

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ FTALOSİYANİN TÜREVLERİNİN ANTİKANSER FOTODİNAMİK TERAPİ
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

NAZLI SALIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ FTALOSİYANİN TÜREVLERİNİN
ANTİKANSER FOTODİNAMİK TERAPİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

NAZLI SALIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2020

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF ANTICANCER
PHOTODYNAMIC THERAPY EFFICACY OF NEW
PHTHALOCYANINE DERIVATIVES**

NAZLI SALIK

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAGCI

GEBZE

2020



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/06/2020 tarih ve 2020/28 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29/06/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Nazlı SALIK'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Doç. Dr. Meltem GÖKSEL ŞAHİN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Fotodinamik tedavi (PDT), tekrarlayan kanserlerin tedavisi için umut verici bir terapötik yöntemdir. PDT, bir ışık kaynağı tarafından aktive edilen ve fotosensör olarak adlandırılan ışığa duyarlı bir molekülün kullanımına dayanmaktadır.

İkinci nesil fotosensörlerden olan ftalosiyanimler(Pc) genellikle tümör dokusunda PDT'nin etkinliğini arttırmak için biyomoleküller ile konjuge edilmektedir. Bu tez çalışması için *Pc4a* ve *Pc5a* olarak adlandırılan iki yeni aksiyal silisyum (IV) ftalosiyanim (Si(IV)Pc) sentezlendi. Bu ajanlar Si(IV)Pc'nin hücre-içi agregasyonunun engellenmesi ve kanser hücrelerini hedef alması için arjinin ile konjuge edilmiştir. Sentezlenen ftalosiyanimlerden *Pc4a* bir arjinin grup içerirken *Pc5a* ise iki arjinin grup içermektedir. Bu çalışma ile sentezlenen ftalosiyanimlerin serviks kanseri (HeLa), hepatosellüler karsinoma (HUH-7) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatları üzerindeki antikanser özelliklerinin fotosensör aracılı PDT terapisinde kullanımı için incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamda, sentezlenen ftalosiyanim türevlerinin hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, apoptoz, mitokondri potansiyeli ve DNA hasarı üzerine etkileri test edildi. Bunlara ek olarak, 10 µM *Pc5a* uygulanan hücrelerde kanser kök hücre ve EMT ile ilişkili genlerin ifadesi RT-qPCR ile araştırıldı. Tüm deneyler sırasında, farklı konsantrasyonlarda (0, 2.5, 5 ve 10 µM) *Pc4a* ve *Pc5a* ile inkübe edilmiş kanser hücreleri 680 nm dalga boyundaki güç kaynağı ile 2 J/cm² olacak şekilde aydınlatıldı. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre *Pc5a*'nın *Pc4a*'ya göre HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücre hatlarında hücre proliferasyonunun, hücre canlılığının ve mitokondri potansiyelinin inhibe edilmesinde daha etkili olduğu tespit edilirken apoptoz ve DNA hasarını arttırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, *Pc5a* diğer hücre hatlarına göre HeLa hücrelerinde daha etkili olup serviks kanserinin tedavisinde umut verici bir PDT ajanı olarak karşımızda durmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Fotodinamik Terapi (PDT), Ftalosiyanim (Pc), Silisyum Ftalosiyanim (Si(IV)Pc).

SUMMARY

Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic modality for the cure of recurrent cancers. PDT is based on the use of a light-sensitive molecule called photosensitizer, which is activated by a light source.

In this master thesis, two new axial silicon (IV) phthalocyanines (Si(IV)Pc), *Pc5a* and *Pc4a*, were synthesized and these were conjugated with arginine to target cancer cells and reduce to aggregation in the cell. *Pc4a* contains a single arginine group whereas *Pc5a* contains two arginine groups. Here, we aimed to investigate the anticancer activities of these photosensitizers mediated photodynamic therapy on human cervical cancer cell line (HeLa), hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7) and breast cancer cell line (MCF-7). In this context, the effects of these agents on cell proliferation, cell cytotoxicity, cell apoptosis, DNA damage and mitochondrial potential were tested. Furthermore, cancer stem cell and EMT related genes' expression level were evaluated after the treatment of cells with 10 μ M of *Pc5a* by RT-qPCR. During the experiments, Cancer cells that pre-treated with *Pc5a* and *Pc4a* (0, 2.5, 5 and 10 μ M) were illuminated with a light source (680 nm) at a power density of 2 J/cm². Findings from this study showed that *Pc5a* is more effective than *Pc4a* in inhibiting the proliferation, cell viability and potential of mitochondria while increasing the apoptosis and DNA damage of HeLa, HuH-7 and MCF-7 cell lines. In conclusion, among the other cells, *Pc5a* is more effective on HeLa cells and a promising PDT agent for the therapy of cervix cancer.

Key Words: Cancer, Photodynamic therapy (PDT), Phthalocyanines (Pc), silicon (IV) phthalocyanines (Si(IV)Pc).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama başlamamda ve deney süreçlerinde bilgisini, anlayışını ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi desteklerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya;

Tez çalışmamda kullandığım PDT ajanlarını sentezleyen Doç.Dr. Meltem Göksel Şahin ve ekibine;

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim ve bana destek olan, hocalarım Uzm. Biyolog Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN, Öğr. Gör. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ ve Arş. Gör. Arzu AYSAN'a; Laboratuvar arkadaşlarım Esmâ ERCİYAS, Şule ERDEMİR, Seyhan Ünsal, Maide Şeker, Şevval Dik'e; Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan biricik öğretmenim Metin Çetin ve eşi İlknur Çetin'e en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tüm bunların yanında lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen biricik arkadaşlarım Miraç KARAKUŞ ve İsmail Can Büyüktepe' ye ve bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen Sevgili Aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Kanser	3
2.2. Güncel Kanser Tedavi Yaklaşımları	7
2.3. Fotodinamik Terapi (Photodynamic therapy: PDT)	8
2.3.1. PDT de Fotosensörler ve Işık	11
2.3.2. PDT'nin Etkilediği Hücre-İçi Ölüm Mekanizmaları	12
2.3.3. PDT'de Tümör İmha Mekanizmaları	13
3. GEREÇLER	15
3.1. Genel Kimyasallar	15
3.2. Cihazlar	15
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler	16
3.4. Çözelti ve Tamponlar	16
3.5. Primerler	17
3.6. Antikorlar, Boyalar ve Ftalosiyenin Maddeleri	17
3.7. Kitler	18
4. YÖNTEMLER	19
4.1. Hücre Kültürü	19
4.2. Hücre Stoklarının Oluşturulması	19

