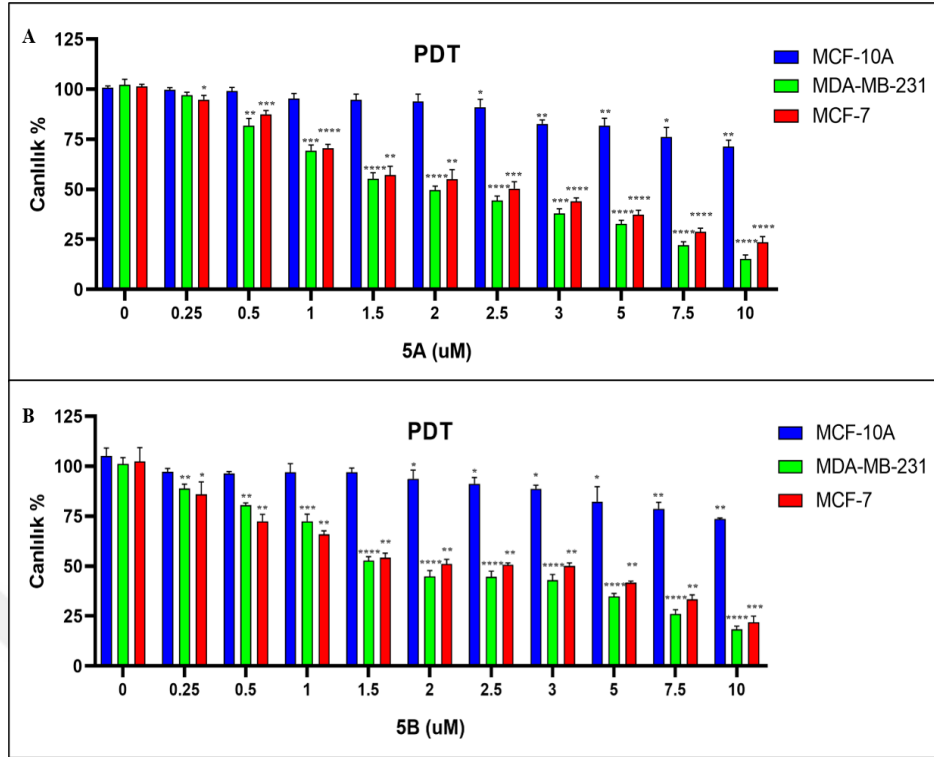
MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttığı tespit edildi. Tüm hücre hatlarının PDT gruplarında, karanlık kontrol gruplarına kıyasla canlılığın azaldığı görüldü. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin PDT gruplarındaki hücre canlılığı kademeli olarak azalırken, MCF-10A hücrelerinin PDT grubundaki hücre canlılığı kanser hücrelerine oranla daha yüksek seviyelerde gözlemlendi.

Çalışmada kullanılan en düşük konsantrasyondaki (0.25 μM) 5A muamelesinde; MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin karanlık kontrol gruplarında sırasıyla %100, %98 ve %100 canlılık tespit edildi. En yüksek konsantrasyonda ise (10 μM) bu değerler %85, %84 ve %82 şeklinde gözlemlendi. Çalışılmış en düşük konsantrasyondaki (0.25 μM) 5B muamelesinde her üç hücre hattının karanlık kontrol gruplarında elde edilen hücre canlılığı %100 olarak belirlendi. Bu değerler en yüksek konsantrasyondaki (10 μM) 5B muamelesi için MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında sırasıyla %83, %82 ve %80 olarak tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Farklı dozlardaki 5A ve 5B muamelesinin karanlık ortamdaki hücre canlılığına etkisi. **(A)** 5A muamelesi. **(B)** 5B muamelesi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Çalışmada kullanılan en düşük konsantrasyondaki (0.25 μM) 5A muamelesinde; MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin PDT gruplarında sırasıyla %94, %96 ve %99 canlılık tespit edildi. En yüksek konsantrasyondaki (10 μM) 5A muamelesi için bu değerlerin karşılığı sırasıyla, %30, %34 ve %71 şeklindeydi. Kullanılmış olan en düşük konsantrasyondaki (0.25 μM) 5B muamelesi için MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin PDT gruplarında görülen canlılık değerleri sırasıyla %85, %88, %97 iken, en yüksek konsantrasyondaki (10 μM) 5B muamelesinde bu değerler %36, %27 ve %73 olarak belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. Farklı dozlardaki 5A ve 5B muamelesinin PDT sonrası hücre canlılığına etkisi. **(A)** 5A muamelesi. **(B)** 5B muamelesi. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında farklı dozlardaki 5A ve 5B muamelesinin hücre canlılığı üzerine etkileri tespit edildikten sonra, elde edilen sonuçlardan yararlanılarak IC50 değerleri hesaplandı. Buna göre; MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A için 5A-PDT'nin IC50 değerleri sırasıyla 4.2 µM, 3.3 µM ve 16.3 µM olarak belirlendi. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A için 5B-PDT'nin IC50 değerleri ise sırasıyla 4.1 µM, 3.7 µM ve 17.4 µM olarak saptandı.

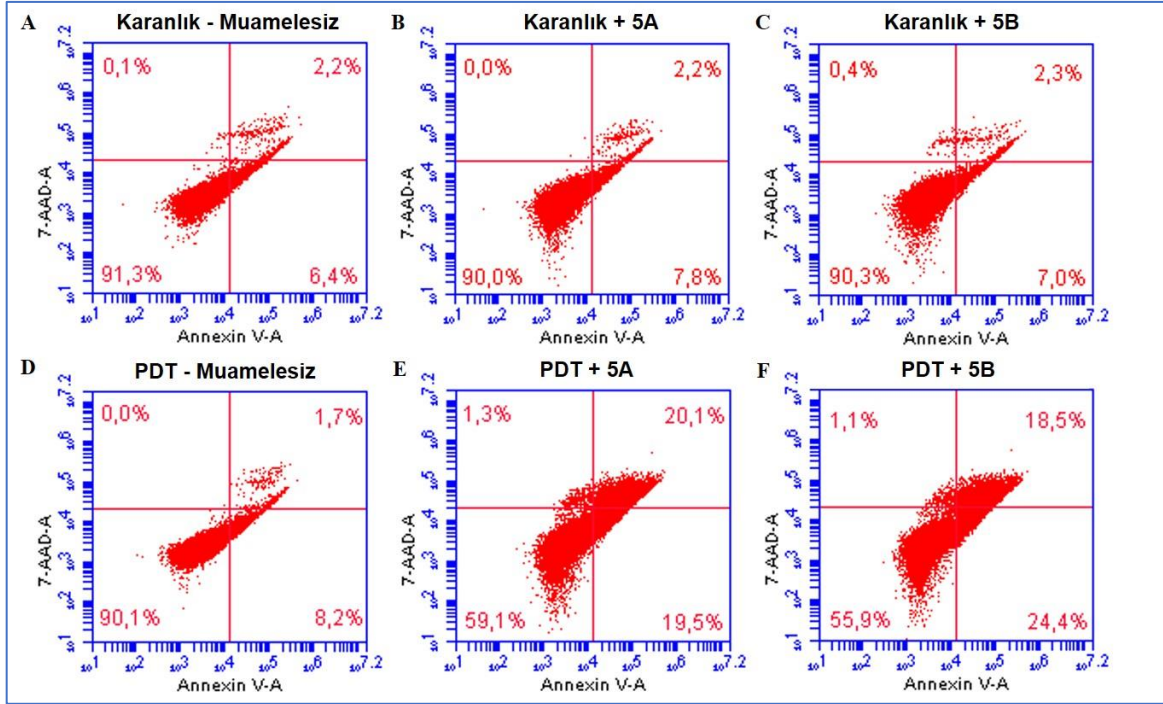
Hücre canlılık analizleri göz önüne alınarak çalışmanın akışı doğrultusunda yapılacak ileri deneysel analizler için, kullanılacak olan metoda göre farklılık göstermek üzere, meme kanseri hücrelerinde yüksek sitotoksik etki gösteren fakat normal meme hücrelerinde anlamlı bir etkisi olmayan 1.5 µM ve 1 µM konsantrasyona sahip 5A ve aynı konsantrasyonlardaki 5B ile devam edilmesi planlandı. 1.5 µM konsantrasyondaki 5A muamelesinde MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve MCF-10A normal meme hücrelerinin PDT gruplarında görülen canlılık değerleri sırasıyla; %57, %55 ve %94 iken, aynı konsantrasyondaki 5B muamelesi sonrası elde edilen canlılık değerleri %54, %52 ve %96 şeklindeydi. 1 µM konsantrasyondaki 5A muamelesinde MCF-7, MDA-MB-231 ve

MCF-10A hücre hatlarının PDT gruplarında görülen canlılık değerleri sırasıyla; %70, %69 ve %95 olarak belirlendi. Aynı konsantrasyondaki 5B muamelesi ve PDT uygulaması sonrası bu değerler sırasıyla; %66, %72 ve %97 şeklindeydi. Kullanılan tüm hücre hatlarında, karanlık kontrol gruplarının 1.5 μ M ve 1 μ M konsantrasyondaki 5A veya 5B muamelesinin ardından sergilediği canlılık değerlerinin ise %95'in üzerinde olduğu görüldü.

4.4. Aminofenoltioetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Oluşturduğu Apoptotik Popülasyonların Annexin V/7AAD Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi

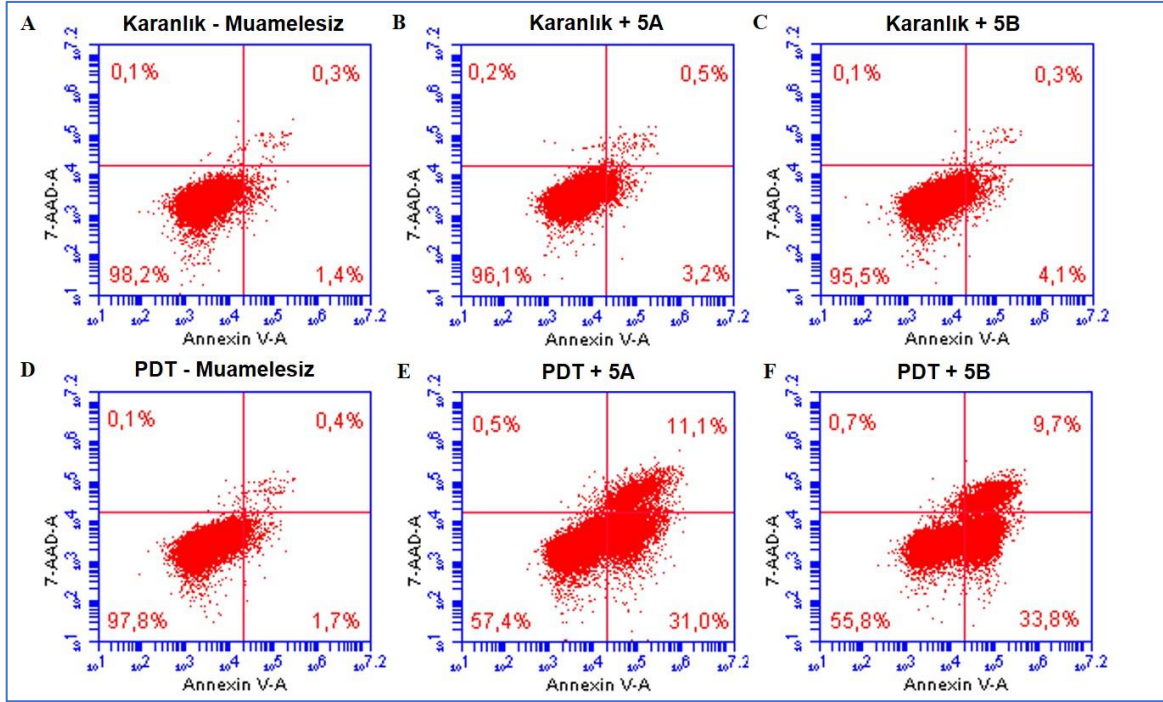
Çalışmada kullanılan aminofenoltioetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında PDT aracılığıyla oluşturduğu apoptotik etkiler Annexin V/7-AAD boyama yöntemi ile flow sitometrik olarak analiz edildi. Annexin V negatif ve 7-AAD negatif hücre popülasyonları sağlıklı olarak nitelendirildi. Annexin V pozitif ve 7-AAD negatif popülasyonlar erken apoptotik hücreleri temsil ederken, Annexin V pozitif ve 7-AAD pozitif hücreler geç apoptotik (sekonder nekrotik) hücreler olarak değerlendirildi (199).

MCF-7 hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarında %90 ve üzeri sağlıklı hücre popülasyonu görülürken, 5A muamelesinin ardından PDT uygulanan hücre grubunda hücrelerin %59.1'inin sağlıklı, %19.5'inin erken apoptotik, %20.1'inin ise geç apoptotik evrede olduğu tespit edildi. 5B muamelesini takiben PDT uygulanan hücrelerde ise %55.9 oranında sağlıklı, %24.4 oranında erken apoptotik, %18.5 oranında ise geç apoptotik hücre popülasyonu belirlendi (Resim 2).



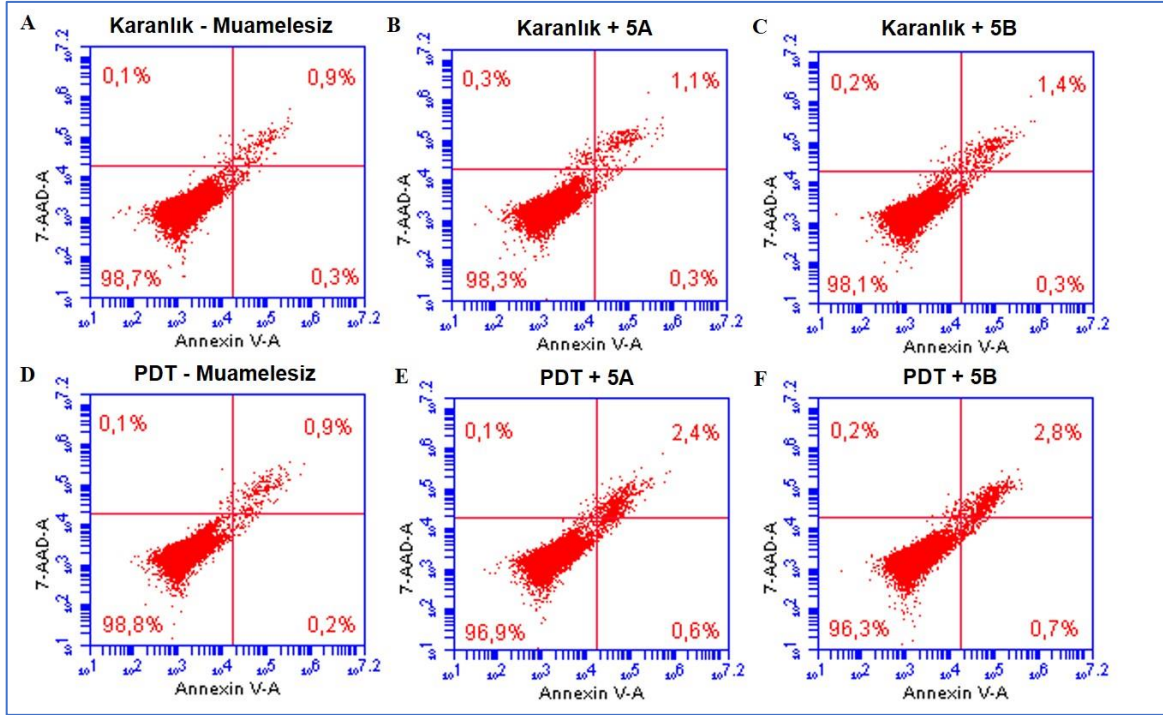
Resim 2. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

MDA-MB-231 hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarındaki tüm sağlıklı hücre popülasyonları %95'in üzerindeyken, 5A muamelesinin ardından PDT uygulanan gruptaki hücrelerin %57.4'ü sağlıklı, %31'i erken apoptotik, %11.1'i ise geç apoptotik evrede gözlemlendi. 5B muamelesini takiben PDT uygulanan hücrelerde ise %55.8 oranında sağlıklı hücre popülasyonu, %33.8 oranında erken apoptotik hücre popülasyonu, %9.7 oranında ise geç apoptotik hücre popülasyonu tespit edildi (Resim 3).



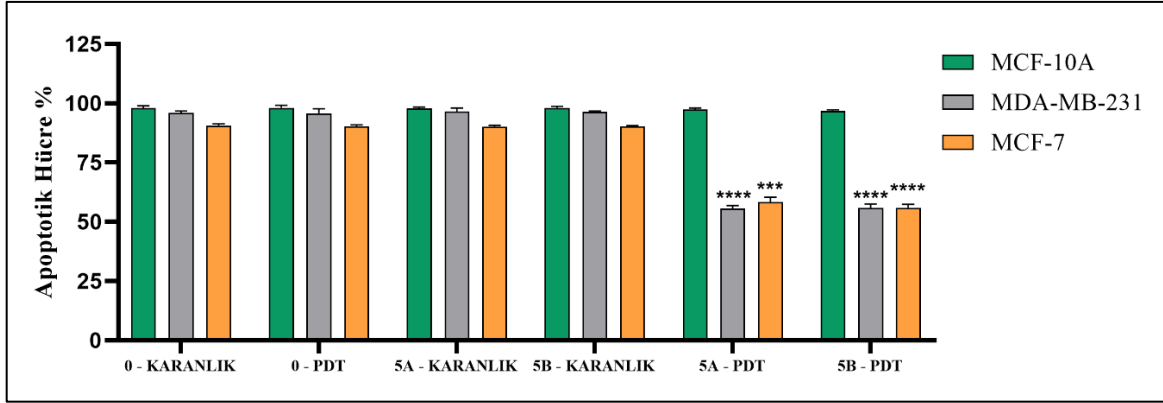
Resim 3. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

MCF-10A hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu tüm karanlık kontrol gruplarında %98'in üzerinde sağlıklı hücre popülasyonu görüldü. 5A muamelesinin ardından PDT uygulanan gruptaki hücrelerin %96.9'unun, 5B muamelesini takiben PDT uygulanan gruptaki hücrelerin ise %96.3'ünün sağlıklı hücre popülasyonunu oluşturduğu tespit edildi (Resim 4).