4.3. Fonksiyonel Analizler	19
4.3.1. Hücre Proliferasyonu Analizi	20
4.3.2. Hücre Canlılığı Analizi	21
4.3.3. Hücresel Alım	21
4.3.4. Apoptozun Belirlenmesi	22
4.4. Konfokal Hücre Görüntülemesi	23
4.4.1. Hücre-içi Ftalosiyanin Türevlerinin Görüntülenmesi	23
4.4.2. DNA Kırığı Analizi	24
4.4.3. Mitokondri Potansiyelinin Analizi	24
4.4.4. Pc5a Uygulanan Hücrelerin Gen İfadesi Analizleri	25
4.4.5. RNA İzolasyonu	25
4.4.6. cDNA Sentezi	25
4.4.7. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi	26
4.5. İstatistiksel Analizler	27
5. BULGULAR	28
5.1. Ftalosiyanin Türevlerinin Sentezi	28
5.2. Ftalosiyanin Türevlerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	29
5.2.1. <i>Pc4a</i> 'nın Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	29
5.2.2. <i>Pc5a</i> 'nın Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	30
5.3. Ftalosiyanin Türevinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	31
5.4. Ftalosiyanin Türevinin Hücre-içine Alınmasının Gösterilmesi	32
5.5. Ftalosiyanin Türevinin Apoptotik Etkisi	34
5.6. Ftalosiyanin Türevinin DNA Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	36
5.7. Ftalosiyanin Türevinin Mitokondri Potansiyeli Üzerine Etkisinin Analizi	38
5.8. Ftalosiyanin Türevinin Gen İfadesi Üzerinden etkisinin Araştırılması	39
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
 KAYNAKLAR	 45
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
L	: Litre
M	: Molar
ng	: Nanogram
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
NaCl	: Sodyum Klorür
CK19	: Sitokeratin 19
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMT	: Epitel-Mezenkim Dönüşümü
FBS	: Fötal Dana Serum
Gapdh	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
IF	: İmmünfloresan
Met	: Mezenkim-Epitel Dönüşümü
NEAA	: Gerekli Olmayan Amino Asit
NF-kB	: Nüklear Faktör Kapa B
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PFA	: Praformaldehit

RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
Rpm	: Dakika Başına Dönüş
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
WB	: Wester Blot
ZEB	: Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 1
PS	: Işığa Duyarlı Madde (Photosensitizer: Fotosensitizerler)
Pc	: Ftalosiyanin
PDT	: Fotodinamik terapi
Si(IV)Pc	: Silisyum Ftalosiyanin

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Kanserin ayırt edici özellikleri.	4
2.2: PDT’de ROS oluşum mekanizmaları.	9
2.3: PDT’den sonra hücre içinde değişen sinyal iletim yolları.	10
2.4: PDT sonrası hücrelerde apoptoza yol açan sinyal yollarının incelenmesi.	13
5.1: <i>Pc4a</i> ve <i>Pc5a</i> maddelerinin yapısı	28
5.2: <i>Pc4a</i> ’nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin xCELLigence analiz sistemi ile incelenmesi.	29
5.3: <i>Pc5a</i> ’nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin xCELLigence analiz sistemi ile incelenmesi.	30
5.4: <i>Pc5a</i> ’nın hücre canlılığı üzerine etkisinin ışık verildiği ve verilmediği durumlarda kristal viole gösterilmesi.	32
5.5: <i>Pc5a</i> ’nın hücre içerisine alındığının gösterilmesi.	33
5.6: <i>Pc5a</i> ’nın apoptotik etkisinin akım sitometresi ve western blotlama ile gösterilmesi.	35
5.7: <i>Pc5a</i> uygulanan hücrelerde H2AXboyaması.	37
5.8: <i>Pc5a</i> uygulanan hücrelerde TMRE boyaması.	39
5.9: <i>Pc5a</i> uygulaması sonucunda HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerindeki EMT, Kök Hücre Özelliği ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifade analizi.	40

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: İleri ve geri primer listesi.	17
4.1: 2X RT master karışımı.	26
4.2: cDNA sentezi için gerekli olan PCR döngü şartları.	26
4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.	27
4.4: RT-qPCR döngü şartları.	27

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin genetik ve çevresel etmenler sonucunda kontrolsüz olarak bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Dünya genelinde meydana gelen ölümler arasında kansere bağlı etmenler ikinci sırada yer almaktadır. Bu nedenle kanseri hedef alan etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, yapılan araştırmaların bir kısmı radyasyon ve kemoterapi gibi konvansiyonel tedavi yöntemleri, diğer kısmı da fotodinamik terapi gibi farklı teknolojik yaklaşımlar ve hedefe-yönelik tedaviler alanında gerçekleştirilmektedir [1, 2]. Fotodinamik terapi (photodynamic therapy: PDT) bu alternatif tedavi yöntemleri arasında üzerinde en çok çalışılan ve oldukça etkin tedavi sağlayan bir yöntem olarak karşımızda durmaktadır [3].

PDT’de toksik olmayan bir fotosensör (photosensitizer, PS) tümör dokusuna yönlendirildikten sonra organizmaya zararlı olmayan dalga boyundaki ışık ile uyarıldığında oluşan serbest radikaller ve singlet oksijen; yağ, protein ve nükleik asitler gibi birçok biyolojik molekül ile etkileşir ve kanser hücrelerini tahrip eder [4-6]. PDT’de kullanılan PS’nin fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri PDT uygulamasının başarıya ulaşmasında belirleyici rol oynamaktadır. Bundan dolayı, PDT uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan bir PS, kimyasal olarak saf olmalı, agregasyon yapmamalı, seçici olarak tümör dokusunu hedeflemeli ve ışıkla uyarılmadığı durumda toksik etki göstermemelidir [2, 7].

Ftalosiyanin bileşikler ise ikinci nesil PS olarak adlandırılmakla birlikte yüksek dalga boyunda (near IR) absorpsiyon yapmaları, yüksek triplet kuantum verimleri, triplet halde kalma sürelerinin uzun olması ve etkili bir şekilde singlet oksijen oluşturabilme kapasiteleri nedeniyle fotodinamik terapi ile kanser tedavisinde kullanılan önemli moleküllerdir [7]

Literatürde PTD’nin cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavi yöntemleri ile birlikte ya da tek başına uygulanabilirliği gösterilmiştir [8, 9]. Bununla birlikte, tümör dokusunun da özgül olarak hedeflenmesinden dolayı sağlıklı hücrelerin daha az zarar görmesi de PTD’nin avantajları arasında yer almaktadır.

PDT'nin kanser tedavisindeki avantajları göz önüne alındığında bu tedavide kullanılacak yeni ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Önerilen bu tez çalışması kapsamında, Doç. Dr. Meltem Göksel Şahin tarafından sentezlenen ftalosiyanin türevli PDT ajanlarının antikanser etkilerinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, HuH-7 Hepatoselüler Karsinoma (HCC) hücre hattı, HeLa serviks kanseri hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Bu kapsamda ilk olarak, sentezlenmiş olan PDT ajanları farklı dozlarda kanser hücrelerine uygulanarak hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi xCELLigence RTCA DP Analyzer sistemi kullanılarak impedansa dayalı bir şekilde ve sitotoksik etkileri ise kristal viole yöntemi kullanılarak belirlendi. PDT ajanlarının hücre proliferasyonu ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesinden sonra, apoptoz üzerine etkileri akım sitometresi ve western blotlama ile sırasıyla AnnexinV/7ADD ve PARP antikoru kullanılarak gösterildi. Bunların yanı sıra, bu ajanların mitokontri potansiyeli ve DNA hasarı üzerindeki etkileri de konfokal mikroskobu kullanılarak gösterildi. Son olarak, yeni sentezlenen ftalosiyanin türevlerinin kanser hücrelerinde değiştirdiği gen ve protein ifadeleri de RT-qPCR ve western blotlama ile araştırıldı. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin de işaret ettiği gibi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavilerin kanserli hastalarda meydana getirdiği yan etkiler de göz önüne alındığında, yeni sentezlenen ftalosiyanin türevlerinin kanser tedavisinde etkin kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

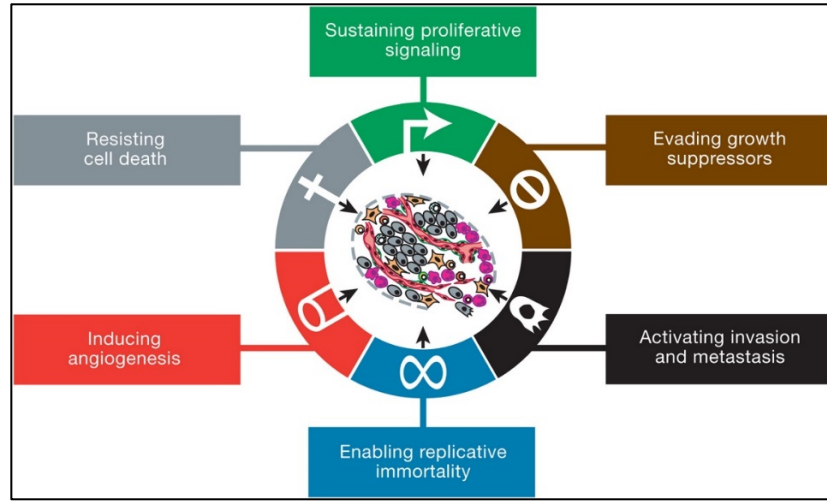
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kanser

Kanser, DNA hasarları ve genomik instabiliteler sonucunda meydana gelen kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör oluşumuna yol açan genetik değişikliklerin neden olduğu bir hastalıktır [10]. Bu genetik değişikliklerin az bir kısmı kalıtsal genetik mutasyonlara bağlı iken çoğu çevresel faktörler ve yaşam tarzı ile ilişkilendirilmektedir [11, 12]. Kanser araştırmacıları tarafından kullanılan "çevresel" terimi, insanlarla etkileşimde olan herşey olarak tanımlanmakta ve biyofiziksel ortamla sınırlı olmayıp yaşam tarzı ve davranışsal faktörleri de içermektedir [12]. Meydana gelen kanserlerin yaklaşık olarak %90'nı çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Kansere bağlı ölümlere katkıda bulunan yaygın çevresel faktörler arasında diyet ve obezite (% 30–35), tütün kullanımı (% 25-30), enfeksiyonlar (% 15-20), radyasyon (%10), fiziksel aktivite eksikliği, virüsler ve çevre kirliliği bulunmaktadır [12]. Çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan mutasyonlar sonucunda kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeli kazanmakta ve bulundukları dokulardan ayrılarak metastatik odaklar oluşturmaktadır [13]. Metastaz yeteneği olan tümörler kötü huylu olarak adlandırılırken iyi huylu tümörlerin ise diğer doku ve organlara göç etme özelliği bulunmamaktadır [14].

Hem iyi hem de kötü huylu tümörlerin sınıflandırılmasında ortaya çıktıkları hücre tipi esas alınmaktadır. Genellikle sınıflandırma karsinomalar, sarkomalar ve lenfomalar olmak üzere üç ana grupta yapılmaktadır [15]. Karsinomalar, insan kanser tiplerinin yaklaşık %90'ını oluşturan epitel hücrelerden köken alan malignitelerdir [16]. Diğer bir kanser sınıfı olan sarkomalar kas, kemik, kıkırdak ve lifli doku gibi bağ dokularında oluşan katı tümörlere verilen isimdir [17, 18]. İnsan malignitelerinin küçük bir kısmını oluşturan lösemiler kan hücrelerinden kaynaklanırken lenfomalar ise bağışıklık sistemi hücrelerinde meydana gelen anomalilerden kaynaklanmaktadır [19, 20]. Bunların yanı sıra bazı tümör çeşitlerinin insidansı ve mortalite oranları yüksek derecede değişkenlik göstermektedir [14].

Kanser hücrelerinin tanımlanması ve karakterizasyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [15, 21-23]. Bu çalışmalardan en önemlisi Hanahan ve Weinberg tarafından kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinin anlatıldığı iki farklı derlemedir [23, 24]. Bu derlemelerde kanser hücreleri için altı tane ayırt edici özellik tanımlanmışlardır. Bu ayırt edici özellikler; proliferasyon için gerekli olan sinyallerin sürdürülmesi, tümör baskılayıcı faktörlerden kaçınılması, hücre ölümüne direnç kazanılması, telomeraz aktivesine bağlı hücre ölümsüzlüğünün kazanılması, anjiyogenezin indüklenmesi ve invazyon ile metastaz yeteneğinin kazanılması olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Kanser h  relerinin ayırt edici   zellikleri.

Proliferasyon için gerekli olan sinyallerin sürdürülmesi: Normal h  reler büyümek ve bölünmek için h  re-dışından gelen hormonlar ve ligandlar gibi farklı sinyal moleküllerine ihtiyaç duyarken kanser h  releri bu harici sinyaller olmadan da büyüme yeteneğine sahiptir. Kanser h  releri bu sinyallere bağımlı olmamak için farklı mekanizmalar geliştirmiştir. Bunlardan biri kanser h  relerinin otokrin olarak sinyal moleküllerini salgılaması iken, kanser h  relerinin geliştirdiği diğer bir mekanizma ise h  re büyümesini engelleyen sinyallere karşı duyarsız olmalarıdır. Bununla birlikte, oluşan mutasyonlar ile dışarıdan ligand gelmesine ihtiyaç duymadan sürekli aktif formda bulunan h  re yüzey reseptörleri veya proteinler oluşmaktadır [22, 24, 25]. Tüm bu meydana gelen değişimler sonucunda h  re bölünmesi kontrol mekanizmaları bozulmakta ve h  reler sürekli bölünme kapasitesi kazanmaktadır.