Resim 4. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B aracılı gelişen apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

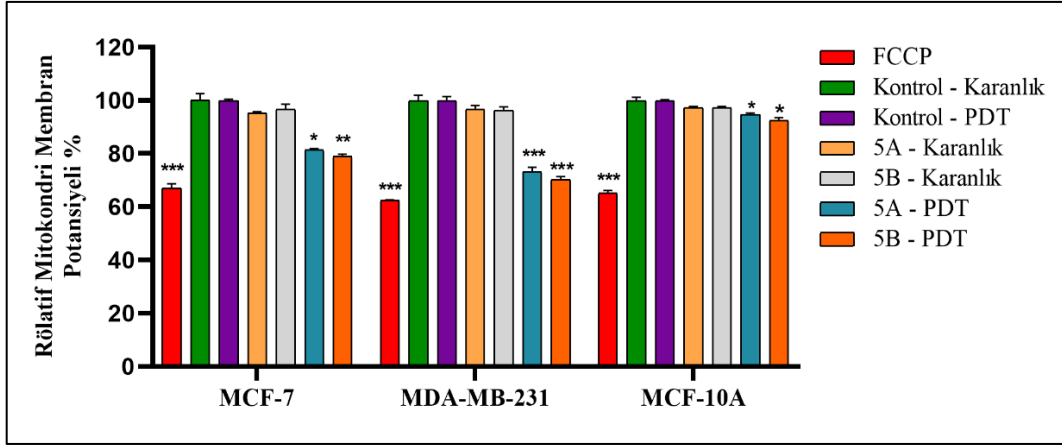
5A ve 5B'nin PDT aracılığıyla neden olduğu hücre ölümünün Annexin V/7-AAD boyama yöntemi ile analiz edilmesinin ardından, sağlıklı ve apoptotik hücre popülasyonlarındaki değişimler istatistiksel olarak analiz edildi. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında 5A ve 5B'nin PDT aracılı gerçekleştirdiği apoptotik hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gerçekleşen apoptotik hücre popülasyonlarındaki yüzdelik değişimler. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.5. Aminofenoltiyetanöl Çevreli 5A ve 5B'nin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Olan Etkilerinin Belirlenmesi

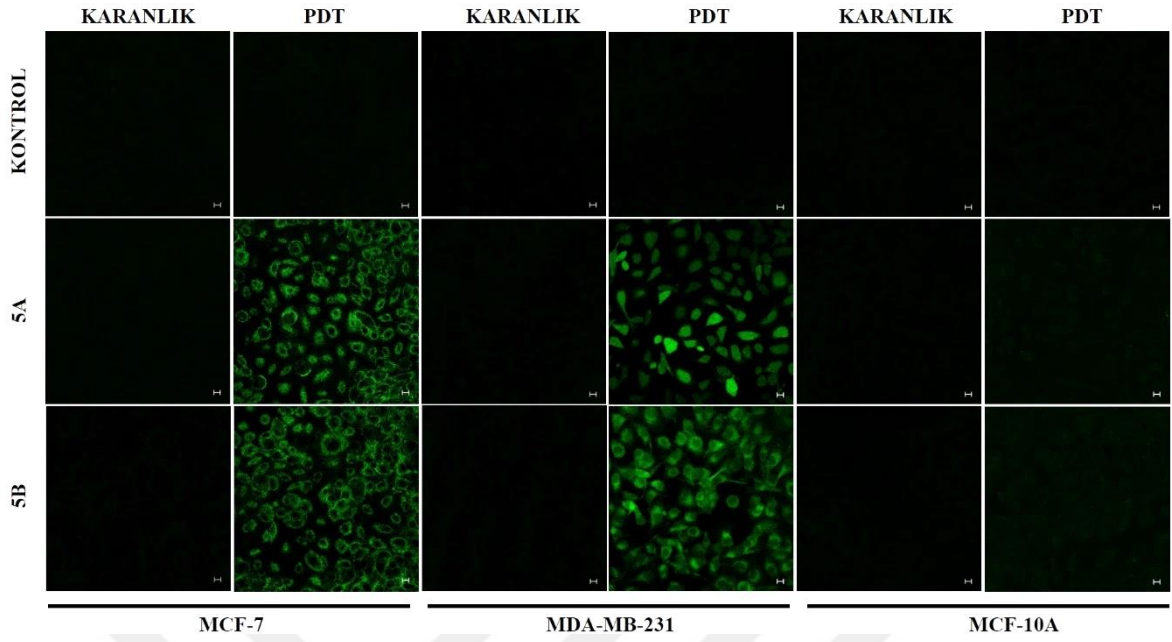
Aminofenoltiyetanöl çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında PDT aracılığıyla oluşturduğu mitokondriyal membran potansiyelinin değişimi florometrik olarak analiz edildi. Analizler sonucu, MCF-7 hücre hattının PDT gruplarındaki mitokondriyal membran potansiyeli 5A (1.5 μM) muamelesi durumunda %20.7 ve 5B (1.5 μM) muamelesi durumunda %22.1 oranında azalma gösterdi. MDA-MB-231 hücre hattında ise bu oranlar yaklaşık %26.9 ve %29.9 olarak tespit edildi. MCF-10A hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli değişimleri daha düşük seviyelerde kalırken, 5A-PDT ve 5B-PDT için yaklaşık olarak %5.1 ve %6.9 oranlarında azalma tespit edildi. FCCP pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tüm hücre hatlarının 5A ve 5B ile muamele edilen ve PDT uygulanan gruplarındaki mitokondriyal membran potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler görüldü (Şekil 11).



Şekil 11. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gelişen mitokondriyal membran potansiyeli değişimleri. *p < 0.05 **p < 0.01, ***p < 0.001.

4.6. Aminofenoltioetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücre İçi ROS Oluşumuna Etkisinin Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Aminofenoltioetanol çevreli 5A ve 5B muamelesi sonrası, hücre içerisindeki moleküler oksijenin reaktif oksijene dönüşümü konfokal mikroskop ile analiz edildi. Çalışılan üç hücre hattının da ana kontrol ve karanlık kontrol gruplarında ROS oluşumuna rastlanmadı. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında, 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A ve 5B muamelesini takiben PDT uygulanan gruplarda ROS oluşumunu belirten yeşil ışımlar gözlenirken, MCF-10A normal meme hücre hattının aynı konsantrasyondaki 5A ve 5B ile muamele edilen ve PDT uygulanan gruplarında zayıf sinyaller alınarak düşük düzeylerde ROS oluşumu tespit edildi (Resim 5).

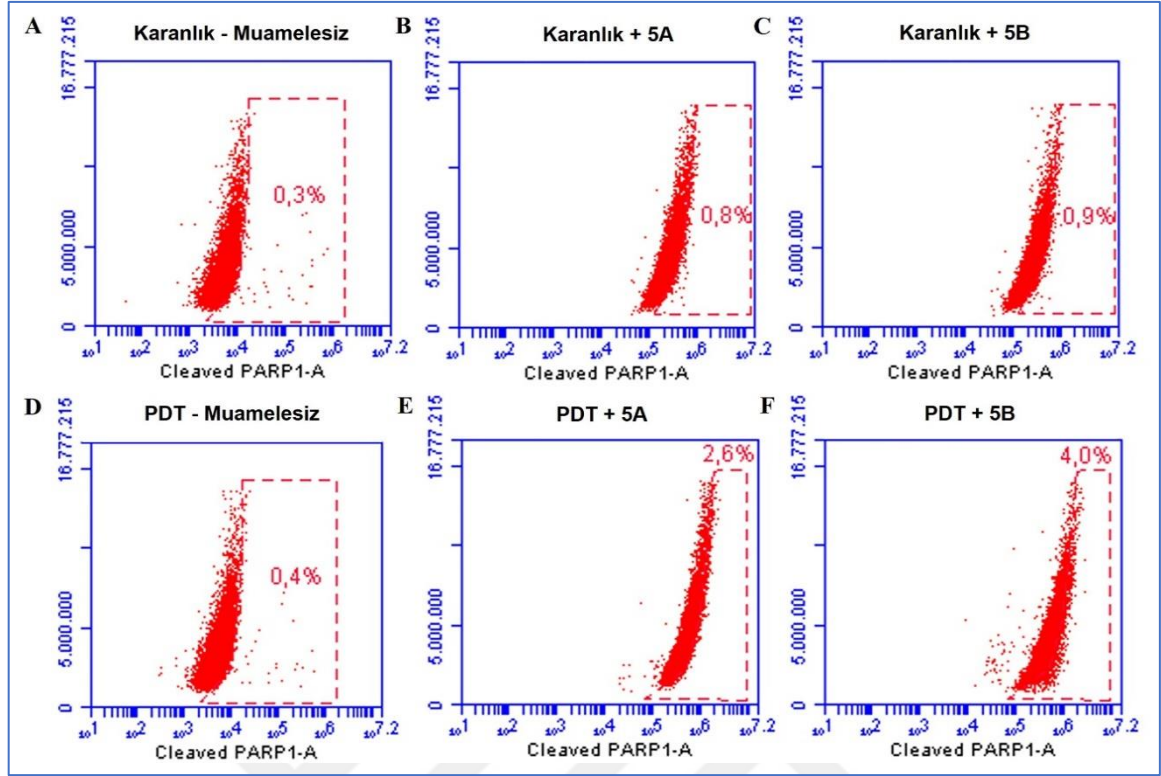


Resim 5. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında PDT'nin neden olduğu ROS oluşumunun konfokal mikroskop görüntüleri

4.7. Aminofenoltiyetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Kesilmiş (Cleaved) PARP1 Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

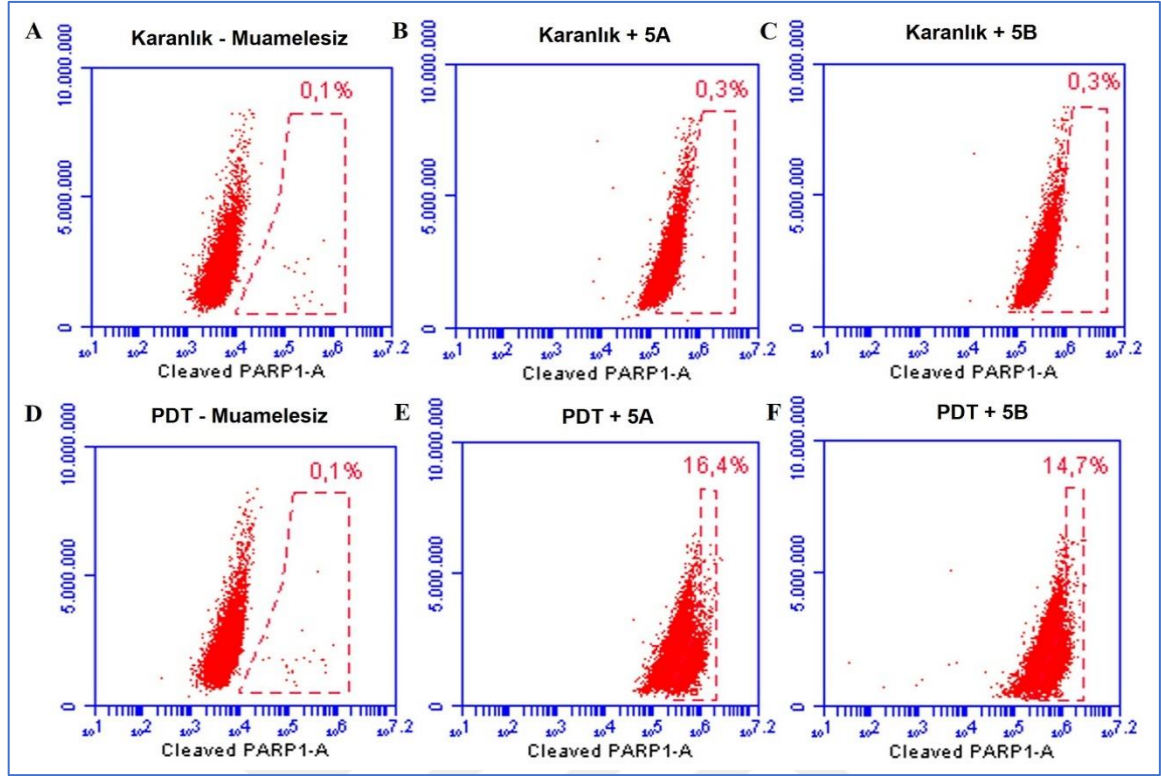
Çalışmada kullanılan aminofenoltiyetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına muamelesi ve PDT uygulamasını takiben kesilmiş PARP1 protein düzeyinde oluşan değişimler Alexa Fluor 647 mouse anti-cleaved PARP1 floresan işaretli antikor kullanılarak flow sitometrik olarak incelendi.

MCF-7 hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu tüm çalışma gruplarında düşük düzeyde kesilmiş PARP1 görüldü. Kontrol gruplarında tespit edilen kesilmiş PARP1 düzeyleri %0.3 ve %0.9 arasında değişkenlik gösterdi. Kesilmiş PARP1 seviyelerinin, 5A muameleli PDT gruplarında %2.6 ve 5B muameleli PDT gruplarında %4.0 olduğu belirlendi (Resim 6).



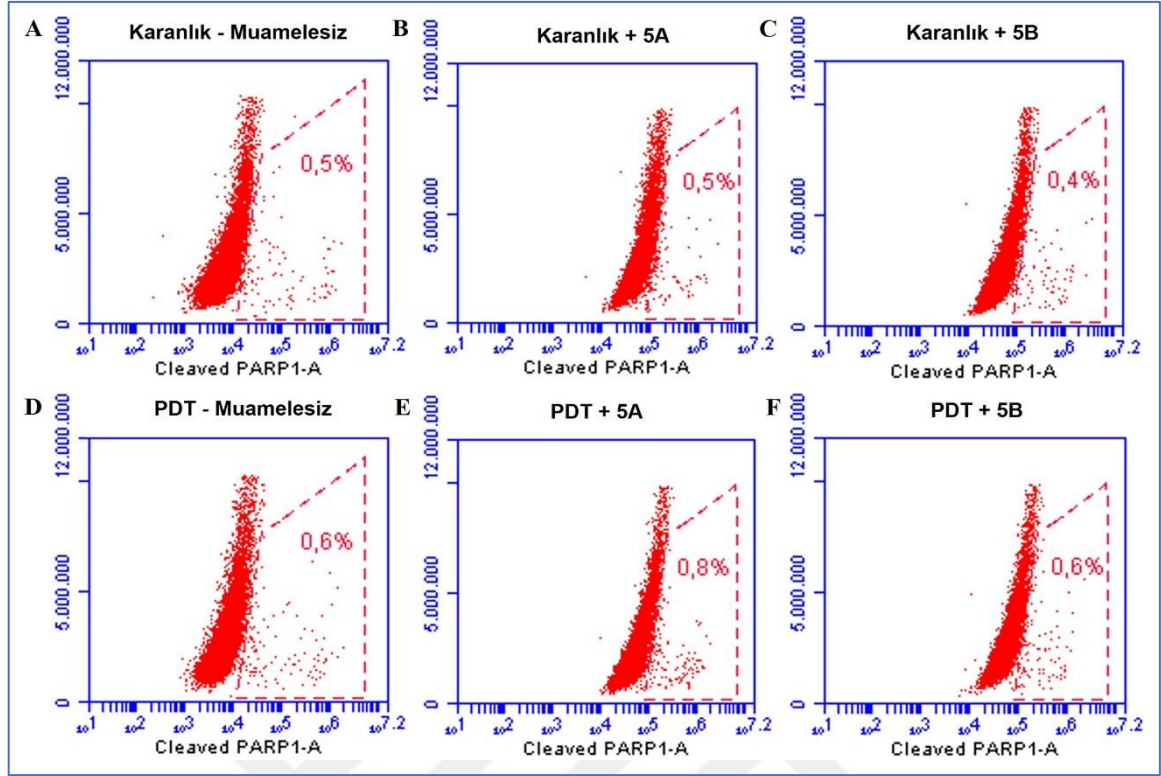
Resim 6. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

MDA-MB-231 hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu tüm kontrol gruplarında düşük düzeyde kesilmiş PARP1 görülürken, 5A ve 5B muameleli PDT gruplarında kesilmiş PARP1 protein düzeyinde artış tespit edildi. Kontrol gruplarında tespit edilen kesilmiş PARP1 seviyeleri %0.1 ve %0.3 iken, 5A muameleli PDT gruplarında bu oranın %16.4'e, 5B muameleli PDT gruplarında ise %14.7'ye yükseldiği görüldü (Resim 7).



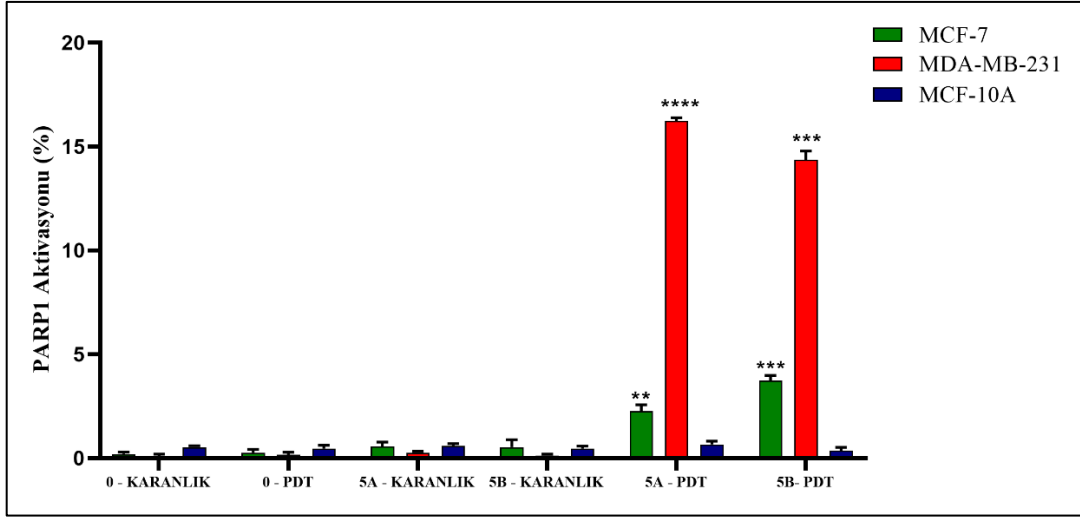
Resim 7. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

MCF-10A hücre hattının 1.5 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu tüm hücre gruplarında düşük düzeyde kesilmiş PARP1 tespit edildi. Kontrol gruplarında ve PDT grubunda tespit edilen kesilmiş PARP1 düzeyleri %0.4 ve %0.8 arasında değişkenlik gösterdi (Resim 8).



Resim 8. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi. **(A)** Muamelesiz ana kontrol grubu. **(B)** Yalnızca 5A ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(C)** Yalnızca 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu. **(D)** Yalnızca ışık ile muamele edilen ışık kontrol grubu. **(E)** 5A ile muamele edilen PDT grubu. **(F)** 5B ile muamele edilen PDT grubu.

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B'nin PDT aracılığıyla neden olduğu kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimlerin flow sitometrik olarak belirlenmesinin ardından veriler istatistiksel olarak analiz edildi. 5A ve 5B'nin PDT aracılı gerçekleştirdiği kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki artışın, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Şekil 12).