Tümör baskılayıcı faktörlerden kaçınılması: Hücre bölünmesi ve büyümesi dışarıdan gelen sinyaller tarafından aktive edilmesine karşın, hücre-içi mekanizmalar ve tümör-baskılayıcı genler de hücre bölünmesini baskılamaktadır. Hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenleyen programların birçoğu tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenmektedir. Bu genler, hücre bölünmesi sırasında DNA hasarı gibi sorunlar gördüğü zaman bölünmeyi durdurmaktadır. Fakat kanserde, bu tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücredeki hasara bakılmaksızın kontrolsüz bir şekilde hücre bölünmesi gerçekleştirilir. Kanser hücrelerinde bu tümör baskılayıcı genlerden özellikle RB (retinoblastom ile ilişkili) ve TP53 sıklıkla mutasyona uğrayarak işlevlerini kaybetmektedir[22].

Hücrelerin aşırı bölünmesini engelleyen diğer bir mekanizma ise temasa bağlı olarak görülen inhibisyonudur (contact dependent inhibition). Hücreler çoğalarak bulundukları alanı doldurarak diğer hücrelere dokunduklarında bu mekanizma devreye girerek hücre büyümesini baskılamaktadır. Ancak kanser hücrelerinde bu mekanizma devre-dışı kalmakta ve hücreler bölünmeye devam etmektedir [22, 26].

Hücre ölümüne direnç kazanılması: Hücrelerde nekroz, otofaji ve apoptoz gibi farklı mekanizmalar ile hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz, gelişim sürecinde de görülen ve programlı hücre ölümü olarak adlandırılan fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz sonucunda meydana gelen hücre ölümünde hücre-içeriği kademeli olarak parçalanarak küçük membranlara paketlenmekte ve immün sistem elemanları tarafından temizlenmektedir. Apoptoz, dokuların korunması ve düzgün bir şekilde gelişmeleri için gereklidir. Sağlıklı hücrelerde meydana gelen hasar eğer düzeltilemeyecek boyutta ise hücre bölünmesi durdurulmakta ve apoptoz mekanizması aktive olmaktadır. Kanser hücrelerindeki mutasyonlar ve buna bağlı olarak hücrelerin kazandıkları özelliklerden dolayı hücredeki hasarı/anormallikleri tespit eden mekanizmalar ile birlikte bu süreçte görev alan protein ve molekülleri değişime uğramakta ve apoptoz engellenerek hücre ölümden kaçmaktadır [22, 27].

Telomeraz aktivesine bağlı hücre ölümsüzlüğünün kazanılması: Sağlıklı hücrelerin kromozomlarında telomer olarak adlandırılan bölgeler bulunmaktadır. Teorik olarak her hücre bölünmesinde bu bölgeler bir miktar kısalmakta ve bu kısalma sonucunda da hücreler yaşlanmaktadır. Kök hücre özelliğine sahip olan hücrelerde

bulunan telomeraz enzimi ise her bölünmeden sonra bu telomer bölgesini uzatarak kromozomların yaşlanmaya bağlı kısalmasını engellemektedir. Bu süreçte rol oynayan telomeraz enzimi kök hücreler dışında kanser hücrelerinde de aktive olmaktadır. Bu sayede kanser hücreleri her bölünmeden sonra telomer bölgesindeki kısalmayı engellemektedir. Böylece kanser hücrelerinde yaşlanma başlamaz ve hücreler teknik olarak sınırsız bölünme özelliği kazanmış olurlar [22].

Anjiyogenezin indüklenmesi: Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluştuğu süreçtir. Doku ve organların gelişimi sırasında bölünmekte olan hücrelerin beslenmesi için kan damarlarının oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Benzer şekilde, hızlı bölünme yeteneğine sahip ve kontrolsüz çoğalan kanser hücreleri de büyüyen hücre kitlesine bağlı olarak ortaya çıkan oksijen ve besin ihtiyacının sağlanması için anjiyojenik anahtarı (angiogenic switch) aktive etmektedir. Bu sayede, kan damarı gelişimini engelleyen faktörlerin üretimi azalırken kan damarı oluşumunu destekleyen faktörlerin üretimi artmaktadır [22, 28]. Anjiyogenez sonucunda da büyüyen tümör dokusunun içerisinde yeni kan damarları oluşarak dokunun beslenmesi garanti altına alınmaktadır.

İnvazyon ile metastaz yeteneğinin kazanılması: Embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde epitel-mezenkim dönüşümü (EMT) mekanizması aktive olmaktadır. Bu süreçte, epitel karakterdeki hücreler mezenkimal bir özellik kazanmaktadır. Embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinin yanında EMT kanser oluşumunda da görülmektedir. Hücreler EMT mekanizmasını kullanarak bulundukları primer dokulardan ayrılmakta ve lenf ya da kan dolaşımına katılarak uzak doku/organlarda ikincil metastatik odaklar oluşturmaktadır. EMT karmaşık bir süreç olup ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG ve TWIST gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna bağlı olarak epitel hücre fenotipi ile ilişkili E-kaderin ve sitokeratinlerin ifadesi azalırken, Vimentin ve N-kaderin gibi daha zayıf hücre bağlantı elemanlarının ifadesi artmaktadır [13, 22]. Bu sayede ortaya çıkan metastaz kanser ile ilişkili ölümlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır.

Kanser hem dünya hem ülkemiz için ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak ise yaklaşık her altı kişiden birinin kanserden dolayı hayatını kaybettiği bilinmektedir. 2018'de yaklaşık olarak 9.6 milyon kişinin hayatını kaybetmesine sebep olan kanserin dünyada görülme sıklığı ve ölüm oranları her

geçen yıl artış göstermektedir [29]. Kanserle ilgili olarak artan ölüm oranları da düşünüldüğünde, yüksek seçicilik özelliğine sahip olan ve kanser belirteçlerini hedef alan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Güncel Kanser Tedavi Yaklaşımları

GLOBACAN 2018 verilerine göre, Dünya da meydana gelen ölümlerin ikinci nedeni kanserdir [30]. Bu nedenle, kanseri hedef alan etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalar konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra, immünoterapi, hormonal tedavi ve fotodinamik tedavi yöntemlerini kapsamaktadır.