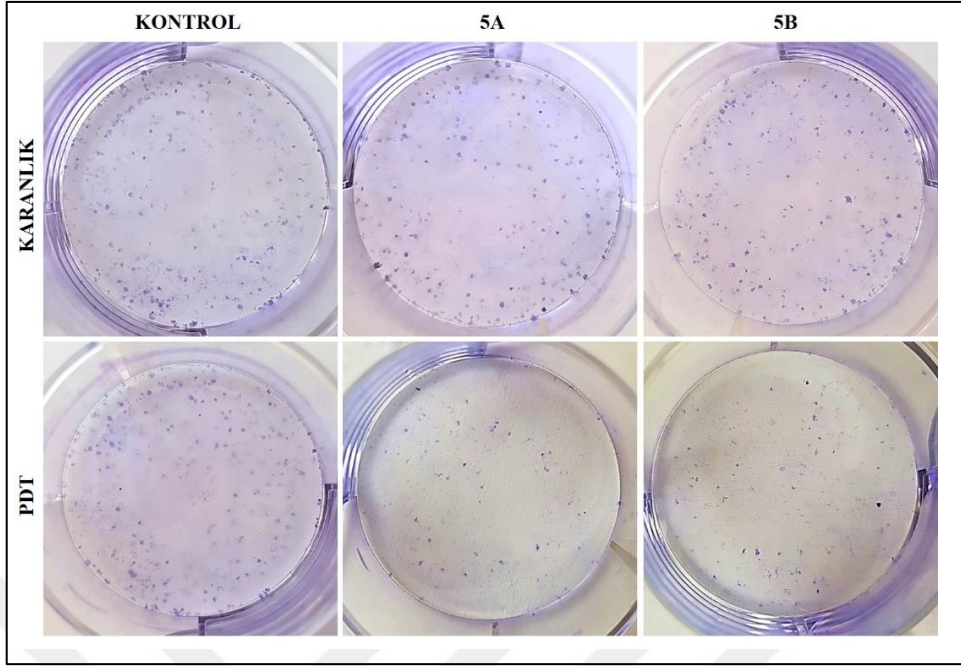


Şekil 12. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT aracılı gerçekleşen kesilmiş PARP1 protein düzeyindeki değişimler. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

4.8. Aminofenoltiyetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Koloni Oluşturma Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi

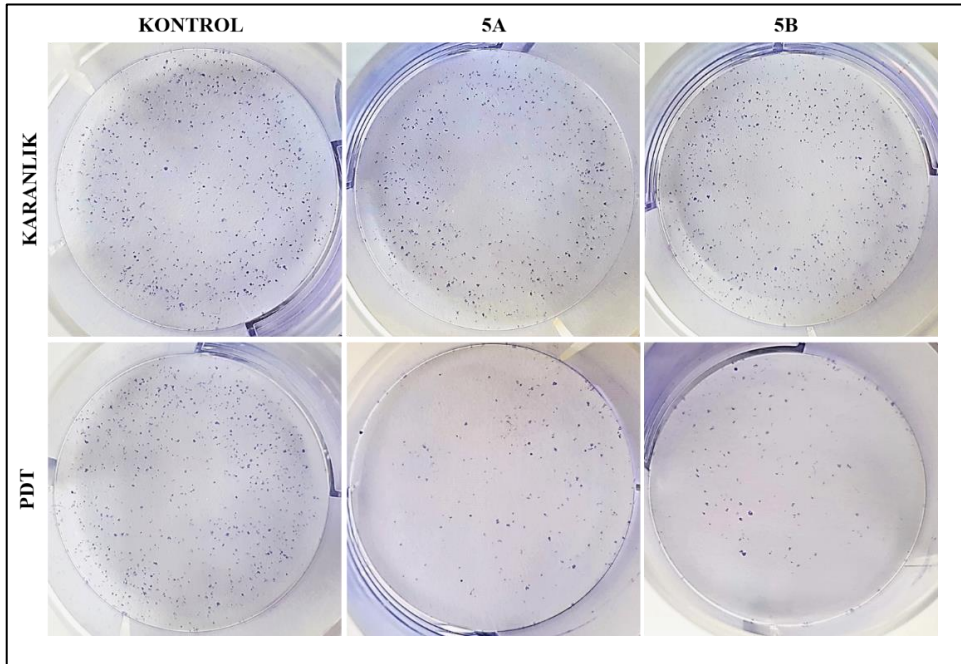
Çalışmada kullanılan aminofenoltiyetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına muamelesi ve PDT uygulamasının ardından, hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerindeki değişimin belirlenmesi için koloni formasyon analizi yapıldı.

MCF-7 meme kanseri hücre hattının 1 µM konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu kontrol gruplarındaki hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinde herhangi bir değişim olmadığı görüldü. Öte yandan PDT uygulanan gruplarda hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerini yüksek oranda kaybettikleri saptandı (Resim 9).



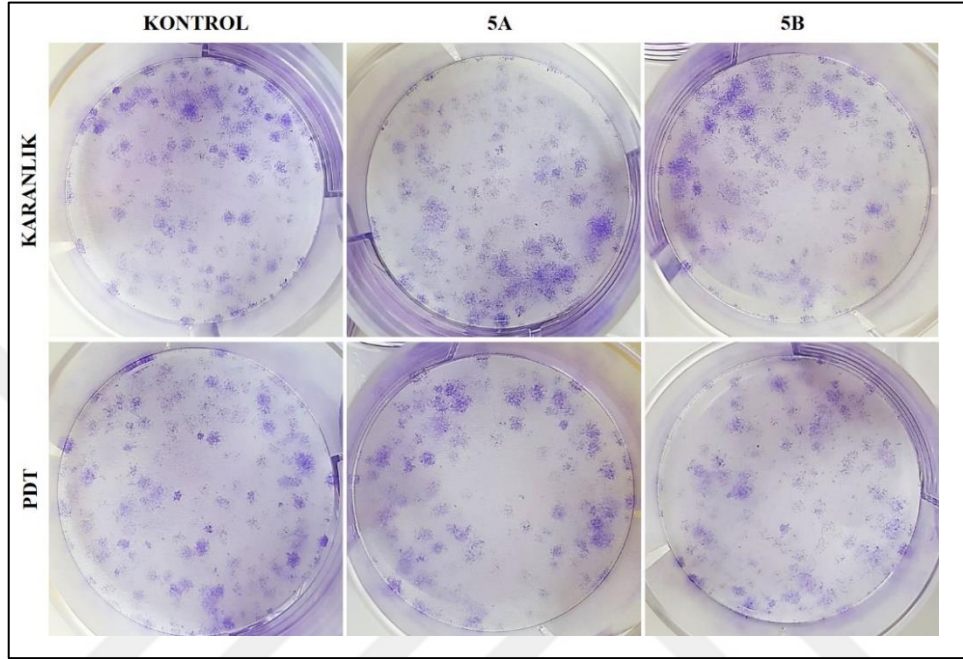
Resim 9. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının 1 μ M konsantrasyondaki 5A veya 5B ile muamelesi sonucu kontrol gruplarındaki hücrelerin koloni oluşumunu sağladığı gözlenirken, PDT gruplarında koloni oluşumu yüksek oranda azaldı (Resim 10).



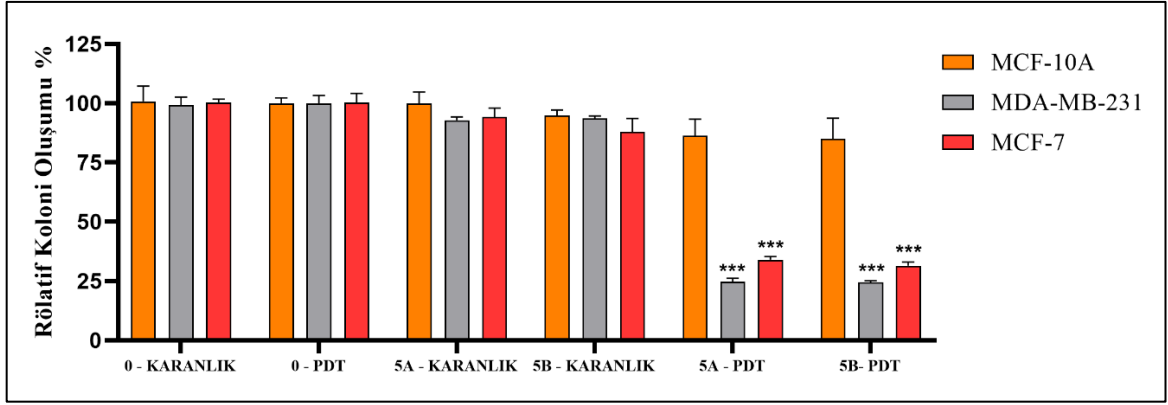
Resim 10. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi

MCF-10A normal meme hücre hattında ise 1 μ M konsantrasyondaki 5A veya 5B ile muamele edilen hücreler koloni oluşturma kabiliyetlerini sürdürürken, kontrol grupları ve PDT grubu arasında bu açıdan büyük bir fark oluşmadığı gözlemlendi (Resim 11).



Resim 11. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi sonrası PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin koloni formasyonu üzerinde PDT aracılığıyla oluşturduğu etkileri belirlemek için Image J programı kullanıldı. Koloniler bu program aracılığıyla sayıldıktan sonra veriler istatistiksel olarak analiz edildi. MCF-7 hücrelerinde 5A ile muamele edilen gruplardaki koloni oluşumu %67, 5B ile muamele edilen gruplardaki koloni oluşumu ise %69 oranında azaldı. MDA-MB-231 hücrelerinin 5A veya 5B ile muamele edilen gruplarındaki koloni oluşumunda yaklaşık %75 azalma tespit edildi. MCF-10A hücrelerinde ise bu oranlar sırasıyla %12 ve %14 olarak saptandı. 5A-PDT ve 5B-PDT'nin, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi (Şekil 13).

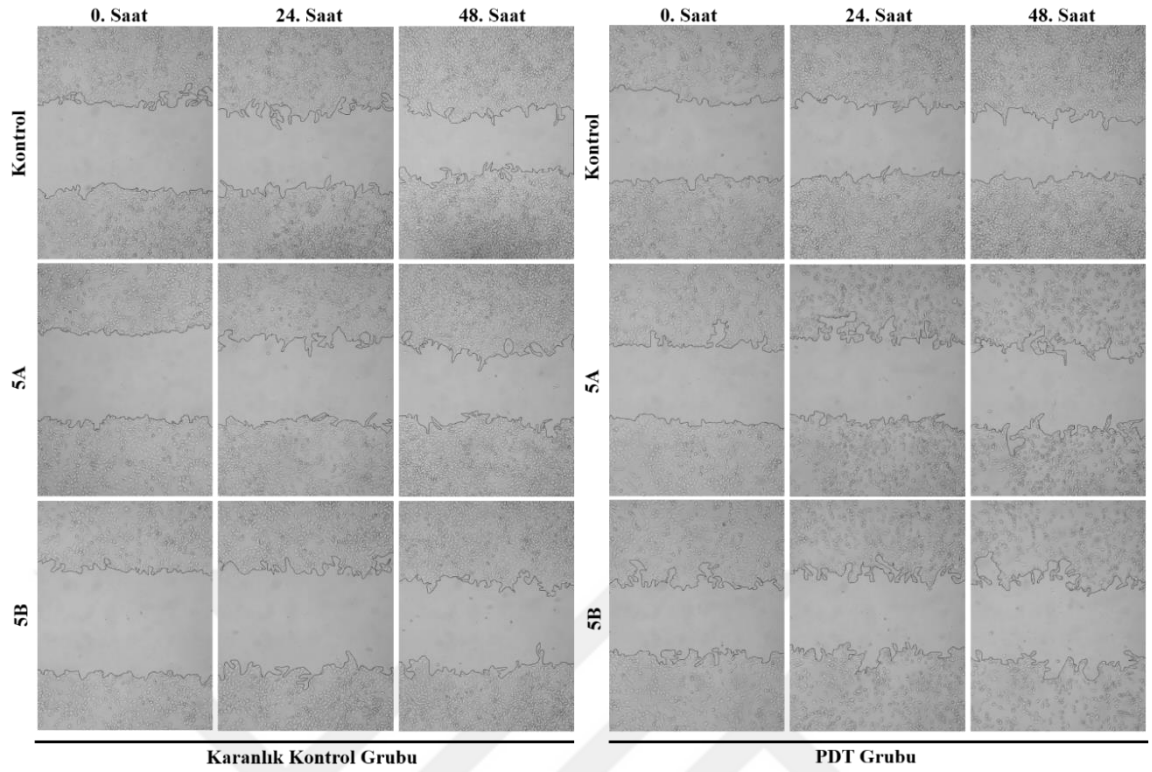


Şekil 13. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının koloni formasyonuna etkisi. ***p < 0.001.

4.9. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Hareket Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi

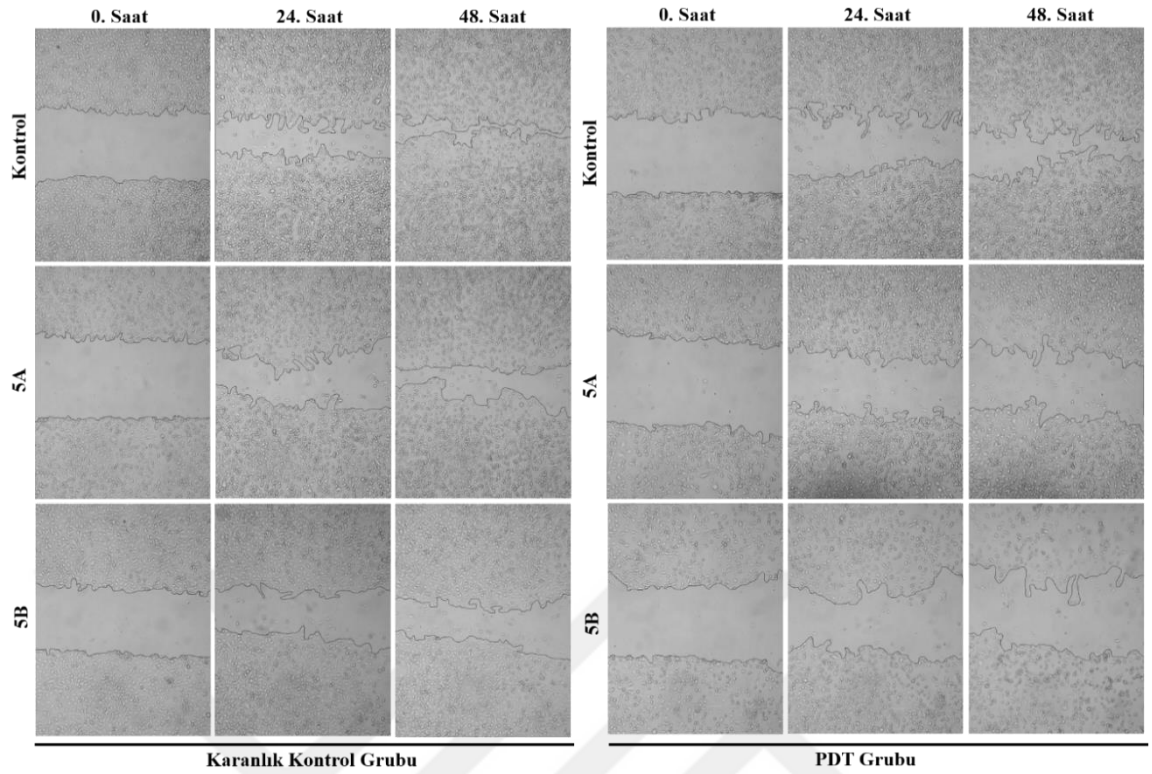
Aminofenoltiyoetanol çevreli 5A ve 5B'nin, PDT uygulamasını takiben MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin hareket kabiliyetine etkisi, *in vitro* yara iyileşmesi modeli ile analiz edildi.

MCF-7 meme kanseri hücre hattının 1 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarındaki hücrelerin 24. ve 48. saatlerdeki görüntülerinde yara alanının kapanmaya başladığı görüldü. Buna karşın PDT grubundaki hücrelerde, muamele yapılmayan ve yalnızca ışığa maruz bırakılmış kontrol hücrelerindeki yara alanının kapanmaya başladığı fakat 5A veya 5B ile muamele edilen hücrelerin yara alanlarında herhangi bir kapanma olmadığı belirlendi (Resim 12).



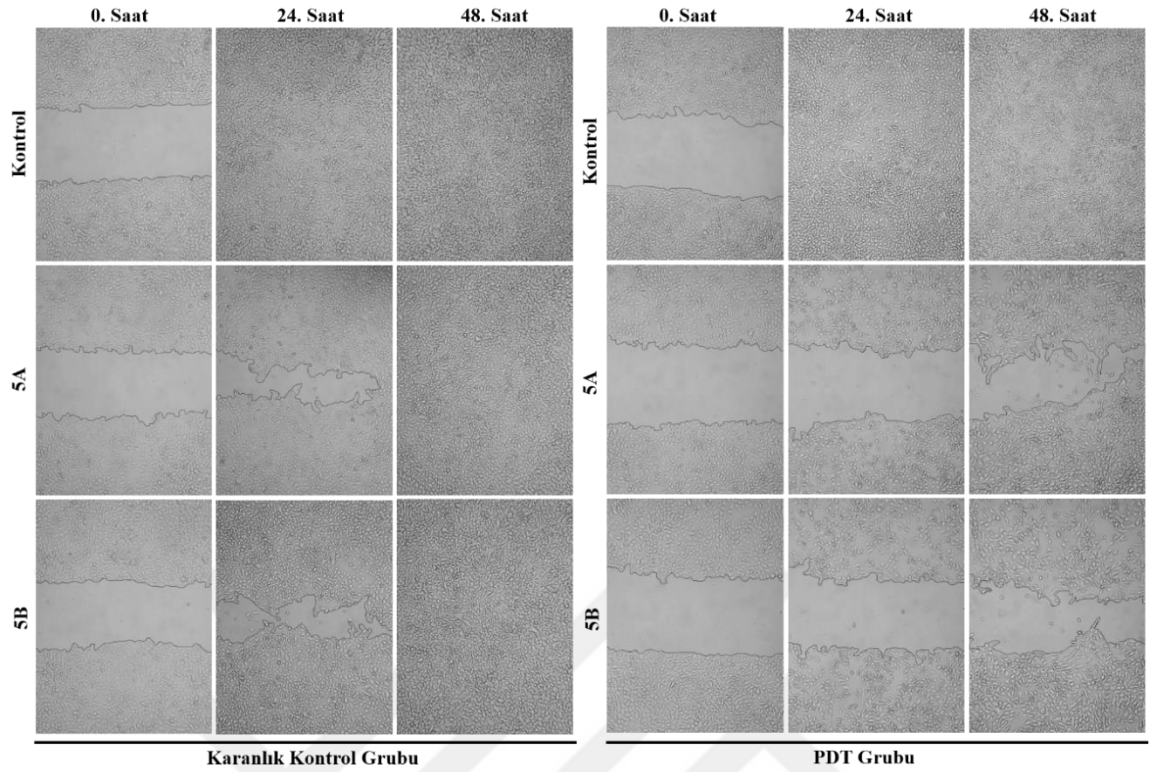
Resim 12. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının $1 \mu\text{M}$ konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu, karanlık kontrol gruplarındaki hücrelerin 24. ve 48. saatlerdeki görüntülerinde yara alanının kapanmaya başladığı tespit edildi. PDT grubunda ise muamele edilmeyen ve sadece ışığa maruz bırakılan kontrol hücrelerinde yara alanlarının kapanmaya başladığı gözlenirken, 5A veya 5B ile muamele edilen hücrelerdeki yara alanlarının kontrol gruplarına kıyasla yeterli kapanmayı sağlayamadığı belirlendi (Resim 13).



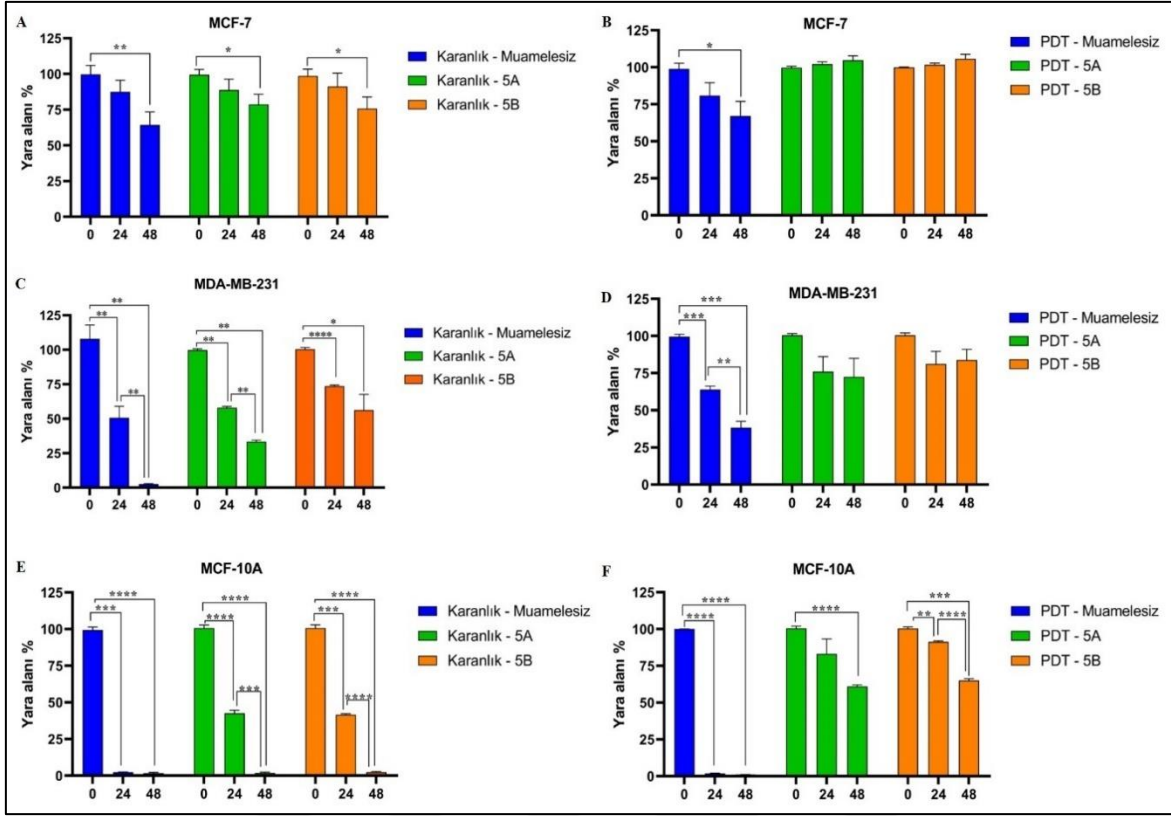
Resim 13. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi

MCF-10A normal meme hücre hattının 1 μ M konsantrasyona sahip 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarındaki hücrelerin 24. saatteki görüntülerinde yara alanının hızla kapandığı, muamele edilmeyen hücrelerdeki yara alanının ise tamamen kapandığı görüldü. Hücrelerin 48. saatte alınan görüntülerinde ise karanlık kontrol grubundaki tüm hücrelerde yara alanındaki kapanmanın tamamlandığı gözlemlendi. 5A veya 5B ile muamele edilmeyen ve sadece ışığa maruz bırakılan kontrol gruplarında yara alanının 24 saat içerisinde tamamen kapandığı görüldü. Buna karşın, 5A veya 5B ile muamele edilen PDT grubu hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde alınan görüntülerinde, yara alanının daraldığı fakat kapanmanın tamamlanmadığı belirlendi (Resim 14).



Resim 14. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin hareket kabiliyetine etkisi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin, hücrelerin hareket kabiliyeti üzerinde PDT aracılığıyla oluşturduğu etkileri belirlemek için Image J programı kullanılarak yara alanları hesaplandı. Hücrelerin hareket kabiliyetleri, kapalı (iyileşmiş) alan yüzdesi dikkate alınarak belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi. PDT uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin hücre hareketini kısıtladığı, bu nedenle yara alanındaki kapanmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Bu hücrelerin karanlık kontrol gruplarında yara alanındaki kapanmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. MCF-10A normal meme hücrelerinde ise karanlık kontrol grupları ve PDT gruplarının yara alanındaki kapanma istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi (Şekil 14).

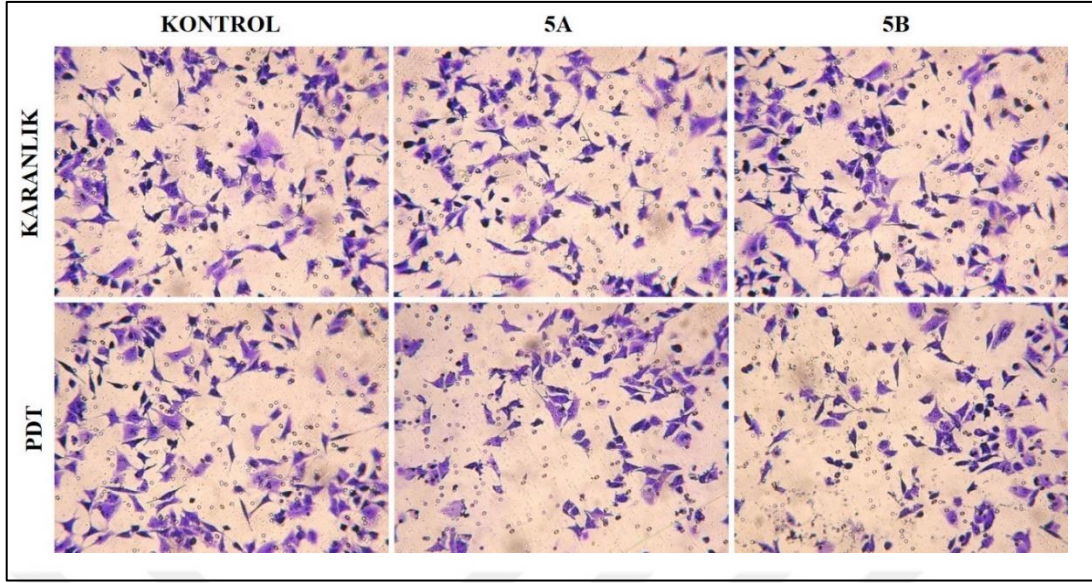


Şekil 14. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının yara alanındaki değişimlere etkisi. **(A)** MCF-7 hücre hattının karanlık kontrol grubu. **(B)** MCF-7 hücre hattının PDT grubu. **(C)** MDA-MB-231 hücre hattının karanlık kontrol grubu. **(D)** MDA-MB-231 hücre hattının PDT grubu. **(E)** MCF-10A hücre hattının karanlık kontrol grubu. **(F)** MCF-10A hücre hattının PDT grubu. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

4.10. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin Migrasyon Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi

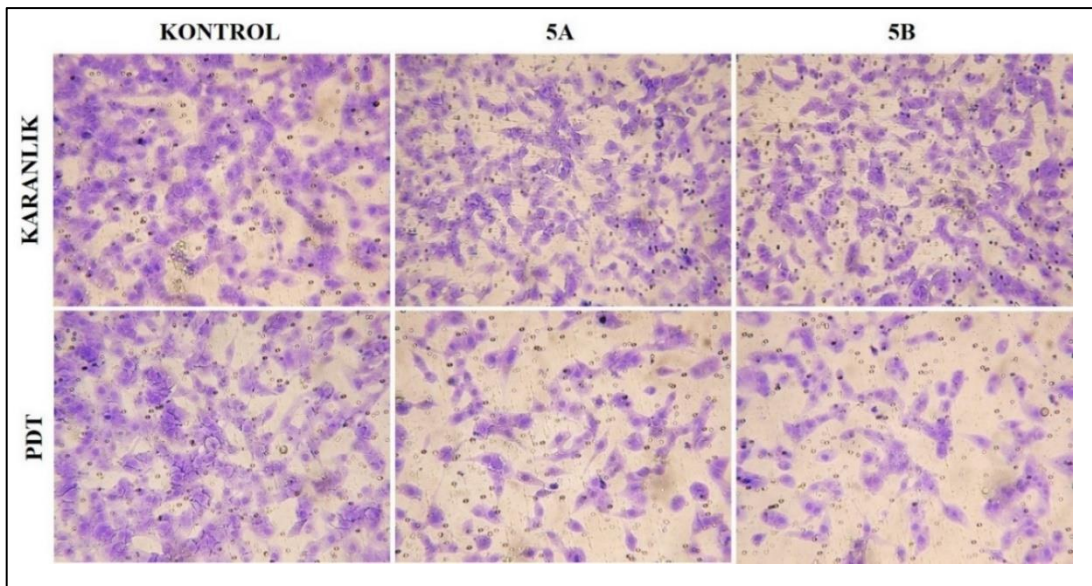
Çalışmada kullanılan aminofenoltiyoetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarına muamelesi ve PDT uygulamasının ardından, hücrelerin migrasyon kabiliyetlerindeki değişimin belirlenmesi için transwell migrasyon deneyi gerçekleştirildi.

Düşük metastatik potansiyele sahip zayıf agresif hücreler olarak bilinen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarındaki hücrelerin migrasyon kabiliyetlerinde herhangi bir kısıtlama olmadığı görüldü. Buna karşın, 5A veya 5B ile muamele edilen PDT grubundaki hücrelerin migrasyon kapasitelerinin yüksek oranda kısıtlandığı ve transwell sistemde migrasyon yapabilen hücre sayısının azaldığı tespit edildi (Resim 15).



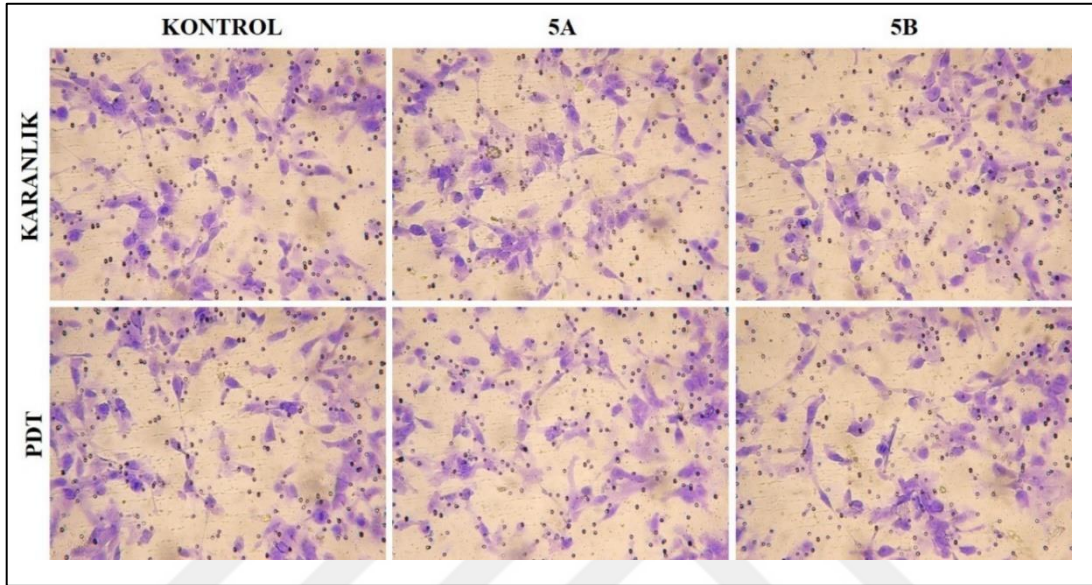
Resim 15. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi

Yüksek migrasyon kapasitesine sahip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının 5A veya 5B ile muamelesinin ardından, karanlık kontrol gruplarında transwell sistemden migrasyon yapabilen hücre sayısı muamelesiz kontrollere kıyasla azalma gösterdi. Bununla birlikte, 5A veya 5B ile muamele edilen PDT grubundaki hücrelerin migrasyon kapasitelerinin yüksek oranda kısıtlandığı ve transwell sistemde migrasyon yapabilen hücre sayısının büyük ölçüde azaldığı görüldü (Resim 16).



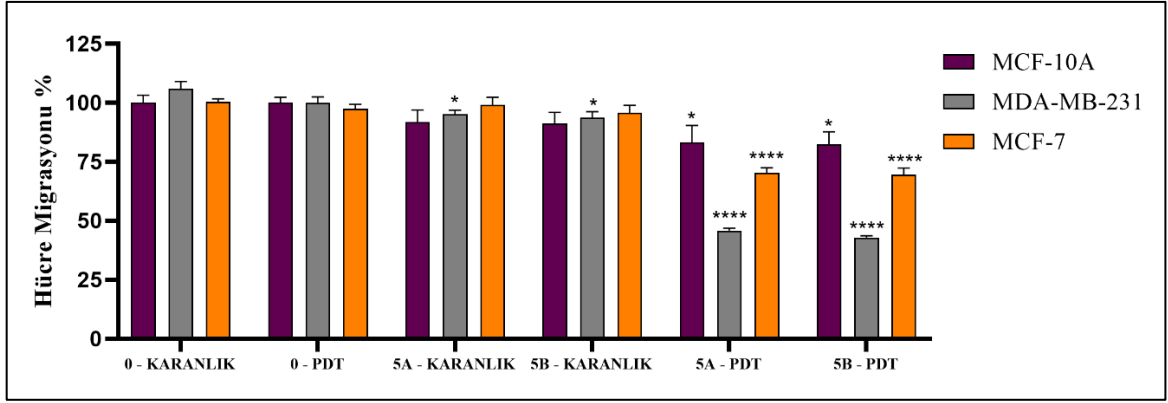
Resim 16. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi

Normal meme hücre hattı olarak kullanılan MCF-10A hücrelerinin 5A veya 5B ile muamelesi sonucu, karanlık kontrol gruplarının transwell sistemde migrasyon yapabilen hücre sayısında büyük bir farklılık görülmezken; PDT grubundaki hücrelerin migrasyon kapasitelerinin, 5A ve 5B muamelesinden düşük seviyede etkilendiği belirlendi (Resim 17).



Resim 17. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin migrasyon kabiliyetine etkisi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin, PDT aracılığıyla hücrelerin migrasyon kabiliyeti üzerinde oluşturduğu etkileri belirlemek için Image J programı kullanıldı. Migrasyon yapabilen hücre sayıları belirlenerek veriler istatistiksel olarak analiz edildi. MCF-7 hücrelerinin 5A-PDT grubundaki migrasyon seviyesinin %30, 5B-PDT grubundaki migrasyon seviyesinin ise %32 azaldığı belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinin 5A-PDT grubunda %55, 5B-PDT grubunda ise %58 oranında azalma tespit edildi. MCF-10A hücrelerinde bu oranlar sırasıyla %16 ve %15 olarak belirlendi. PDT uygulanan MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A normal meme hücre hattında 5A ve 5B muamelesinin, migrasyon yapabilen hücre sayısını istatistiksel olarak azalttığı tespit edildi (Şekil 15).

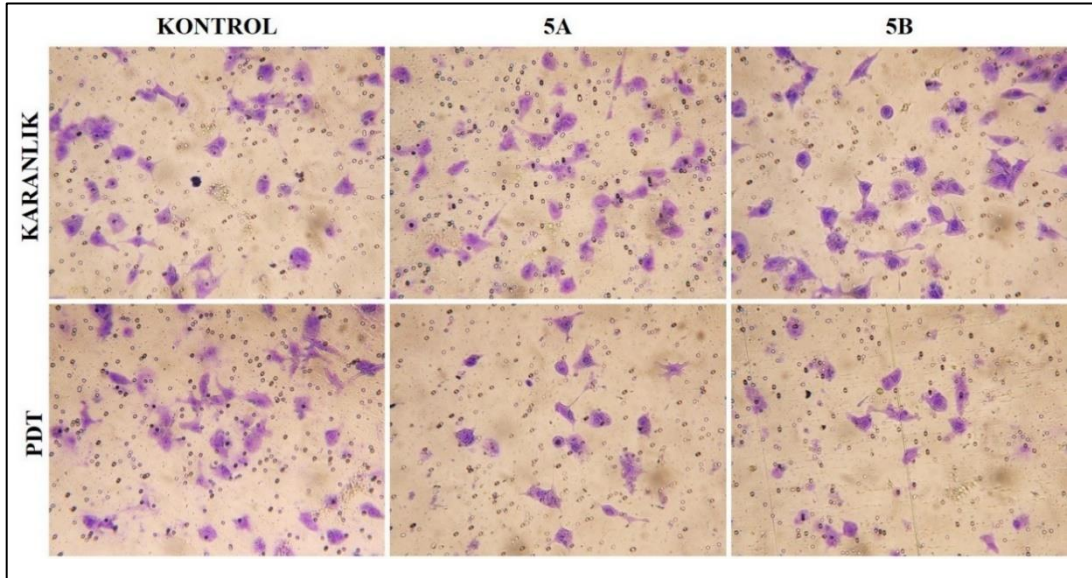


Şekil 15. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının migrasyondaki değişimlere etkisi. *p < 0.05, ****p < 0.0001.

4.11. Aminofenoltiyoetanol Çevreli 5A ve 5B'nin Hücrelerin İnvazyon Kabiliyetlerine Etkisinin İncelenmesi

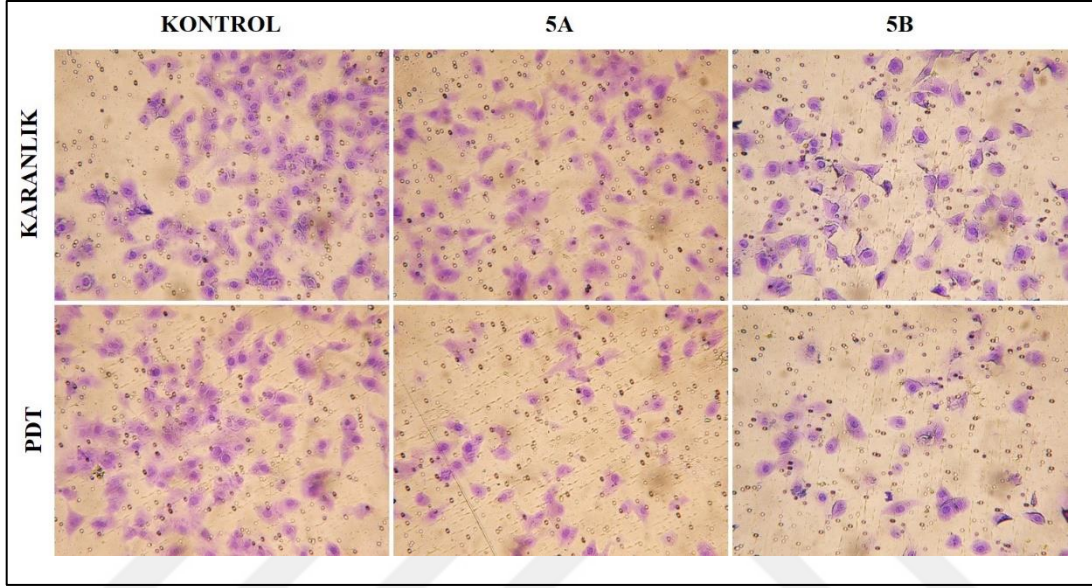
Çalışmada kullanılan aminofenoltiyoetanol çevreli 5A ve 5B'nin, MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin invazyon kabiliyetleri üzerindeki PDT aracılı etkisinin belirlenmesi için matrijel invazyon analizi yapıldı.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında, 5A veya 5B ile muamele edilen karanlık kontrol grubu hücrelerinin invazyon kabiliyetlerinde önemli bir değişim olmazken, PDT grubundaki hücrelerin invazyon kapasitelerinin azaldığı görüldü (Resim 18).