Konvansiyonel tedavi yöntemleri; Cerrahi yöntem: Kanserli dokuyu ve bu dokunun etrafında bulunan kanser hücrelerinin yayılımını sağlayan dokunun çıkartılması esasına dayanmaktadır [31]. Kanser tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere rağmen cerrahi yöntemler hala en etkili kanser tedavisi yöntemini oluşturmaktadır.

Radyoterapi: Bu yöntem tek başına kullanılabildiği gibi genellikle cerrahi yaklaşımın ardından iyonlaştırıcı ışınların kullanılmasıyla tümörün yok edilmesi prensibine dayanmaktadır [32, 33].

Kemoterapi: Sitotoksik tedavi olarak da bilinmektedir. Burada amaç, anti-kanser kemoterapötik ilaçlarının kullanılmasına bağlı olarak kanser hücrelerini yok etmek, kontrol altına almak ya da kanserin sebep olduğu tahribatı ortadan kaldırmaktır [34]. Kanser immünoterapi yöntemleri; son yıllarda hedefe özgül ve etkili bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkan immünoterapi hastanın bağışıklık sisteminin uyarılması sonucunda kanserle savaşma yeteneğini geliştiren bir tedavi yaklaşımıdır. İmmünoterapiler aktif veya pasif olarak kategorize edilebilmektedir [35-37].

Aktif immünoterapi: Tümör antijenlerinin dendritik hücrelere yüklenmesi ve hastanın T hücrelerinin bu antijenlere karşı uyarılarak tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve yok edilmesini sağlamaktadır [38].

Pasif immünoterapi: Bu yöntemde ise immün-bloke edici moleküllerin (PD-1, PD-L1 gibi) inhibisyonu ile mevcut anti-tümör yanıtlarının artırılması hedeflenmektedir. Bu

bağlamda, monoklonal antikorlar, lenfositler ve sitokinler kullanılarak kansere karşı etkin tedavi çalışmaları yürütülmektedir [37].

Hormonal tedaviler; kanser gelişimi sırasında etki gösteren hormonların seviye ve aktivitelerinin değiştirilmesinin hedeflenmesi sonucunda kanser büyümesinin ve gelişiminin durdurulması ve tedavi etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir [39, 40].

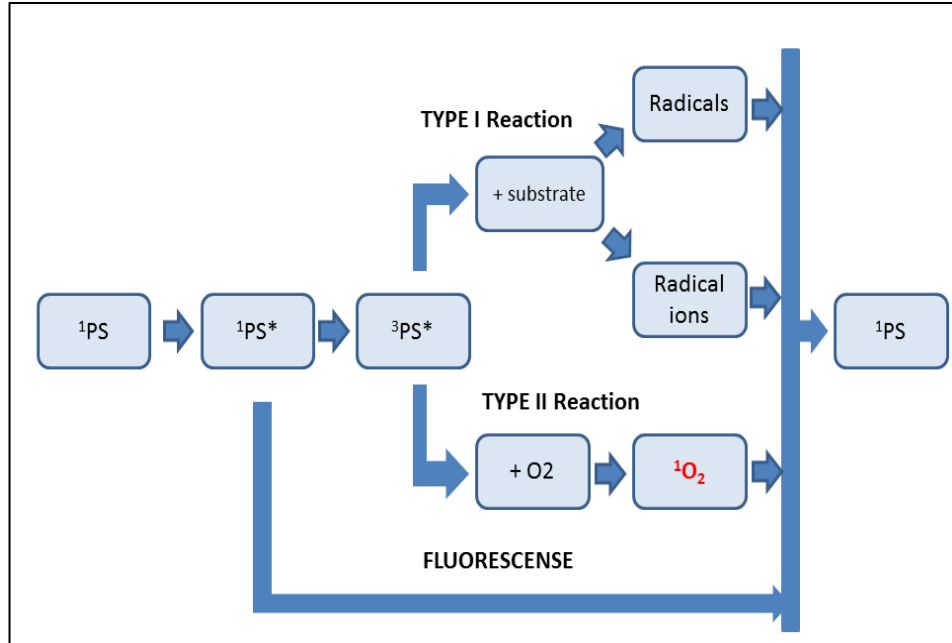
Fotodinamik terapi; toksik olmayan bir fotosensörün normal hücrelere zarar vermeyen bir ışık ile aktif hale getirilmesi sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla hastalıklı hücrelerin öldürülmesine dayanan bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi yöntemi hedefe yönelik olabildiği gibi alternatif tedavi yöntemleri arasında da en çok çalışılan yöntemdir [41, 42].

2.3. Fotodinamik Terapi (Photodynamic therapy: PDT)

Fotodinamik terapi (PDT), normal şartlarda toksik olmayan ve ışık ile uyarılabilen bir fotosensörün (PS) geliştirilmesi ve hücre/dokuya uygulanması temeline dayanmaktadır. PS'yi uyarmak için kullanılan ışık genellikle normal dokulara zarar vermeyecek dalga boyunda seçilmektedir. PS, ışık ile uyarıldıktan sonra aktif hale gelerek reaktif oksijen türevleri üretmektedir [43]. PDT yaygın olarak sivilce, sedef hastalığı ve ateroskleroz dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde de kullanılmaya başlanmış olup baş-boyun, akciğer, mesane ve deri gibi farklı kanser türlerinin tedavisinde başarı ile uygulanmaktadır [42, 44, 45]. PDT'nin kanser dışında kullanımı ile bakteri, mantar ve virüsler dahil olmak üzere birçok mikrobiyal hücrenin de öldürülebileceği gösterilmiştir[46].

Kanser tedavilerinde PDT tek başına bir tedavi seçeneği olarak kullanılabildiği gibi kemoterapi veya radyoterapi gibi farklı yöntemler ile kombine şekilde kullanılarak bu yöntemlere bağlı olarak ortaya çıkan yan etkilerin azaltılması ve etkinliklerinin artırılmasına katkı sağlamaktadır [47]. Bununla birlikte, kanser tedavisi sırasında PS'nin doğrudan kanser dokusunun içerisine verilmesiyle sağlıklı dokularda görülen hasarın en aza indirilmesi bu tedavi yaklaşımının bir diğer avantajıdır [43].

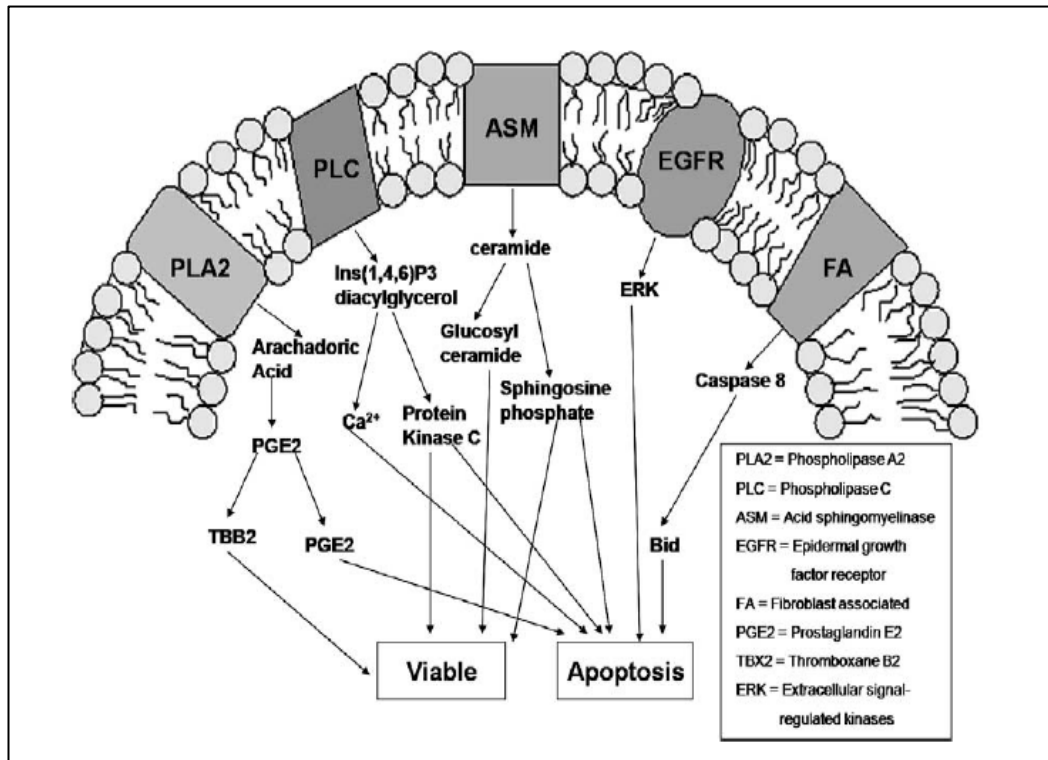
PDT uygulamasının başarıya ulaşması için PS, ışık ve reaktif oksijen oluşumu olmak üzere başlıca üç etmenin dikkatle ele alınması gerekmektedir [48]. PDT uygulaması sırasında uygun dalga boyunda ve normal dokulara zarar vermeyecek şekilde seçilen bir ışıkla aktive olan PS, temel enerji seviyesinden triplet enerji seviyesine geçmektedir. Triplet enerji seviyesinden tekrar temel enerji seviyesine geçerken bu süreçte kazandığı enerjiyi hücre içerisindeki oksijene aktararak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaktadır. ROS oluşumu iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Birinci tip reaksiyonda, triplet halde bulunan PS sahip olduğu enerjiyi hücredeki bir moleküle aktarması sonucunda yüksek reaktif özellik gösteren serbest radikaller oluşur. Tip II reaksiyonlarında ise triplet halde bulunan PS'ler enerjilerini doğrudan moleküler oksijene aktararak singlet oksijenleri oluşturmaktadır (Şekil 2.2). Her iki durum sonucunda da oluşan oksijen türevleri hücre içi yapılarla etkileşerek hasar oluşturmakta ve hasarlı hücreler de apoptoz ya da nekroz sonucunda ölmektedir. En son basamakta da, temel hale dönen PS genellikle ortamda oluşan ROS'lardan etkilenerek ışığa duyarlılığını kaybetmektedir [48-51].



Şekil 2.2: PDT’de ROS oluşum mekanizmaları.

PDT’nin etkinliğini belirleyen önemli faktörlerden bir diğeri de PS’nin hedef dokuda yer alan hücreler ile olan etkileşimidir. Bu etkileşimde PS’nin hücre içindeki

lokalizasyonu temel faktör olup üretilen ROS'un kısa bir yarı ömre sahip olmasından dolayı ancak üretildiği bölgenin çevresinde etki gösterebilir [48, 49, 51]. PS'nin hücre-içi lokalizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda mitokondri, lizozomlar, endoplazmik retikulum, Golgi aparatı ve plazma membranları gibi birçok farklı organelde lokalize olabildiği gösterilmiştir [52]. Hücre-içi lokalizasyonuna bağlı olarak oluşan ROS'lar ortamda bulunan nükleik asitler, lipitler ve proteinler başta olmak üzere birçok biyomoleküllü etkilemektedir. Bu bağlamda PDT'nin apoptoz ve nekrotik yolların yanı sıra hücrede kalsiyum dengesini, lipit metabolizmasını, tirozin kinazların aktivitelerini, bazı transkripsiyon faktörlerinin, hücre adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin ifade düzeylerini değiştirdiği gösterilmiştir (Şekil 2.3) [48, 49] .



Şekil 2.3: PDT'den sonra hücre içinde değişen sinyal iletim yolları[49].

PS'nin hücre-içi lokalizasyonuna bağlı olarak etkilediği moleküller göz önüne alındığında, uygulama alanına göre etkili PS'yi seçerken lokalizasyonunun da dikkate alınması gerekmektedir.

2.3.1. PDT de Fotosensörler ve Işık

Fotosensörler (PS) belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında aktif hale gelen ve enerjisini biyomoleküllere transfer ederek ROS oluşumu sağlayan kimyasal birleşiklerdir [49, 51]. PDT’de kullanılan fotosensörün özellikleri PDT uygulamasının başarıya ulaşmasında belirleyici rol oynamaktadır. Bundan dolayı, PDT uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan bir PS, kimyasal olarak saf olmalı, agregasyon yapmamalı, seçici olarak tümör dokusunu hedeflemeli ve ışıkla uyarılmadığı durumda ise toksik etki göstermemelidir [2, 7].

PDT de ilk olarak Lipson tarafından Hematoporfirin türevleri (HpD) fotosensör olarak kullanılmış ve birinci nesil PS’ler olarak adlandırılmıştır. Ancak, seçici özelliğinin ve tümör dokusundaki aktivasyonunun düşük olması ile uzun süre vücuttan uzaklaşmaması gibi dezavantajlara sahip olmalarından dolayı ftalosiyaninlerin (Phthalocyanine: Pc) de aralarında bulunduğu ikinci nesil PS’lerin sentezlenmesine neden olmuştur [53, 54].

PDT’nin temelinde yer alan PS’nin ışık tarafından uyarılarak aktif hale gelmesi ve ROS üretimine bağlı kanser hücrelerinin yok edilmesinde kullanılan ışığında uygun dalga boyunda ve PS’nin absorpsiyon spektrumunda bulunması gerekmektedir [55, 56]. Bu gereklilikler göz önünde bulundurulduğunda, PS aktivasyonu için kırmızı ya da başka bir deyişle kızılötesi ve uzun dalga boyuna sahip ışıklar kullanılmaktadır [49].