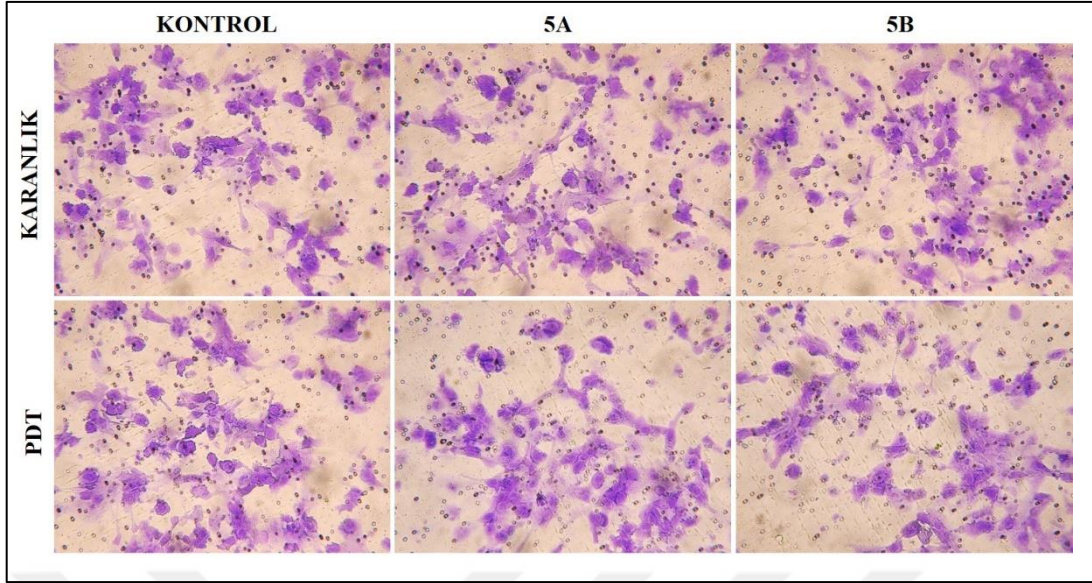
Resim 18. MCF-7 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının 5A veya 5B ile muamele edilmiş karanlık kontrol grubunda, muamelesiz kontrollere kıyasla matrijel sisteminden invaze olabilen hücre sayısında azalma görüldü. 5A veya 5B ile muamele edilen PDT grubundaki hücrelerin invazyon kapasitelerinin ise yüksek oranda kısıtlandığı ve transwell sistemde migrasyon yapabilen hücre sayısının büyük ölçüde azaldığı görüldü (Resim 19).



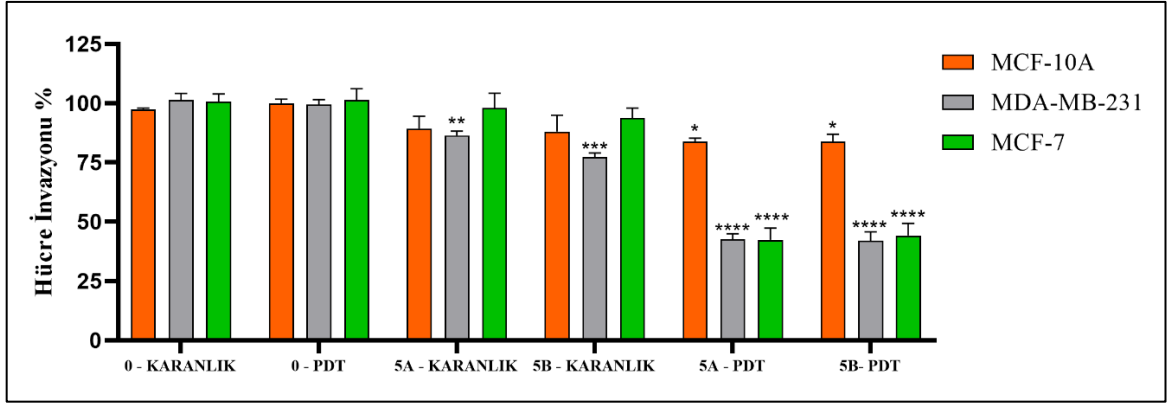
Resim 19. MDA-MB-231 hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi

Normal meme hücre hattı olarak kullanılan MCF-10A hücrelerinin, 5A veya 5B ile muamelesi sonucu karanlık kontrol gruplarında matrijelden invaze olabilen hücre sayısında önemli bir farklılık görülmezken; PDT grubunda invazyon yapabilen hücre sayısının karanlık kontrollere kıyasla azaldığı görüldü (Resim 20).



Resim 20. MCF-10A hücre hattında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının hücrelerin invazyon kabiliyetine etkisi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin, hücrelerin invazyon kabiliyeti üzerinde PDT aracılığıyla oluşturduğu etkiyi analiz etmek için Image J programı kullanılarak invazyon yapan hücre sayıları tespit edildi. Tüm veriler istatistiksel olarak analiz edildi. MCF-7 hücrelerinin invazyon kapasitesinin, 5A-PDT grubunda %55, 5B-PDT grubunda ise %51 azaldığı saptandı. MDA-MB-231 hücrelerinin, 5A-PDT ve 5B-PDT grubunda yaklaşık %60 azalma tespit edildi. MCF-10A hücrelerinde ise 5A-PDT ve 5B-PDT sonrası bu oran yaklaşık %17 olarak belirlendi. PDT uygulanan MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A normal meme hücre hattında 5A ve 5B muamelesinin, invazyon yapabilen hücre sayısını istatistiksel olarak azalttığı tespit edildi (Şekil 16).



Şekil 16. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesi ile PDT uygulamasının invazyondaki değişimlere etkisi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır. Tümöral yapının meme bölgesinde sınırlı kaldığı ya da yalnızca koltuk altı lenf düğümlerine yayıldığı erken evrede tedavi şansı yüksektir ve hastalarda iyileşme oranı fazladır. Daha ileri evrelerdeki meme kanseri vakalarında ise mevcut tedavi seçeneklerinden yararlanılarak elde edilen başarı yüzdesi düşük oranlarda seyretmektedir. İlerlemiş meme kanserinde tedavinin ana hedefi, yaşam kalitesini sürdürerek semptomları kontrol etmek ve tedaviye bağlı düşük toksisite ile hayatta kalma süresini uzatmaktır. Buna rağmen, güncel tedavide kullanılan multimodal yaklaşımlar yan etkilere neden olarak hastaların yaşam kalitesi olumsuz etkilenmektedir. Bu noktada alternatif tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (200).

PDT, son yıllarda gerçekleştirilen anti kanser tedavi araştırmalarının odak noktası haline gelen alternatif bir yöntemdir. PDT'nin ana elemanları, kullanılacak olan fotosensitizer, fotosensitizerin etkinleşebileceği uygun dalga boyundaki ışık ve moleküler oksijendir. Bu üç unsur arasında gerçekleşen moleküler düzeyde bir reaksiyon, fotosensitizerin biriktiği hücrelerde ROS oluşturarak, apoptoz veya nekroz gibi hücre ölüm yollarının aktifleşmesine neden olur fakat sağlıklı hücreler genellikle zarar görmez. Başlangıçta fotosensitizerin sistemik uygulanmasına dayanan PDT, topikal uygulanabilirliğin anlaşılması ile tedavi yaklaşımları arasında ön plana çıkmıştır (201).

PDT etkinliğini belirleyen unsurlardan en önemlisi fotosensitizer molekülleridir. Yıllar içinde, farklı kimyasal yapılara sahip fotosensitizerler sentezlenerek PDT aracılığıyla hücrelerde oluşturdukları etkiler incelenmiştir. Ftalosiyaninler, optimal fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri ile PDT'de kullanılan üçüncü nesil fotosensitizer türevleri arasında ön plana çıkmaktadır. Yıllar içinde, ftalosiyanin yapısına farklı katyonik veya anyonik gruplar dahil edilerek, yüksek singlet oksijen kuantum verimine ve biyolojik dokularda daha iyi çözünürlüğe sahip olan substitue ftalosiyaninler sentezlenmiştir (23). Özellikle Schiff bazı içeren ftalosiyaninlerin sentezi ve biyolojik aktivitelerine bağlı olarak gösterdikleri antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antitümöral özellikler, bu yapıların farklı formlarının PDT'de yaygın olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (202). Literatüre kazandırılmış farklı çalışmalar, Schiff bazı komplekslerinin PDT ile kullanılması durumunda ortaya çıkan yüksek düzeydeki anti kanser etkiyi doğrulamaktadır (80, 96, 203-205). Schiff bazı içeren substitue ftalosiyaninlerin hücre içerisinde yüksek düzeyde ROS oluşturması ve mitokondri,

lizozom ya da çekirdek gibi hücre için hayati yapıları hedeflediğinin gösterilmesi, bu yapıların PDT’de kullanılması ile ortaya çıkan moleküler düzeydeki etkinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca, substitue ftalosiyanınların kemoterapi başta olmak üzere farklı tedavi stratejileri ile kombine halde kullanılabilirliği de bu ftalosiyanınların PDT’deki rolünü kuvvetlendirmektedir (206).

Çalışmamızda, Schiff bazı içerikli aminofenoltiyetanol çevreli yeni SiPc moleküllerinin meme kanseri hücre hatları üzerindeki PDT etkinliği araştırılmıştır. Schiff bazı ve SiPc türevlerinin biyolojik sistemler üzerindeki rolü ve etkinliği göz önüne alındığında, Schiff bazlı türevlere sahip SiPc’lerin etkili bir PDT ajanı için tüm gereksinimleri karşıladığı ve PDT’de kullanılmaya elverişli olduğu düşünülmüştür.

İkilenme zamanları belirlenmiş ve optimal kültür ortamları oluşturulmuş MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarını ve tümörjenik olmayan MCF-10A meme hücre hattını içeren çalışmamızın ilk aşamasında, ekibimizce sentezlenen 5A ve 5B moleküllerinin, 10 j/cm² enerji yoğunluğundaki ışık ile etkinleştirilmesi sonucu doza bağlı olarak değişen canlılık verileri elde edilmiştir. Tüm hücrelerin karanlık kontrol gruplarında görülen yüksek seviyelerdeki canlılık oranları, PDT işleminin uygulandığı hücre gruplarında doza bağlı şekilde ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Çalışmamızın devamındaki deneysel prosedürlere bağlı olarak, 1.5 µM ve 1 µM konsantrasyonlarında 5A veya 5B’nin kullanıldığı karanlık kontrol grubu hücrelerinde, canlılık değerleri %95 ve üzeri seviyelerde ölçülmüştür. Aynı muameleler PDT gruplarına uygulandığında, 1 µM konsantrasyondaki 5A ve 5B muamelesinin kanser hücrelerindeki canlılığı yaklaşık %30, 1.5 µM konsantrasyondaki 5A ve 5B muamelesinin ise %45 oranında düşürdüğü görülmüştür. Bu durum, ilk kez sentezlenmiş olan moleküllerin, belirlenen dalga boyundaki ışık ile etkinleşerek hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiğinin bir işaretidir. Işık ile etkinleşerek hücrelerdeki sitotoksik etkisini üst düzeylere çıkaran fotosensitizer moleküller, PDT’nin en önemli unsurlarından biridir (53). Karanlık kontrol gruplarında oluşan düşük sitotoksositeye rağmen PDT gruplarında gözlenen artmış sitotoksik etkiler, 5A ve 5B’nin fotosensitizer olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar, farklı fotosensitizer moleküllerin meme kanseri hücre hatlarında etkili olabileceğini göstermiştir. Yapısına sülfat grupları eklenerek çözünürlüğü artırılmış çinko ftalosiyanınların kullanıldığı bir çalışmada, ışık ve ftalosiyanın dozuna bağlı olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattının canlılığında azalmalar tespit edilmiştir (207). Farklı bir çalışmada, silisyum ftalosiyanın 4

olarak bilinen ve ticari olarak satın alınabilen silisyum ftalosiyanınların, MCF-7 hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkiler incelenmiştir (208). Çalışmamız için yeni sentezlenmiş olan Schiff bazı içerikli ve aminofenoltiyetanol çevreli 5A ve 5B'nin, kanser hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda bile sitotoksik etki göstermesi ve aynı konsantrasyonların normal meme hücrelerinde canlılığı yüksek seviyelerde tutması, çalışmamızdan elde edilen ilk verilerin en önemli noktasıdır. Ftalosiyanın moleküllerinin neoplastik dokulara karşı yüksek seçicilik ve fotokimyasal aktivite göstermesi istenir (53, 209). Bunun yanı sıra, tümör hücrelerinde yüksek metabolik aktivite ve düşük pH seviyeleri gibi çeşitli faktörlerin, PDT'de kanser hücrelerinin seçici ölümünü desteklediği düşünülmektedir (52, 61). Yeni sentezlenen 5A ve 5B molekülleri, PDT çalışmaları için ideal olan fotosensitizer moleküllerin kanser hücrelerine spesifik sitotoksik etkiler sergilemesi gerektiği hipotezi ile örtüşmüş ve kanser hücrelerinde sitotoksik etki sağlamıştır. Yapmış olduğumuz deneyler sonucu elde edilen hücre canlılığı verileri, ilk kez deneysel olarak test edilen 5A ve 5B'nin, başlangıç aşamasındaki anti kanser çalışmalarda kullanılabilirliğini desteklemiştir.

Sitotoksik etkileri hücre canlılığı deneyleri ile tanımlanmış olan 5A ve 5B'nin, hücrelerde oluşturduğu apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümünün kantitatif olarak incelenmesi için Annexin V/7AAD boyama yöntemi kullanılmıştır. Erken aşamadaki apoptozun ayırt edici özelliklerinden biri, hücre iç zarındaki fosfatidilserinlerin dış yaprağa taşınmasıdır. Annexin V'in, hücre zarının dış yaprağına transloke olan fosfatidilserinlere bağlanması sayesinde apoptotik hücreler flow sitometrik olarak analiz edilebilmektedir (210, 211). Canlılık analizlerinde elde edilen verilere benzer şekilde, tüm karanlık kontrol gruplarında çok düşük seviyelerde hücre ölümü tespit edilirken, özellikle MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarının PDT gruplarında hücre ölümü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselmiştir. Annexin V/7AAD boyama metodu kullanılarak analiz edilen hücre ölümü verilerindeki dikkat çekici noktalardan biri, MCF-7 hücre hattında erken apoptotik ve geç apoptotik (sekonder nekrotik) hücre ölümünün eş zamanlı gerçekleşmesidir. Flow sitometrik analizlerde, MDA-MB-231 hücre hattı için 5A ve 5B muamelesi sonucu baskın olarak apoptotik hücre popülasyonu görülürken, MCF-7 hücrelerinde apoptotik ve sekonder nekrotik hücre ölümü oranlarının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. PDT'nin kanser hücrelerini apoptoz veya nekroz gibi farklı yolların aktivasyonu ile öldürebildiği bilinmektedir (125, 212, 213). Apoptotik mekanizmalarda; kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazlar hücre içindeki çok sayıda hedef proteini parçalayarak apoptozun gerçekleşmesine

katkı sağlamaktadır (214). Özellikle kaspaz 3 ve kaspaz 7'nin geniş bir substrat grubunu keserek; fosfatidilserin maruziyeti, nükleer kondenzasyon ve genomik DNA parçalanması gibi apoptozun karakteristik, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini ortaya çıkardığı bilinmektedir. MCF-7 hücreleri, *Casp-3* genindeki fonksiyonel bir delesyondan dolayı kaspaz 3'ten yoksundur (215, 216). Walsh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kaspazlar tarafından kesildiği bilinen 20 farklı substrattan 12'sinin tercihen kaspaz 3 ile kesildiği gösterilmiştir (217). Gee ve ark., bir apoptotik ajan olan pirolo-1,5-benzoksazepin kullanıldığında, kaspaz 3'ten yoksun olan MCF-7 hücrelerinde kaspaz 7'nin apoptotik yanıtı aracılık edebileceğini öne sürmüştür (218). Jelinek ve ark. yapmış oldukları bir çalışma ile sitotoksik ajan olarak kullandıkları Taksan'ın MCF-7 hücre hattında kaspaz 6 ve 7'yi etkinleştirdiğini göstermiştir (219). Brentnall ve ark. tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, ana efektör kaspaz olan kaspaz 3 varlığında apoptozun daha etkili olduğu ve kaspaz 3 yoksunluğu olan fare embriyonik fibroblastlarının, hücre içi apoptotik yolağın uyarımına karşı daha az duyarlı oldukları belirtilmiştir (220). Benzer şekilde, MCF-7 hücrelerinde 5A ve 5B muamelesi sonrası meydana gelen apoptozun, kaspaz 3 haricindeki farklı efektör kaspazlar aracılığıyla gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Apoptozun bu hücrelerde baskın olarak görülen ölüm mekanizması olamayışı, bahsedilen kaspaz 3 yoksunluğu ile bağlantılı olabilir. Apoptoz, hücre ölümüyle sonuçlanmasının yanı sıra, ölü hücrelerin ortamdan temizlenmesine de yol açar. Apoptoz geçiren hücreler, fagositik hücreler tarafından gerçekleştirilen fagositozu takiben heterolitik bozunmayla ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, apoptozun alternatif bir sonucu, apoptoz tamamlanamadığında apoptotik sürecin otolitik bir nekrotik sonuca ilerlemesidir (158, 159, 221). Bazı kemoterapötik ajanlar ve radyasyon terapisi türleri, düzenlenmiş hücre ölümünün bir formu olan sekonder nekrozu indükleyebilmektedir (222-224). PDT'de kullanılan fotosensitizerlerin fizikokimyasal yapısı ve kullanılmakta olan hücrelerin farklı karakteristikleri de ortaya çıkan hücre ölümünü etkileyebilmektedir (212, 213, 225). 5A ve 5B'nin kimyasal yapılarındaki farklılıklar, çalışmada kullanılan hücrelerin moleküler ve genetik düzeydeki farklılıkları, hücrelerin muamele süresi ya da uygulanan ışık dozu dahil olmak üzere farklı etkenlerin hücresel yanıtı etkileyebileceği düşünülmektedir.

Apoptotik kaskad ilerletilirken, mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulmasıyla membran geçirgenliğini kontrol eden porların açılması ve sitokrom c gibi apoptozu indükleyen faktörlerin salınımı sağlanmaktadır. Literatürdeki farklı çalışmalar, azalan mitokondriyal membran potansiyeli ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilerleyip

nükleer DNA'nın parçalanmasına kadar uzayan apoptotik süreçlerin gerçekleştiğini ve farklı ftalosiyanınların de mitokondri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (131, 226-230). Apoptotik mekanizmaların yanı sıra, PARP1 gibi hücrel efektörlerin rol aldığı kaspaz bağımsız hücre ölüm tiplerinde de mitokondriyal membran potansiyeli kaybı yaşandığı, değişen membran potansiyeli sayesinde mitokondriden salınan AIF gibi faktörlerin hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir (179, 231-233). Çalışmamızda kullandığımız 5A ve 5B'nin PDT eşliğinde uygulanması, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında mitokondriyal membran potansiyelini yüksek oranda (%20.7 - 29.9 aralığında) azaltmıştır. Hücre ölümü analizlerinden elde edilen veriler ile uyumlu olarak mitokondriyal membran potansiyelinin de azalması, 5A ve 5B muamelesini takiben kanser hücrelerinde gerçekleşen hücre ölümünde mitokondrinin rolü olabileceğini göstermektedir. Mitokondrilerin dahil olduğu hücre içi apoptotik yolda görevli olan ve mitokondrilerden apoptoz indükleyici faktörlerin salınmasını kontrol eden Bcl-2 protein ailesi gibi proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi, apoptoz haricindeki düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmalarında mitokondriden salınarak nükleusa transloke olduğu bilinen AIF ve Endo G gibi faktörlerin hücre içi lokalizasyonlarının incelenmesi gibi ileri çalışmalar, gerçekleşen hücre ölümünde mitokondrinin rolü üzerine daha detaylı verilere ulaşmayı sağlayacaktır.