Pc’ler sahip oldukları avantajlardan dolayı PDT çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu avantajlar arasında uzun dalga boyuna sahip (660-700 nm) ışığı absorbe edebilmeleri, karanlıkta toksik etki göstermemeleri, tümör dokusunda seçici olarak birikebilmeleri, yüksek oranda ROS üretebilmeleri ve kararlı yapıya sahip olmaları yer almaktadır [54, 57]. Bununla birlikte, klinik çalışmaları tamamlananan Silisyum Ftalosiyanin (Si(IV)Pc) gibi ftalosiyanin ajanlarının kanser tedavisinde kullanılması bu bileşikler üzerine yapılan araştırmaların artmasına sebep olmuştur [58, 59]. Bundan dolayı bu tez çalışmasında, arjinin ile konjuge edilen Si(IV)Pc türevlerinin antikanser etkileri araştırılmıştır.

2.3.2. PDT'nin Etkilediği Hücre-İçi Ölüm Mekanizmaları

PDT'de ROS oluşumu sonucunda hücre-içerisinde birçok sinyal yolağının değişmesi ile birlikte esas olarak hücre ölümünün indüklenmesi amaçlanmaktadır. Son yıllarda yapılmış olan *in vitro* çalışmalar ile PDT'ye bağlı hücre ölüm mekanizmasının aktivasyonunun PS'nin konsantrasyonuna, fizikokimyasal özelliklerine, hücre içerisindeki lokalizasyonuna, ortamda bulunan oksijen seviyesine ve kullanılan ışığın dalga boyu ile hücre tipine bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir [49].

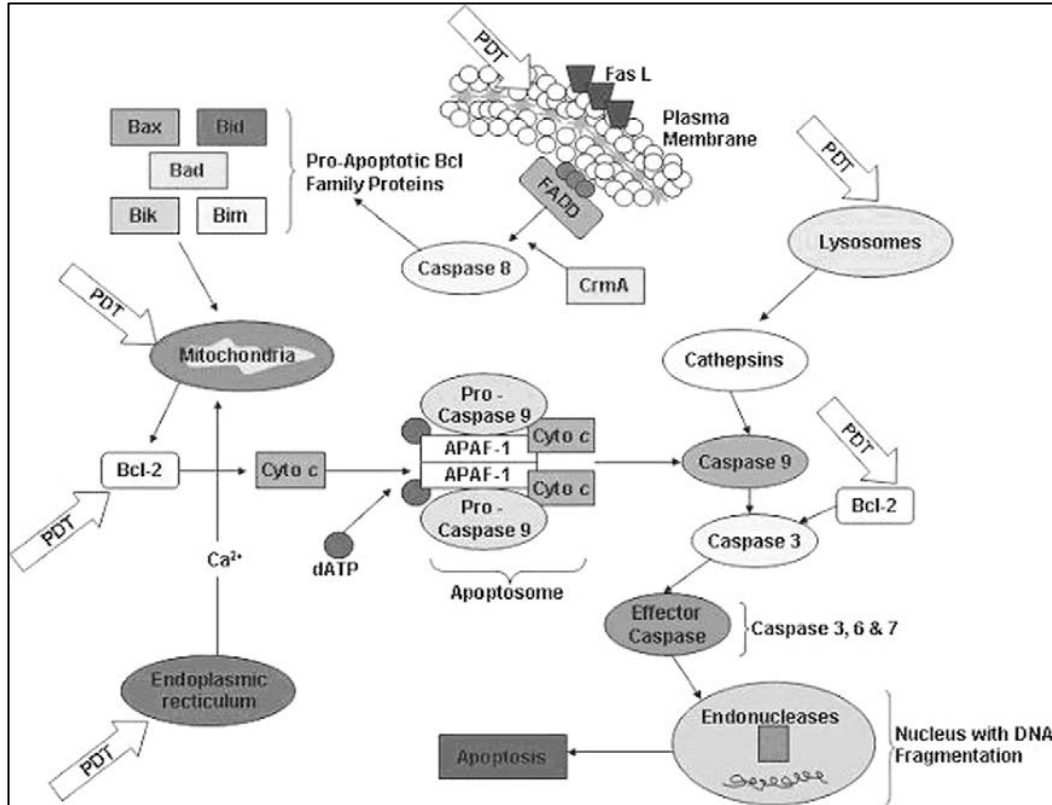
PDT'de iki farklı hücre ölüm mekanizmasının aktive olduğu saptanmıştır; Nekroz ve Apoptoz [4, 48]. Nekroz, bir veya daha fazla hücrenin ya da dokunun hasar görmesi sonucunda gerçekleşen patolojik ölüm olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerin yaşamsal işlevlerini ve bütünlüğünü yitirmesinden sonra nekroz yolu ile ölüm gerçekleşmektedir. Bu süreçte, hücrelerin çekirdekleri eriyerek kaybolurken sitoplazmaları şişerek hücre membranına zarar vermekte ve hücrenin patlamasına sebep olmaktadır. Hücrelerin patlamasıyla sitoplazmik sıvı doku aralığına salınır ve bu da komşu hücrelerde inflamatuvar etki göstererek dokuda inflamasyona sebep olur. Kısaca nekroz, fiziksel veya kimyasal hasardan kaynaklanan ve programlanmamış bir süreç olarak kabul edilmektedir [60]. Nekrotik hücre ölümünün apoptotik hücre ölümünden en önemli farkı programlanmamış olması ve inflamasyona sebep olmasıdır.

Apoptoz ise programlı hücre ölümü olarak bilinen fizyolojik bir olaydır. Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı sinyaller ile aktive olmaktadır. Apoptotik hücre ölümünün başladığı durumlarda hücrenin kromatini ve sitoplazmasının yoğunlaşması ile hücre küçülmeye başlar. Bu süreçte, hücrenin membran bütünlüğü bozulmaz ancak hücre bir süre sonra apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünmektedir [61].

Genel olarak, düşük dozlarda PDT'nin apoptotik hücre ölümüne yol açtığı ve yüksek dozların orantılı olarak daha fazla nekrotik hücre ölümüne neden olduğu düşünülmektedir [62].

PDT'nin hücre-içinde etkilediği moleküller arasında pro-apoptotik Bcl proteinlerinin aktivasyonu yer almaktadır. Literatürde, hücrelerin PDT'ye genel

yanıtını değerlendirmek için Bcl-2 proteinin ifadesine bakılabileceği önerilmektedir [63]. Bcl ailesinin yanısıra *in vitro* PDT uygulanmasının ardından hücre lizatlarında kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ifadesinin arttığı gösterilmiş ve bu da apoptozun bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir [64, 65]. Tüm bu çalışmalarının yanında PDT'ye bağlı apoptoz indüklenmesinde Bax, sitokrom-c ve hücre ölüm reseptörlerinin de rol aldığı saptanmıştır (Şekil 2.4) [49].