PDT, ışık ve fotosensitizer birlikteliği sayesinde ekzojen olarak üretilen ROS'un kanser hücrelerini öldürmek için kullanıldığı bir yöntemdir (234). PDT esnasında oluşan ROS, tümör hücrelerinde DNA, RNA ve proteinler gibi biyolojik makromolekülleri okside ederek hücre ölümünü indükler (235). Çalışmamızda ROS oluşumunu mikroskopik olarak görüntülemek için, yalnızca ROS varlığında oksitlenip bir floresan ürüne dönüştürülen H₂DCFDA kullanılmış, 5A ve 5B'nin kanser hücre hatlarında PDT aracılığıyla ROS seviyelerini artırdığı görülmüştür. Tümörjenik olmayan MCF-10A hücre hattında ise zayıf floresan ışımlar tespit edilmiştir. Kanser hücrelerinde gözlenen yoğun floresan ışımlar ve tümörjenik olmayan hücrelerde gözlenen zayıf floresan ışımlar, 5A ve 5B muamelelerinin hücreler üzerinde tespit edilen sitotoksik etkileri ile örtüşmektedir. Kullanılan ftalosiyanınların özellikle kanser hücrelerinde ROS'u indüklemiş olması, bu hücrelerin ftalosiyanın muamelesinden daha çok etkilenmiş olduğunu bir kez daha göstermiştir. Mikroskopik incelemeler sonucu elde edilen veriler, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında 5A ve 5B muamelesinin fotositotoksik etkisini destekler niteliktedir ve bu açıdan literatürdeki PDT çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (130, 236, 237).

ROS gibi DNA hasarını indükleyebilecek uyarıcıların merkezi rol oynadığı PDT’de, bu uyarıcıların neden olduğu PARP aktivasyonu ya da apoptotik mekanizmaların devreye girmesiyle görülebilecek proteolitik kesilmeye bağlı PARP inaktivasyonu, hücre ölümüne dair ipuçları verme açısından önemlidir. Kaspazlar gibi proteazlar için önemli bir substrat olan PARP1, proteolitik kesilme sonucu farklı moleküler ağırlıklara sahip fragmanlar üretir. Oluşan bu PARP1 fragmanları, gerçekleşmekte olan hücre ölüm mekanizmaları için önemli birer biyobelirteçtir. PARP1’in, çoğunlukla kaspaz 3 ve kaspaz 7’nin hedefi olarak kesilmesi sonucu oluşan 89-kDa ve 24-kDa moleküler ağırlıktaki fragmanlar, apoptozun birer işareti olarak kabul edilmektedir (238). 89-kDa moleküler ağırlıktaki PARP1 fragmanı ile etkileşen antikörlerin kullanıldığı bu çalışma sonucu, 5A ve 5B muamele edilerek PDT uygulanan hücre gruplarından MCF-10A hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kesilmiş PARP1 aktivitesi görülmezken, meme kanseri hücre hatlarında anlamlı düzeyde artan kesilmiş PARP1 seviyeleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, MDA-MB-231 hücre hattının kesilmiş PARP1 seviyesindeki artışın (%14.7 - 16.4), MCF-7 hücre hattına kıyasla (%2.6 - 4.0) daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Bu artışların tümü istatistiksel olarak anlamlı olsa da MCF-7 hücre hattında görülen artışın MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla düşük düzeyde kalması dikkat çekici bir veri olarak değerlendirilmektedir. PARP1, kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi proteazlar tarafından kesildiği için, kaspaz 3 eksprese etmeyen MCF-7 hücrelerinde kesilmiş PARP1 seviyelerinin daha düşük düzeyde kalması kısmen öngörülebilir bir sonuçtur. Bununla birlikte, Annexin V/7AAD analizleri sonucu MCF-7 hücrelerinde görülen yüksek orandaki sekonder nekrozun da PARP1 aktivitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Hücre içi ROS miktarının artması ile aktifleşen PARP1, kaspazlar gibi proteazlar tarafından kesilip inaktif hale geçmedikçe düzenlenmiş bir nekrotik hücre ölümüne aracılık etmektedir. PDT sonucu oluşan yüksek düzeydeki ROS’un, DNA hasarına neden olarak PARP’ları aktifleştirdiği ve hücreleri düzenlenmiş nekroza yönlendirebildiği daha önce gösterilmiştir (180). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde düşük miktarda PARP1’in kesilerek inaktif hale geçmiş olması ve hücre ölüm profilinde görülen nekrotik kayma, bu hücrelerde 5A ve 5B muamelesi sonrası gerçekleşen hücre ölümünde aktif PARP1’lerin anahtar rol oynayabileceğini göstermektedir. Literatürde sunulan verilere göre, PARP aracılı nekrozun meydana gelmesindeki etkenlerden bir diğeri ise hücrelerdeki p53 ekspresyonudur. Wild tip p53’ün, ROS indüklü DNA hasarına yanıt olarak meydana gelen PARP aracılı nekrozda rol oynadığı ve PARP aktivasyonunu transkripsiyonel, post-translasyonel veya doğrudan etkileşimle düzenlediği düşünülmektedir (239-241). MCF-7

hücrelerinin wild tip, MDA-MB-231 hücrelerinin ise mutant p53'e sahip olduğu bilinmektedir (242, 243). Bu durumda MCF-7 hücrelerindeki wild tip p53, PDT sonucu oluşan PARP1 aktivasyonu ile ilişkili olabilir. Apoptotik hücre ölümünün yoğun olarak gerçekleştiği ve mutant p53'e sahip MDA-MB-231 hücre hattında ise kesilerek inaktive edilmiş PARP1 düzeyinin daha yüksek olması, hem Annexin V/7AAD verilerimizle hem de literatür ile uyumludur (244, 245). Bununla birlikte, farklı kaspazların ve p53'ün, 5A ve 5B indüklü PDT aktivitesindeki olası rollerini aydınlatmaya yönelik yapılacak farklı çalışmalar detaylı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

PDT ile uygulandığında hücre içi ROS oluşumuna ve hücre ölümüne neden olduğu önceki veriler ile gösterilen 5A ve 5B'nin, hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerine etkisi incelenerek kültürdeki uzun süreli proliferasyon durumları analiz edilmiştir. Hücrelerin ftalosiyanınlar ile muamelesi ve PDT'ye maruz bırakılmaları koloni oluşturma kapasitelerini de etkilemektedir. Özellikle kanser hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesinin kaybı ile görülen antiproliferatif etki, hücrelerin tümör oluşturma yeteneklerini kısıtlamaktadır (246, 247). 5A ve 5B muamelesinin ardından PDT'ye maruz bırakılan MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve MCF-10A normal meme hücreleri, koloni oluşturma kapasitelerini koruma konusunda farklılıklar göstermiştir. PDT uygulanmayan ve yalnızca 5A ya da 5B ile muamele edilmiş tüm hücre gruplarında, koloni oluşumu kısmen azalsa da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir değişim olmamıştır. Hücre canlılığı deneylerinde üst seviyelerde canlılık profili sergileyen MCF-10A hücrelerinin büyük çoğunluğu, koloni oluşturma potansiyelini korumuştur. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ise, PDT uygulamasını takiben koloni oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmalar söz konusu olmuştur. Deneysel radyasyon biyolojisi çalışmaları ile literatüre ilk kez giren koloni oluşturma analizleri, PDT'de farklı fotosensitizerler kullanılarak çalışılmış ve PDT'nin uzun dönem etkisi için son derece önemli olduğunun altı çizilmiştir (248-251). 5A ve 5B muamelesinin, uzun süreli kültürdeki hücre proliferasyon yeteneklerini sınırlandırılması, *in vitro* PDT etkinliğini bu açıdan desteklemiştir.

Hücrelerin hareket yetenekleri sayesinde göç edebilmesi, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi gibi farklı fizyolojik süreçler için gerekli olsa da metastaz ve tümör invazyonu gibi patolojik durumlarda da karşımıza çıkmaktadır (252-254). Farklı sitotoksik ajanların veya fotosensitizerlerin kullanıldığı çalışmalar ile metastatik potansiyele sahip hücrelerin hareket yetenekleri incelenmekte ve ilaç adaylarının hücre hareketine etkisi belirlenmektedir

(102, 103, 255-257). Çalışmamızda, 5A ve 5B'nin PDT ile uygulanmasının hücre hareketinde neden olacağı değişimi analiz etmek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. 48 saat sonunda, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının karanlık kontrol gruplarındaki yara bölgeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kapanırken, aynı hücrelerin PDT gruplarındaki yara bölgelerinde anlamlı bir kapanma olmamıştır. Hücre hareketi açısından agresif olduğu rapor edilen MDA-MB-231 hücrelerinin yara bölgesindeki kapanma, MCF-7 hücrelerine kıyasla daha hızlı olmuştur. Buna rağmen, MDA-MB-231 hücrelerinin PDT grupları ve karanlık kontrol grupları kıyaslandığında, PDT uygulamasının hücre hareket kabiliyetine etki ettiği görülmüştür. Bu nedenle, PDT indüklü 5A ve 5B muamelesinin her iki hücre hattında da hareketi kısıtladığı göze çarpmaktadır. MCF-10A hücrelerinin PDT grubunda hücre hareketi kısmen etkilense de, 48. saatte 5A ve 5B muameleli kültürlerdeki yara bölgesinde oluşan kapanma istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Aynı hücrelerin karanlık kontrol grupları, yara bölgesini hızlı bir şekilde kapatmıştır. 5A ve 5B kullanılarak gerçekleştirilen PDT uygulamalarının, meme kanseri hücrelerinde proliferasyon ve koloni oluşumunun yanı sıra hücre hareketini de etkilediği görülmüştür. Bu alandaki son çalışmalara bakıldığında, test edilen fotosensitizerlerin hücre hareketi üzerine etkilerinin, sitotoksik düzeydeki etkileri kadar önemli olduğu düşünülmektedir (258-261). Bu açıdan, 5A ve 5B'nin meme kanseri hücrelerinin hareket kabiliyetinde neden olduğu etki açıktır. Gerçekleşen bu etkinin detaylı araştırılmasıyla, özellikle aktin hücre iskeleti üzerindeki etkilerin incelenmesiyle daha ileri verilerin elde edilmesi mümkün olacaktır.

PDT'nin antitümöral etkinliklerinin önemli bir kısmını, migrasyon ve invazyonu kısıtlayıcı etkiler oluşturmaktadır. Çalışılan hücre türleri, fotosensitizerler ve ışıklandırma koşullarına bağlı olarak, migrasyon ve invazyonun önemli ölçüde azaldığını ve bu etkilerin, farklı moleküler yollar üzerinden gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (102, 249, 260, 262-265). ROS oluşumunu sağladığı, hücre ölümünü indüklediği ve hücre hareketini kısıtladığı gösterilen 5A ve 5B'nin, hücrelerdeki migrasyon ve invazyona karşı oluşturabileceği etkinin anlaşılması için transwell sistemler kullanılmıştır. MCF-10A hücrelerinde, muameleler sonucu transwell sistemlerden geçebilen hücre sayısındaki değişim düşük düzeylerde (%9 – 12 aralığında) kalmış, yalnızca PDT uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar (%16 – 18 aralığında) elde edilmiştir. Zayıf metastatik potansiyele sahip MCF-7 hücreleri ve invazyona yatkınlığı ile bilinen MDA-MB-231 hücrelerinde ise PDT uygulamasının hücrelerdeki migratif ve invaziv karaktere yüksek

seviyelerde etki ettiği gözlenmiştir (MCF-7; migrasyon için %30, invazyon için %56 – MDA-MB-231; migrasyon için %55, invazyon için %58). Kontrol gruplarındaki ve PDT gruplarındaki total hücre kümeleri ele alındığında, MDA-MB-231 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine kıyasla transwell sistemde daha fazla hareket edebildiği ve membranın alt kısmına daha fazla sayıda hücre geçtiği görölmüştür. Özellikle matrijelin kullanılmış olduğu invazyon deneylerinde, MCF-7 hücrelerinin transwell sistem içerisindeki yayılımı kısıtlanmış ve migrasyon deneylerine kıyasla membranın alt kısmına ulaşabilen hücre sayısının azaldığı görölmüştür. MCF-7 hücrelerinin zayıf migrasyon potansiyeli nedeniyle transwell membran boyunca hareket edebilen total hücre kümeleri az sayıda olsa da, PDT'nin hücrelerdeki migrasyon ve invazyonu önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir. Buna rağmen, MDA-MB-231 hücrelerinin PDT gruplarında muamelelere verilen tepkinin daha yüksek seviyelerde olduğu ve bu hücrelerin transwell sistem boyunca migratif ve invaziv hareketinin daha yüksek düzeyde kısıtlandığı saptanmıştır. Migrasyon ve invazyon, pek çok faktörü içinde barındıran kompleks birer süreçtir. Hücrelerin genetik düzeydeki farklılıkları, eksprese edilen genler ve oluşan proteinlerin işlevselliği, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitesine etki edebilmektedir. Literatürdeki farklı çalışmalar, anjiyogenezdeki en önemli rollerden birine sahip olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF), MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde farklı düzeylerde eksprese edildiğini ve bu durumun hücrelerdeki metastatik kapasiteyi etkilediğini göstermiştir (266, 267). Buna göre, zayıf metastatik özellikteki MCF-7 hücreleri, yüksek invazyon ve migrasyon kapasitesine sahip MDA-MB-231 hücrelerine göre daha düşük seviyelerde VEGF eksprese eder (266). Bu durum, hücrelerin metastatik karakterini etkileyen unsurlardan biridir. Deneysel metotlar ile VEGF ekspresyonu artırılan MCF-7 hücrelerinde, invazyon kapasitesinin yüksek oranda arttığı rapor edilmiştir (268). Bunun yanı sıra, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde eksprese edilen iyon kanallarının migrasyonda rolü olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Roger ve ark., invaziv kapasitesi yüksek olan MDA-MB-231 hücrelerinde hızlı bir iye yönelik sodyum akışı bulunduğunu, zayıf metastatik MCF-7 hücrelerinde ise bu akışın olmadığını bildirmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Tetrodotoksin kullanılarak bloke edilen sodyum akışı sonrasında hücrelerin invaziv karakterinin azaldığı görölmüştür (269). Gillet ve ark. tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, MDA-MB-231 hücrelerinde sodyum kanal aktivatörü Veratridin'in kullanılması ile hücrelerin invazyon kapasitesinde artış tespit edilmiştir (270). Bu alanda yapılan son araştırmalar, normal meme hücrelerine kıyasla

sodyum kanallarını yüksek düzeyde eksprese eden metastatik meme kanseri hücrelerinde, bu kanalların inhibisyonu ile invazyonun ve metastazın önemli ölçüde azaldığını doğrulamıştır (271, 272). Bu tür genetik farklılıklar nedeniyle farklı adezyon profiline sahip hücrelerde ilaçlara karşı ortaya çıkan moleküler düzeydeki cevabın da değişiklik gösterebileceği farklı çalışmalar ile rapor edilmiştir (273-277). MCF-7 hücrelerinin migratif potansiyelinin 5A ve 5B muamelesi karşısında düşük seviyede değişkenlik göstermesi, güçlü metastatik ve invaziv karakterdeki MDA-MB-231 hücrelerinin ise bu durumdan daha çok etkilenmesi hücrelerin genetik farklılıkları ve farklı adezyon profilleri ile ilişkilendirilebilir. 5A ve 5B'nin PDT ile uygulanmasının, büyüme faktörleri ve iyon kanalları da dahil olmak üzere hücredeki farklı moleküler bileşenleri etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, migrasyon ve invazyon sürecinde rol alabileceği düşünülen hücre adezyon molekülleri, hücre göçünden sorumlu farklı proteinler, büyüme faktörleri ve iyon kanalı alt birimleri gibi çeşitli biyobelirteçlerin knock out veya knock in gibi düzenlemeler ile ekspresyon davranışlarının değiştirilmesi ya da bu belirteçlere spesifik inhibitör veya aktivatör kullanılması, 5A ve 5B muamelesinin migrasyon ve invazyona olan etkisinin ileri düzeyde anlaşılmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, ekibimizce ilk kez sentezlenen aminofenoltiyoetanol çevreli siliyum ftalosiyanın MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve tümörjenik olmayan MCF-10A hücre hattı üzerindeki PDT etkinliği ilk kez çalışılmıştır. 5A ve 5B'nin meme kanseri hücrelerinde neden olduğu antiproliferatif ve antitümöral etkilerin tümörjenik olmayan hücrelerde düşük seviyelerde kaldığı belirlenmiş, kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde ROS oluştuğu ve hücre ölümünün indüklendiği, hücrelerin uzun süreli kültürlerinde koloni oluşturma kapasitesinin son derece azaldığı, yara iyileşmesi modellerinde hücre hareketinin kısıtlandığı ve hücrelerin hem migratif hem de invaziv potansiyellerinde azalma eğilimleri olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen tüm veriler, PDT odaklı anti kanser tedavi çalışmalarında fotosensitizer olarak kullanılabileceğini önerdiğimiz 5A ve 5B'nin bu özelliklerini tanımlamaya yönelik aydınlatıcı olmakla birlikte, bu moleküllerin aday ilaç çalışmalarında kullanılmak üzere potansiyel taşıdığını göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Milosevic M, Jankovic D, Milenkovic A, Stojanov D (2018). Early diagnosis and detection of breast cancer. *Technol Health Care* 26(4): 729-759.
2. Agrawal S (2014). Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors. *South Asian J Cancer* 3(2): 112-115.
3. Zhang Q, Li L (2018). Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J BUON* 23(3): 561-567.
4. Baron ED, Malbasa CL, Santo-Domingo D, Fu P, Miller JD, Hanneman KK, Hsia AH, Oleinick NL, Colussi VC, Cooper KD (2010). Silicon phthalocyanine (Pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg Med* 42(10): 728-735.
5. Zhu W, Nelson CM (2013). Adipose and mammary epithelial tissue engineering. *Biomatter* 3(3): e24630.
6. Paruch M (2019). Mathematical modeling of breast tumor destruction using fast heating during radiofrequency ablation. *Materials (Basel)* 13(1): 136.
7. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res* 50(1): 33.
8. 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.
9. Mohamed MM, Al-Raawi D, Sabet SF, El-Shinawi M (2014). Inflammatory breast cancer: new factors contribute to disease etiology: a review. *J Adv Res* 5(5): 525-536.
10. Cavalieri EL, Rogan EG (2012). The etiology and prevention of breast cancer. *Drug Discov Today Dis Mech* 9(1-2): e55-e69.
11. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 165(1): 193-200.
12. McTiernan A (2003). Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* 8(4): 326-334.
13. Vogelstein B, Kinzler KW (1994). Has the breast cancer gene been found? *Cell* 79(1): 1-3.
14. Cleary MP, Grossmann ME (2009). Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 150(6): 2537-2542.

15. 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.
16. dos Santos AF, de Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat* 5: 25.
17. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Al B (2011). Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 18(16): 2486-2515.
18. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 3(8): 721-729.
19. Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, Goldfarb A (1979). Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 62(2): 231-237.
20. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38(8): 2628-2635.
21. Dougherty TJ (1974). Activated dyes as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* 52(4): 1333-1336.
22. Lipson RL, Baldes EJ (1960). The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 82: 508-516.
23. Zhang J, Jiang C, Figueiro Longo JP, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B* 8(2): 137-146.
24. Stylli SS, Kaye AH, MacGregor L, Howes M, Rajendra P (2005). Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. *J Clin Neurosci* 12(4): 389-398.
25. Lovell JF, Liu TW, Chen J, Zheng G (2010). Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem Rev* 110(5): 2839-2857.
26. Friedberg JS (2009). Photodynamic therapy as an innovative treatment for malignant pleural mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 21(2): 177-187.
27. Cerman E, Cekic O (2015). Clinical use of photodynamic therapy in ocular tumors. *Surv Ophthalmol* 60(6): 557-574.
28. Benov L (2015). Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract* 24 Suppl 1: 14-28.

29. Shi H, Sadler PJ (2020). How promising is phototherapy for cancer? *Br J Cancer* 123(6): 871-873.
30. Baskaran R, Lee J, Yang SG (2018). Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res* 22: 25.
31. Mori M, Campolmi P, Mavilia L, Rossi R, Cappugi P, Pimpinelli N (2006). Topical photodynamic therapy for primary cutaneous B-cell lymphoma: a pilot study. *J Am Acad Dermatol* 54(3): 524-526.
32. Ge X, Liu J, Shi Z, Jing L, Yu N, Zhang X, Jiao Y, Wang Y, Li PA (2016). Inhibition of MAPK signaling pathways enhances cell death induced by 5-Aminolevulinic acid-photodynamic therapy in skin squamous carcinoma cells. *Eur J Dermatol* 26(2): 164-172.
33. Zaar O, Fougelberg J, Hermansson A, Gillstedt M, Wennberg-Larko AM, Paoli J (2017). Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: a retrospective observational study in 423 lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31(8): 1289-1294.
34. Truchuelo M, Fernandez-Guarino M, Fleta B, Alcantara J, Jaen P (2012). Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: an observational and descriptive study in 51 lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26(7): 868-874.
35. Gupta AK, Paquet M (2013). Network meta-analysis of the outcome 'participant complete clearance' in nonimmunosuppressed participants of eight interventions for actinic keratosis: a follow-up on a cochrane review. *Br J Dermatol* 169(2): 250-259.
36. Gupta AK, Paquet M, Villanueva E, Brintnell W (2012). Interventions for actinic keratoses. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD004415.
37. Cosgarea R, Susan M, Crisan M, Senila S (2013). Photodynamic therapy using topical 5-aminolaevulinic acid vs. surgery for basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27(8): 980-984.
38. Christensen E, Mork C, Skogvoll E (2012). High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *Br J Dermatol* 166(6): 1342-1348.
39. Thissen MR, Schroeter CA, Neumann HA (2000). Photodynamic therapy with delta-aminolaevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. *Br J Dermatol* 142(2): 338-339.

40. Farhadi M, Kamrava SK, Behzadi AH, Rafiezadeh P, Asghari A, Rezvan F, Maleki S (2010). The efficacy of photodynamic therapy in treatment of recurrent squamous cell and basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol* 9(2): 122-126.
41. Ratour-Bigot C, Chemidling M, Montlahuc C, Abirached G, Madjlessi N, Bullier C, Battistella M, Bagot M, Lebbe C, Basset-Seguin N (2016). Squamous cell carcinoma following photodynamic therapy for cutaneous Bowen's disease in a series of 105 patients. *Acta Derm Venereol* 96(5): 658-663.
42. Lihey N, Linkov K, Yakovlev D, Volkov V, Loschenov V (2018). Fiber optic devices for endobiliary photodynamic therapy. *KnE Engineering* 3: 196.
43. Bartusik D, Aebisher D, Ghogare A, Ghosh G, Abramova I, Hasan T, Greer A (2013). A fiberoptic (photodynamic therapy type) device with a photosensitizer and singlet oxygen delivery probe tip for ovarian cancer cell killing. *Photochem Photobiol* 89(4): 936-941.
44. Moreira L, Maftoum Costa M, Pacheco Soares C (2008). Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Aust J Chem* 61(10).
45. 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.
46. Juarranz A, Jaen P, Sanz-Rodriguez F, Cuevas J, Gonzalez S (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10(3): 148-154.
47. Crescenzi E, Varriale L, Iovino M, Chiaviello A, Veneziani BM, Palumbo G (2004). Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3(5): 537-544.
48. Crescenzi E, Chiaviello A, Canti G, Reddi E, Veneziani BM, Palumbo G (2006). Low doses of cisplatin or gemcitabine plus photofrin/photodynamic therapy: disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Mol Cancer Ther* 5(3): 776-785.
49. Rak J, Pouckova P, Benes J, Vetvicka D (2019). Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy. *Anticancer Res* 39(7): 3323-3339.
50. 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.

51. Wilson BC, Olivo M, Singh G (1997). Subcellular localization of photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 65(1): 166-176.
52. Malatesti N, Munitic I, Jurak I (2017). Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys Rev* 9(2): 149-168.
53. 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.
54. Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR (2005). Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J Phys Chem B* 109(18): 8570-8573.
55. Allison RR, Moghissi K (2013). Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc* 46(1): 24-29.
56. Moan J (1990). On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B* 6(3): 343-344.
57. Klotz LO, Kroncke KD, Sies H (2003). Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2(2): 88-94.
58. Chilakamarthi U, Giribabu L (2017). Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec* 17(8): 775-802.
59. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 96(1): 1-8.
60. 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.
61. 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.
62. Kou J, Dou D, Yang L (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* 8(46): 81591-81603.
63. Mehraban N, Freeman HS (2015). Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. *Materials (Basel)* 8(7): 4421-4456.

64. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK (2011). The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 40(1): 340-362.
65. Wiehe A, Simonenko EJ, Senge MO, Röder B (2001). Hydrophilicity vs hydrophobicity—varying the amphiphilic structure of porphyrins related to the photosensitizer m-THPC. *J Porphyr Phthalocyanines* 5(10): 758-761.
66. MacDonald IJ, Morgan J, Bellnier DA, Paszkiewicz GM, Whitaker JE, Litchfield DJ, Dougherty TJ (1999). Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *Photochem Photobiol* 70(5): 789-797.
67. Boyle RW, Dolphin D (1996). Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 64(3): 469-485.
68. 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.
69. Lo PC, Rodriguez-Morgade MS, Pandey RK, Ng DKP, Torres T, Dumoulin F (2020). The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer. *Chem Soc Rev* 49(4): 1041-1056.
70. Ogura S, Tabata K, Fukushima K, Kamachi T, Okura I (2006). Development of phthalocyanines for photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines* 10(09): 1116-1124.
71. Dube E (2018). Gold–chitosan composite with low symmetry zinc phthalocyanine for enhanced singlet oxygen generation and improved photodynamic therapy activity. *New J Chem* 42: 10214-10225.
72. Oluwole DO, Manoto SL, Malabi R, Maphanga C, Ombinda-Lemboumba S, Mthunzi-Kufa P, Nyokong T (2018). Evaluation of the photophysicochemical properties and photodynamic therapy activity of nanoconjugates of zinc phthalocyanine linked to glutathione capped Au and Au3Ag1 nanoparticles. *Dyes Pigm* 150: 139-150.
73. Neagu M, Constantin C, Tampa M, Matei C, Lupu A, Manole E, Ion RM, Fenga C, Tsatsakis AM (2016). Toxicological and efficacy assessment of post-transition metal (indium) phthalocyanine for photodynamic therapy in neuroblastoma. *Oncotarget* 7(43): 69718-69732.
74. Nyokong T, Gledhill I (2013). The use of phthalocyanines in cancer therapy. *AIP Conference Proceedings* 1517: 49-52.

75. 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.
76. Karaca Ö (2018). Yeni Schiff bazı bileşiklerinin sentezi ve yapılarının aydınlatılması. *Politeknik Dergisi* 21(1): 245-249.
77. Anis I, Aslam M, Afza N, Iqbal L, Noreen Z, Hussain A, Safder M (2015). ChemInform abstract: a review (part c) - an overview of biological activities of Schiff base transition metal complexes. *ChemInform* 46(12).
78. Yin DD, Jiang Y-L, Shan L (2001). Synthesis, characterization of diorganotin (IV) schiff base complexes and their in vitro antitumor activity. *Chin J Chem* 19(11): 1136-1140.
79. Sinha D, Tiwari A, Singh S, Shukla Mishra G, Mishra P, Chandra H, Mishra A (2008). Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *Eur J Med Chem* 43: 160-165.
80. Tadele KT, Tsega TW (2019). Schiff bases and their metal complexes as potential anticancer candidates: a review of recent works. *Anticancer Agents Med Chem* 19(15): 1786-1795.
81. Hu G, Wang G, Duan N, Wen X, Cao T, Xie S, Huang W (2012). Design, synthesis and antitumor activities of fluoroquinolone C-3 heterocycles (IV): s-triazole Schiff–Mannich bases derived from ofloxacin. *Acta Pharm. Sin. B* 2(3): 312-317.
82. Sunil D, Isloor AM, Shetty P, Nayak PG, Pai KSR (2013). In vivo anticancer and histopathology studies of Schiff bases on Ehrlich ascitic carcinoma cells: 1st cancer update. *Arab J Chem* 6(1): 25-33.
83. Creaven BS, Duff B, Egan DA, Kavanagh K, Rosair G, Thangella VR, Walsh M (2010). Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinolin-2(1H)-one-derived Schiff bases. *Inorganica Chim Acta* 363(14): 4048-4058.
84. Lee SM, Mohd. Ali H, Sim KS, Abdul Malek SN, Lo KM (2013). Synthesis, characterization and biological activity of diorganotin complexes with ONO terdentate Schiff base. *Inorganica Chim Acta* 406: 272-278.
85. El Sayed Aly MR, Abd El Razek Fodah HH, Saleh SY (2014). Antiobesity, antioxidant and cytotoxicity activities of newly synthesized chalcone derivatives and their metal complexes. *Eur J Med Chem* 76: 517-530.

86. Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C (2013). Evaluation of DNA-binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxic activity of mononuclear ruthenium(II) carbonyl complexes of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 115: 287-296.
87. Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxicity studies on ruthenium(II) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 105: 582-592.
88. Qin DD, Yang ZY, Zhang FH, Du B, Wang P, Li TR (2010). Evaluation of the antioxidant, DNA interaction and tumor cell cytotoxicity activities of copper(II) complexes with Paeonol Schiff-base. *Inorg Chem Commun* 13(6): 727-729.
89. Jia Y, Li J (2015). Molecular assembly of Schiff base interactions: construction and application. *Chem Rev* 115(3): 1597-1621.
90. Sen P, Yildirim E, Yildiz SZ (2016). New alkaline media-soluble functional zinc(II) phthalocyanines bearing poly (hydroxylmethyl) iminomethane Schiff base complexes in catalytic bleaching. *Synth Met* 215: 41-49.
91. Karaoğlu GK, Gümrükçü G, Gördük S, Can N, Gül A (2017). Novel homoleptic, dimeric zinc(II) phthalocyanines as gate dielectric for OFET device. *Synth Met* 230: 7-11.
92. Sen P, Yildiz SZ, Atmaca GY, Erdoğan A (2018). Synthesis, photophysics, and photochemistry of peripherally Schiff base-zinc complex substituted zinc phthalocyanine. *J Coord Chem* 71(8): 1258-1267.
93. Gümrükçü G, Karaoğlu GK, Erdoğan A, Gül A, Avcıata U (2012). A novel phthalocyanine conjugated with four salicylideneimino complexes: photophysics and fluorescence quenching studies. *Dyes Pigm* 95(2): 280-289.
94. 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.
95. Jiang XJ, Lo PC, Tsang YM, Yeung SL, Fong WP, Ng DK (2010). Phthalocyanine-polyamine conjugates as pH-controlled photosensitizers for photodynamic therapy. *Chem Eur J* 16(16): 4777-4783.

96. Lin RK, Chiu CI, Hsu CH, Lai YJ, Venkatesan P, Huang PH, Lai PS, Lin CC (2018). Photocytotoxic copper(II) complexes with Schiff-base scaffolds for photodynamic therapy. *Chem Eur J* 24(16): 4111-4120.
97. Uyar Z, Erdener D, Koyuncu I, Arslan Ü (2017). Synthesis, characterization, and cytotoxic activities of a Schiff base ligand and its binuclear copper(II) and manganese(III) complexes. *JOTCSA* 4: 963-980.
98. Issa MC, Manela-Azulay M (2010). Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol* 85(4): 501-511.
99. Sorbellini E, Rucco M, Rinaldi F (2018). Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. *Lasers Med Sci* 33(7): 1431-1439.
100. Mallidi S, Anbil S, Bulin AL, Obaid G, Ichikawa M, Hasan T (2016). Beyond the barriers of light penetration: strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics* 6(13): 2458-2487.
101. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ (2000). Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res* 33(8): 869-880.
102. Yang TH, Chen CT, Wang CP, Lou PJ (2007). Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol* 43(4): 358-365.
103. Wang CP, Lou PJ, Lo FY, Shieh MJ (2014). Meta-tetrahydroxyphenyl chlorine mediated photodynamic therapy inhibits the migration and invasion of a nasopharyngeal carcinoma KJ-1 cell line. *J Formos Med Assoc* 113(3): 173-178.
104. 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.
105. Amo T, Kawanishi N, Uchida M, Fujita H, Oyanagi E, Utsumi T, Ogino T, Inoue K, Shuin T, Utsumi K, Sasaki J (2009). Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochem Funct* 27(8): 503-515.
106. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2007). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett* 415(3): 242-247.

107. Chen X, Zhao P, Chen F, Li L, Luo R (2011). Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. *Lasers Med Sci* 26(1): 69-78.
108. He GF, Bian ML, Zhao YW, Xiang Q, Li HY, Xiao C (2009). A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. *Oncol Rep* 21(4): 861-868.
109. Shen XY, Zacal N, Singh G, Rainbow AJ (2005). Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 81(2): 306-313.
110. Renno RZ, Delori FC, Holzer RA, Gragoudas ES, Miller JW (2000). Photodynamic therapy using Lu-Tex induces apoptosis in vitro, and its effect is potentiated by angiostatin in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(12): 3963-3971.
111. Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Termeer CC, Simon JC (2001). Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett* 493(1): 26-30.
112. Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M (2002). Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 9(3): 257-270.
113. Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H (2000). Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* 115(6): 1041-1046.
114. Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL (1999). Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 255(3): 673-679.
115. Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, Vandenabeele P, Denecker G, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte PA, Agostinis P (2001). Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol* 74(2): 133-142.
116. Savill J, Fadok V (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805): 784-788.
117. Cotter TG (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9(7): 501-507.

118. Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J (2016). Cancer's Achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *Int J Mol Sci* 18(1): 23.
119. Rathmell JC, Thompson CB (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 17: 781-828.
120. Gougeon ML, Kroemer G (2003). Charming to death: caspase-dependent or independent? *Cell Death Differ* 10(3): 390-392.
121. Segawa K, Nagata S (2015). An apoptotic 'eat me' signal: phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Biol* 25(11): 639-650.
122. Shi Y (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9(3): 459-470.
123. Tait SW, Green DR (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27(50): 6452-6461.
124. Chipuk JE, Green DR (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3): 268-275.
125. 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.
126. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1704(2): 59-86.
127. Lorenzo HK, Susin SA (2007). Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat* 10(6): 235-255.
128. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192(2): 131-137.
129. 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.
130. Chung PS, He P, Shin JI, Hwang HJ, Lee SJ, Ahn JC (2009). Photodynamic therapy with 9-hydroxypheophorbide alpha on AMC-HN-3 human head and neck cancer cells: induction of apoptosis via photoactivation of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Cancer Biol Ther* 8(14): 1343-1351.
131. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers (Basel)* 3(2): 2516-2539.

132. Lange C, Lehmann C, Mahler M, Bednarski PJ (2019). Comparison of cellular death pathways after mTHPC-mediated photodynamic therapy (PDT) in five human cancer cell lines. *Cancers (Basel)* 11(5): 702.
133. Yun CW, Lee SH (2018). The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci* 19(11): 3466.
134. Mfouo-Tynga I, Abrahamse H (2015). Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy. *Int J Mol Sci* 16(5): 10228-10241.
135. Jain K, Paranandi KS, Sridharan S, Basu A (2013). Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *Am J Cancer Res* 3(3): 251-265.
136. Yoo JO, Ha KS (2012). New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. *Int Rev Cell Mol Biol* 295: 139-174.
137. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE (2009). Cell death. *N Engl J Med* 361(16): 1570-1583.
138. Parzych KR, Klionsky DJ (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20(3): 460-473.
139. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8(9): 528-539.
140. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1(2): 66-74.
141. Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J* 29(3): 515-516.
142. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2009). Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One* 4(7): e6251.
143. Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM (2008). Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat* 112(3): 389-403.
144. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A (2008). Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* 68(5): 1485-1494.
145. Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, Calvo TG, Larribere L, Megias D, Mulero F, Piris MA, Dash R, Barral PM, Rodriguez-Peralto JL, Ortiz-Romero P, Tuting T, Fisher PB, Soengas MS (2009). Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 16(2): 103-114.

146. Kessel D, Arroyo AS (2007). Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochem Photobiol Sci* 6(12): 1290-1295.
147. Baehrecke EH (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 505-510.
148. Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17(9): 422-427.
149. Reiners JJ, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* 6(1): 7-18.
150. Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ, Jr. (2006). Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 38(5): 482-488.
151. Kessel D (2021). Death pathways associated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 94(2): 213-218
152. Martins WK, Belotto R, Silva MN, Grasso D, Suriani MD, Lavor TS, Itri R, Baptista MS, Tsubone TM (2020). Autophagy regulation and photodynamic therapy: insights to improve outcomes of cancer treatment. *Front Oncol* 10: 610472.
153. Xue LY, Chiu SM, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL (2007). The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochem Photobiol* 83(5): 1016-1023.
154. Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P (2006). Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2(3): 238-240.
155. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, Agostinis P (2006). Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* 20(6): 756-758.
156. Kim EH, Wong SW, Martinez J (2019). Programmed necrosis and disease: we interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death Differ* 26(1): 25-40.
157. Stepanek O, Brdicka T, Angelisova P, Horvath O, Spicka J, Stockbauer P, Man P, Horejsi V (2011). Interaction of late apoptotic and necrotic cells with vitronectin. *PLoS One* 6(5): e19243.

158. Silva MT, do Vale A, dos Santos NM (2008). Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13(4): 463-482.
159. Silva MT (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 584(22): 4491-4499.
160. Kessel D, Poretz RD (2000). Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME). *Photochem Photobiol* 71(1): 94-96.
161. Lavie G, Kaplinsky C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, Mandel M (1999). A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. *Br J Cancer* 79(3-4): 423-432.
162. Dabrowski J (2017). Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. Eldik RV, Hubbard CD (Eds.), *Advances in Inorganic Chemistry*. Elsevier, Sayfa: 343-394.
163. Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
164. Coupieenne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J (2011). 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci* 10(12): 1868-1878.
165. Galluzzi L, Kroemer G (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* 135(7): 1161-1163.
166. Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32(1): 37-43.
167. Skidmore CJ, Davies MI, Goodwin PM, Halldorsson H, Lewis PJ, Shall S, Zia'ee AA (1979). The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the degradation of NAD caused by gamma-radiation and N-methyl-N-nitrosourea. *Eur J Biochem* 101(1): 135-142.
168. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342(Pt 2): 249-268.
169. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26(8): 882-893.

170. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 24(1): 15-28.
171. Juarez-Salinas H, Sims JL, Jacobson MK (1979). Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature* 282(5740): 740-741.
172. Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 24(22): 4387-4394.
173. Flohr C, Burkle A, Radicella JP, Epe B (2003). Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res* 31(18): 5332-5337.
174. Tok F, Kaymakçioğlu B (2015). Kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım: poli (ADP-riboz) polimeraz-1 inhibitörleri. *Clin Exp Health Sci* 5: 41-52.
175. Lemaire C, Andreau K, Souvannavong V, Adam A (1998). Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett* 425(2): 266-270.
176. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57(10): 1835-1840.
177. Ha HC, Snyder SH (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *PNAS* 96(24): 13978-13982.
178. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol* 171(8): 2000-2016.
179. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA (2007). AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 6(21): 2612-2619.
180. Soriano J, Mora-Espi I, Alea-Reyes ME, Perez-Garcia L, Barrios L, Ibanez E, Nogues C (2017). Cell death mechanisms in tumoral and non-tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: apoptosis, necrosis and parthanatos. *Sci Rep* 7: 1-12.
181. Kim BM (2017). The implications of several forms of programmed necrosis for cancer therapy. *J Cancer Sci Ther* 9: 630-635.
182. Herceg Z, Wang ZQ (1999). Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19(7): 5124-5133.

183. Duriez PJ, Shah GM (1997). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 75(4): 337-349.
184. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53(17): 3976-3985.
185. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711(1-2): 193-201.
186. Bjelland S, Seeberg E (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531(1-2): 37-80.
187. El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31(19): 5526-5533.
188. Luo X, Kraus WL (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* 26(5): 417-432.
189. Curtin NJ (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12(12): 801-817.
190. Hou D, Liu Z, Xu X, Liu Q, Zhang X, Kong B, Wei JJ, Gong Y, Shao C (2018). Increased oxidative stress mediates the antitumor effect of PARP inhibition in ovarian cancer. *Redox Biol* 17: 99-111.
191. Kastle M, Grimm S, Nagel R, Breusing N, Grune T (2011). Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 50(2): 305-312.
192. Toshimitsu H, Yoshimoto Y, Augustine CK, Padussis JC, Yoo JS, Angelica Selim M, Pruitt SK, Friedman HS, Ali-Osman F, Tyler DS (2010). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances the effect of chemotherapy in an animal model of regional therapy for the treatment of advanced extremity malignant melanoma. *Ann Surg Oncol* 17(8): 2247-2254.
193. Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GC, Durkacz BW (2003). Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* 63(18): 6008-6015.

194. Kim SM, Rhee YH, Kim JS (2017). The anticancer effects of radachlorin-mediated photodynamic therapy in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1-A. *Anticancer Res* 37(11): 6251-6258.
195. Ahn JC, Biswas R, Kim JS (2014). The enhanced apoptotic effect of photodynamic therapy using photofrin combined with genistein in human ovarian cancer cell SK-OV-3. *Biomed Res (India)* 25: 51-57.
196. Naghipur A, Reszka K, Sapse AM, Lown JW (1989). Formation of benzoxathiete under mild conditions and its valence tautomerism in solution to monothio-o-benzoquinone: an experimental and quantum chemical study. *J Am Chem Soc* 111(1): 258-268.
197. Comsa S, Cimpean AM, Raica M (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res* 35(6): 3147-3154.
198. Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard LL, Petit A, Dulong C, Buquet C, Hu CQ, Mirshahi P, Laurent M, Fauvel-Lafeve F, Cazin L, Vannier JP, Lu H, Soria J, Li H, Varin R, Soria C (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 13: 63.
199. Kim HA, Kim MC, Kim NY, Kim Y (2015). Inhibition of hedgehog signaling reduces the side population in human malignant mesothelioma cell lines. *Cancer Gene Ther* 22(8): 387-395.
200. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 66.
201. Rkein AM, Ozog DM (2014). Photodynamic therapy. *Dermatol Clin* 32(3): 415-425.
202. Şahal H, Pişkin M, Organ G, Öztürk Ö, Kaya M, Canpolat E (2018). Zinc(II) phthalocyanine containing Schiff base containing sulfonamide: synthesis, characterization, photophysical, and photochemical properties. *J Coord Chem* 71: 1-18.
203. Banerjee S, Capper MS, Clarkson GJ, Huang H, Sadler PJ (2019). Dual-action platinum(II) Schiff base complexes: photocytotoxicity and cellular imaging. *Polyhedron* 172: 157-166.
204. Shinohara Y, Endo Y, Abe C, Shiba I, Ishizuka M, Tanaka T, Yonemura Y, Ogura SI, Tominaga M, Yamada H, Uto Y (2017). Development of a novel Schiff base derivative for enhancing the anticancer potential of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 20: 182-188.

205. Sridevi G, Antony S, Angayarkani R (2019). Schiff base metal complexes as anticancer agents. *Asian J Chem* 31: 493-504.
206. Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P (2019). Photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv Healthc Mater* 8(13): e1900132.
207. Tynga IM, Houreld NN, Abrahamse H (2013). The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). *J Photochem Photobiol B* 120: 171-176.
208. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL (2001). Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Exp Cell Res* 263(1): 145-155.
209. Sari C, Nalcaoglu A, Degirmencioglu I, Celep Eyupoglu F (2021). Tumor-selective new piperazine-fragmented silicon phthalocyanines initiate cell death in breast cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B* 216: 112143.
210. Gidon-Jeangirard C, Hugel B, Holl V, Toti F, Laplanche JL, Meyer D, Freyssinet JM (1999). Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4⁺ and PrPc⁺ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* 162(10): 5712-5718.
211. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1): 39-51.
212. Jori G, Fabris C (1998). Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines. *J Photochem Photobiol B* 43(3): 181-185.
213. Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E (2001). Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 61(20): 7495-7500.
214. Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
215. Wesierska-Gadek J, Hackl S, Zulehner N, Maurer M, Komina O (2011). Reconstitution of human MCF-7 breast cancer cells with caspase-3 does not sensitize them to action of CDK inhibitors. *J Cell Biochem* 112(1): 273-288.

216. Turner C, Devitt A, Parker K, MacFarlane M, Giuliano M, Cohen GM, Gregory CD (2003). Macrophage-mediated clearance of cells undergoing caspase-3-independent death. *Cell Death Differ* 10(3): 302-312.
217. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *PNAS* 105(35): 12815-12819.
218. Mc Gee MM, Hyland E, Campiani G, Ramunno A, Nacci V, Zisterer DM (2002). Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Lett* 515(1-3): 66-70.
219. Jelinek M, Balusikova K, Schmiedlova M, Nemcova-Furstova V, Sramek J, Stancikova J, Zanardi I, Ojima I, Kovar J (2015). The role of individual caspases in cell death induction by taxanes in breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 15(1): 8.
220. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 14: 32.
221. Sachet M, Liang YY, Oehler R (2017). The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* 22(10): 1189-1204.
222. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 135-147.
223. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 17(2): 97-111.
224. Galluzzi L, Kroemer G (2017). Secondary necrosis: accidental no more. *Trends Cancer* 3(1): 1-2.
225. Niepel M, Hafner M, Duan Q, Wang Z, Paull EO, Chung M, Lu X, Stuart JM, Golub TR, Subramanian A, Ma'ayan A, Sorger PK (2017). Common and cell-type specific responses to anti-cancer drugs revealed by high throughput transcript profiling. *Nat Commun* 8(1): 1186.
226. Noh I, Lee D, Kim H, Jeong CU, Lee Y, Ahn JO, Hyun H, Park JH, Kim YC (2018). Enhanced photodynamic cancer treatment by mitochondria-targeting and brominated near-infrared fluorophores. *Adv Sci (Weinh)* 5(3): 1700481.
227. Yuan SX, Li JL, Xu XK, Chen W, Chen C, Kuang KQ, Wang FY, Wang K, Li FC (2018). Underlying mechanism of the photodynamic activity of

- hematoporphyrininduced apoptosis in U87 glioma cells. *Int J Mol Med* 41(4): 2288-2296.
228. Huang Q, Ou YS, Tao Y, Yin H, Tu PH (2016). Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells. *Apoptosis* 21(6): 749-760.
 229. Tu PH, Huang WJ, Wu ZL, Peng QZ, Xie ZB, Bao J, Zhong MH (2017). Induction of cell death by pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy in lung cancer A549 cells. *Cancer Med* 6(3): 631-639.
 230. Qi S, Guo L, Yan S, Lee RJ, Yu S, Chen S (2019). Hypocrellin A-based photodynamic action induces apoptosis in A549 cells through ROS-mediated mitochondrial signaling pathway. *Acta Pharm Sin B* 9(2): 279-293.
 231. Sun X, Li Y, Li W, Zhang B, Wang AJ, Sun J, Mikule K, Jiang Z, Li CJ (2006). Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by beta-lapachone through activation of DNA damage response pathway. *Cell Cycle* 5(17): 2029-2035.
 232. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 18(11): 1272-1282.
 233. Kim JS, He L, Lemasters JJ (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 463-470.
 234. Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X (2016). Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem Soc Rev* 45(23): 6597-6626.
 235. Ming L, Cheng K, Chen Y, Yang R, Chen D (2021). Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. *Cancer Med* 10(1): 257-268.
 236. Chen Q, Li KT, Tian S, Yu TH, Yu LH, Lin HD, Bai DQ (2018). Photodynamic therapy mediated by Aloe-Emodin inhibited angiogenesis and cell metastasis through activating MAPK signaling pathway on HUVECs. *Technol Cancer Res Treat* 17.
 237. Lai YC, Su SY, Chang CC (2013). Special reactive oxygen species generation by a highly photostable BODIPY-based photosensitizer for selective photodynamic therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 5(24): 12935-12943.
 238. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8: 31.

239. Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D, Letai A (2013). p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ* 20(11): 1465-1474.
240. Ying Y, Padanilam BJ (2016). Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? *Cell Mol Life Sci* 73(11-12): 2309-2324.
241. Elkholi R, Chipuk JE (2014). How do I kill thee? let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *Bioessays* 36(1): 46-51.
242. Gartel AL, Feliciano C, Tyner AL (2003). A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin. *Oncol Res* 13(6-10): 405-408.
243. Huovinen M, Loikkanen J, Myllynen P, Vahakangas KH (2011). Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. *Toxicol In Vitro* 25(5): 1007-1017.
244. Marydasan B, Nair RR, Babu PSS, Ramaiah D, Nair SA (2019). Picolyl porphyrin nanostructures as a functional drug entrant for photodynamic therapy in human breast cancers. *ACS Omega* 4(7): 12808-12816.
245. Huang L, Li A, Liao G, Yang F, Yang J, Chen X, Jiang X (2017). Curcumol triggers apoptosis of p53 mutant triple-negative human breast cancer MDA-MB 231 cells via activation of p73 and PUMA. *Oncol Lett* 14(1): 1080-1088.
246. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5): 2315-2319.
247. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE (2005). Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110: 21-28.
248. Wang X, Hu J, Wang P, Zhang S, Liu Y, Xiong W, Liu Q (2015). Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, sinoporphyrin sodium. *Theranostics* 5(7): 772-786.
249. Zhuo Z, Song Z, Ma Z, Zhang Y, Xu G, Chen G (2019). Chlorophyllin e6-mediated photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Oncol Rep* 41(4): 2181-2193.
250. de Freitas LM, Serafim RB, de Sousa JF, Moreira TF, Dos Santos CT, Baviera AM, Valente V, Soares CP, Fontana CR (2017). Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. *BMC Cancer* 17(1): 123.

251. Liu LY, Man XX, Yao HX, Tan YY (2017). Effects of pheophorbide a-mediated photodynamic therapy on proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21(24): 5571-5579.
252. Wang X, Decker CC, Zechner L, Krstin S, Wink M (2019). In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacol Toxicol* 20(1): 4.
253. Small JV, Geiger B, Kaverina I, Bershadsky A (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12): 957-964.
254. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651): 1704-1709.
255. Chen YL, Wang CY, Yang FY, Wang BS, Chen JY, Lin LT, Leu JD, Chiu SJ, Chen FD, Lee YJ, Chen WR (2014). Synergistic effects of glycated chitosan with high-intensity focused ultrasound on suppression of metastases in a syngeneic breast tumor model. *Cell Death Dis* 5: e1178.
256. Zduniak K, Gdesz-Birula K, Wozniak M, Dus-Szachniewicz K, Ziolkowski P (2020). The assessment of the combined treatment of 5-ALA mediated photodynamic therapy and thalidomide on 4T1 breast carcinoma and 2H11 endothelial cell line. *Molecules* 25(21): 5184.
257. Erdogan O, Abak M, Demirbolat GM, Birtekocak F, Aksel M, Pasa S, Cevik O (2019). Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: the characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells. *PLoS One* 14(6): e0216496.
258. Ma H, Yang K, Li H, Luo M, Wufuer R, Kang L (2021). Photodynamic effect of chlorin e6 on cytoskeleton protein of human colon cancer SW480 cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 33: 102201.
259. Juan L, Diandian W, Jianfeng W, Ning L, Yuchen F, Na L, Sijie Z, Kun L, Fengyuan S (2021). Efficient anticancer effect on choroidal melanoma cells induced by tanshinone IIA photosensitization. *Photochem Photobiol* 97(4): 841-850.
260. Huang L, Lin H, Chen Q, Yu L, Bai D (2019). MPPa-PDT suppresses breast tumor migration/invasion by inhibiting Akt-NF-kappaB-dependent MMP-9 expression via ROS. *BMC Cancer* 19(1): 1159.

261. Damke G, Souza RP, Montanha MC, Damke E, Goncalves RS, Cesar GB, Kimura E, Caetano W, Hioka N, Consolaro MEL (2020). Selective photodynamic effects on breast cancer cells provided by p123 pluronic(R)- based nanoparticles modulating hypericin delivery. *Anticancer Agents Med Chem* 20(11): 1352-1367.
262. Chi YF, Qin JJ, Li Z, Ge Q, Zeng WH (2020). Enhanced anti-tumor efficacy of 5-aminolevulinic acid-gold nanoparticles-mediated photodynamic therapy in cutaneous squamous cell carcinoma cells. *Braz J Med Biol Res* 53(5): e8457.
263. Jia Y, Chen L, Chi D, Cong D, Zhou P, Jin J, Ji H, Liang B, Gao S, Hu S (2019). Photodynamic therapy combined with temozolomide inhibits C6 glioma migration and invasion and promotes mitochondrial-associated apoptosis by inhibiting sodium-hydrogen exchanger isoform 1. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 26: 405-412.
264. Ye T, Chen T, Jiang B, Yang L, Liu X, Chen B, Zou Y, Yu B (2020). 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy inhibits invasion and metastasis of SCL-1 cells probably via MTSS1 and p63 gene related pathways. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32: 102039.
265. Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G (2018). Photodynamic therapy using pheophorbide and 670nm LEDs exhibits anti-cancer effects in-vitro in androgen dependent prostate cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 21: 130-137.
266. Perrot-Applanat M, Di Benedetto M (2012). Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adh Migr* 6(6): 547-553.
267. Chen L, Lin G, Chen K, Liang R, Wan F, Zhang C, Tian G, Zhu X (2020). VEGF promotes migration and invasion by regulating EMT and MMPs in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 11(24): 7291-7301.
268. Pathak AP, McNutt S, Shah T, Wildes F, Raman V, Bhujwalla ZM (2013). In vivo "MRI phenotyping" reveals changes in extracellular matrix transport and vascularization that mediate VEGF-driven increase in breast cancer metastasis. *PLoS One* 8(5): e63146.
269. Roger S, Besson P, Le Guennec JY (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616(2): 107-111.
270. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY (2009). Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 284(13): 8680-8691.

271. Nelson M, Yang M, Millican-Slater R, Brackenbury WJ (2015). Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget* 6(32): 32914-32929.
272. Mao W, Zhang J, Korner H, Jiang Y, Ying S (2019). The emerging role of voltage-gated sodium channels in tumor biology. *Front Oncol* 9: 124.
273. Tatsumi T, Shimazaki C, Goto H, Araki S, Sudo Y, Yamagata N, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M (1996). Expression of adhesion molecules on myeloma cells. *Jpn J Cancer Res* 87(8): 837-842.
274. Shain KH, Dalton WS (2001). Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther* 1(1): 69-78.
275. Schmidmaier R, Morsdorf K, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G (2006). Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers* 21(4): 218-222.
276. Joutsen J, Da Silva AJ, Luoto JC, Budzynski MA, Nylund AS, de Thonel A, Concordet JP, Mezger V, Saberán-Djoneidi D, Henriksson E, Sistonen L (2020). Heat shock factor 2 protects against proteotoxicity by maintaining cell-cell adhesion. *Cell Rep* 30(2): 583-597.
277. Haroun-Bouhedja F, Lindenmeyer F, Lu H, Soria C, Jozefonvicz J, Boisson-Vidal C (2002). In vitro effects of fucans on MDA-MB231 tumor cell adhesion and invasion. *Anticancer Res* 22(4): 2285-2292.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Sarı, Ceren

Uyruğu :

Doğum Tarihi ve Yeri

Telefon (İş)

E-Posta

Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji ABD	Halen
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji ABD	2016
Lisans	Fatih Üni. Genetik ve Biyomühendislik	2012
Lise	Özel Gülbaharhatun Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	KTÜ Tıbbi Biyoloji ABD	2015- Halen
2. Erasmus+ Staj Hareketliliği	Johannes Gutenberg Uni. Mainz	2017-2017

YABANCI DİL

İngilizce: YÖKDİL Sağlık Bilimleri; 92.5, YÖKDİL Fen Bilimleri; 92.5

UZMANLIK ALANI

Hücre Biyolojisi, Kanser Biyolojisi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

YAYINLAR

1. **Sarı 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.

2. **Sari C**, Sumer C, Celep Eyupoglu F (2020). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis in colorectal cancer cells via inhibition of survivin. Turk J Biol 44(5): 264-274.
3. **Sari C**, Nalcaoglu A, Degirmencioğlu I, Celep Eyupoglu F (2021). Tumor-selective new piperazine-fragmented silicon phthalocyanines initiate cell death in breast cancer cell lines. J Photochem Photobiol B 216: 112-143.
4. **Sari C**, Kolaylı S, Celep Eyupoglu F (2021). A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. Haydarpasa Numune Med J 61(3).

BİLDİRİLER

1. **Sari C**, Bayrak R, Değirmencioğlu İ, Celep Eyüpoğlu F (2017). Aksiyal pozisyonlarda tiyofen ve furan grupları bulunan silisyum ftalosiyanınların sentezi ve kolorektal kanser özelliği taşıyan HCT-116 hücre hattına olan fotodinamik etkilerinin incelenmesi. VI. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Burdur, Türkiye, 18-21 Mayıs 2017, 34-34.
2. **Sari C**, Bayrak R, Değirmencioğlu İ, Celep Eyüpoğlu F (2017). Furan-azometin bileşimli yeni bir silisyum ftalosiyanınların sentezi ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerine karşı fotodinamik terapi etkinliğinin araştırılması. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26-29 Ekim 2017, 322-322.
3. **Sari C**, Sumer C, Celep Eyupoglu F (2017). Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in farklı kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26-29 Ekim 2017, 124-124.
4. **Sari C**, Bayrak R, Değirmencioğlu İ, Celep Eyüpoğlu F (2018). Furfural çevreli yeni bir silisyum ftalosiyanınların MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki fotodinamik etkilerinin araştırılması. 7. Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, 11-14 Ekim 2018, 162-162.
5. Nalcaoglu A, **Sari C**, Degirmencioğlu I, Celep Eyupoglu F (2019). Photodynamic therapy with the new furoyl-piperazine-propanol silicon phthalocyanines on breast cancer cell lines. 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Türkiye, 27-29 Eylül 2019, 144-144.
6. Nalcaoglu A, **Sari C**, Degirmencioğlu I, Celep Eyupoglu F (2019). Design of novel furoyl-methoxy-piperazine phthalocyanines with high ROS capability in the breast cancer cell line as an anticancer drug. 7th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, İstanbul, Türkiye, 19-21 Aralık 2019, 140.140.