Şekil 2.4: PDT sonrası hücrelerde apoptozu yol açan sinyal yollarının incelenmesi. PDT ile üretilen ROS'un başlangıç hedefleri PS'nin lokalizasyonuna bağlı olarak değişmektedir [49].

Apoptoz ve nekrozun ortak başlangıç yollarını paylaştığı ve nihai sonucun aktif bir kaspaz varlığı ile belirlendiği düşünülmektedir [66].

2.3.3. PDT'de Tümör İmha Mekanizmaları

PDT sırasında, PS kan dolaşımına enjekte edildiğinde çeşitli serum proteinlerine bağlanmakta ve PS'nin insan vücudundaki farmako-kinetiği ve biyo-distribüsyonunu

etkileyebilmektedir [49, 67]. PDT ajanı olarak kullanılan PS'nin farmako-kinetik özelliklerinin tümü, aydınlatma parametrelerini doğrudan etkileyebileceğinden beklenen hücre ölümü üzerine etkisini değiştirebilmektedir [49]. İntravenöz olarak enjekte edilen PDT ajanları vücut içinde bir dizi biyo-distribüsyon fazına maruz kalmaktadır [49, 62]. Başlangıçta, ışığa duyarlılaştırıcılar serum proteinlerine bağlanır, sonra ise endotel hücrelerine aktarılır ve damarların duvarlarına bağlanır. Ardından, PDT ajanı hücre dışı matrise bağlanabilir veya tümör hücrelerinin içerisine lokalize olabilir [49, 52, 68].

PS'nin tümör dokusundaki lokalizasyonu ve etkinliği PS'nin verilmesi ve ışınlama arasındaki zaman ve tümörün bulunduğu yer, etrafındaki damarlar, tümörlü dokunun bulunduğu bölgedeki bağışıklık sistemi hücreleri gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir [49].

PDT ile tedavi edilen tümörlerin yıkımına ve kaybolmasına katkıda bulunan üç farklı mekanizma tanımlanmıştır [69]. Bunlardan ilki, tümör hücreleri tarafından alınan PS'nin uyarımı sonucunda üretilen ROS'a bağlı olarak tümör hücrelerinin doğrudan apoptoz ve/veya nekroz ile ölmesidir [4, 50, 70]. İkincisi, PDT 'nin tümörle ilişkili kan damarlarına zarar vermesi ile tromboz ve kanamaya yol açabileceğinden tümör hücrelerinin besin ve oksijen eksikliği nedeniyle ölmesidir [66, 69]. Son olarak, PDT ile tümörde indüklenen sitokinlerin ve stres yanıtının bağışıklık sistemini uyararak tümör hücrelerinin tanınması ve yok edilmesidir [52, 68, 69]. Bu üç mekanizma da birbirini etkileyebilmektedir. Her mekanizmanın genel tümör yanıtı için göreceli önemi henüz tanımlanmamıştır ve bu nedenle daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır [49].

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

EDTA (Merck), Etanol (Riedel de Haen), Metanol (Fischer), DMSO (Fischer Scientific), B-Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Gliserol (Fischer Scientific), Tris (Fischer Scientific), HCL (Fischer Scientific), RNase-ExitusPlus (AmpliChem) ve Aseton (Fischer).

3.2. Cihazlar

-80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer), -20°C Derin Dondurucu (Ariston), +4°C Buzdolabı (Ariston) , Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), RT-qPCR (Applied Biosystem, StepOnePlus), PCR Kabini (Lab Companion), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), Santrifüj (Nüve, NF400), Soğurmali Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs, MX-S), PCR (Biorad, Mj Mini). Laminar Kabin, Class II Tip (PMV Clean Air), Soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Function Line), Soğutmalı Mikrosantrifuj (Beckman Coulter microfuge 22R), Minisantrifüj 96 kuyulu mikroplak rotorlu (Labogene), Mini Western Blot Sistem ve Transfer Tankı (BioRad), Floresan ataşmanlı ters ışık mikroskobu (Nikon TMS), Yatay Mini Jel Sistemi (BioRad), Floresan ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon), Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (Sartorius BL210S), Şarjlı pipetleyici (PipetAid, Biohit Midi Plus), Isıtıcı blok (Denville Scientific), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), Sıvı Azot tankı (Arpege 140), Mikrodalga fırın (Kumtel), Mikrobiyal İzolasyon Kabin (Nüve MN090), Orbital Çalkalayıcı (Denville Scientific), Termal-döngü cihazı (Biometra), Jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), Otoklav (Nüve), Accuri C6 (Becton Dickinson), NanoDrop (Thermo Scientific), Bioruptur Pico (Diagenode), Qubit 3 (Thermo Scientific), LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop (ZEISS), xCELLigence DP (ACEA), LC-122 Işık kaynağı (LumaCare), Thermo Varioskan Flash.

3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler

Hücre kültürü besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco) içerisinde %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco) ve 1X non-essential aminoasit (NEAA) (Gibco) ile zenginleştirilerek kullanıldı. Ayrıca hücrelerin yıkanması ve petriden kaldırılması için hücreler 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ile yıkandıktan sonra 2X Tripsin (Gibco) kullanılmıştır.

HuH-7 insan Hepatosellüler karsinoma (HCC) hücre hattı, HeLa insan rahim ağzı kanseri hücre hattı ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatları yüksek-glukoz içerikli zenginleştirilmiş DMEM besiyerinde büyütüldü.

3.4. Çözelti ve Tamponlar

- 10X PBS: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄·2H₂O 17,8 g, KH₂PO₄ 2,4 g belirli miktarda ddH₂O içerisinde çözünüp pH:7.4'ye ayarlandıktan sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.
- Dondurma Ortamı: %90 FBS ve %10 DMSO.
- 2x Laemmli buffer: 4% SDS, 20% glycerol ve 0.125 M Tris HCl.
- 10X TBS: 30g Tris, 88g NaCl, 2g KCl belirli miktarda ddH₂O içerisinde çözünüp pH:7.5'ye ayarlandıktan sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.
- TBS-T: 1X TBS ve %5 Tween-20.
- Triton-X100 buffer: 50mM Tris-cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% TritonX-100 ve proteaz inhibitörü.
- 4x Yükleme Tamponu: %40 Gliserol, %20 SDS, 800 mM β-merkaptoetanol, 200mM Tris (pH=6.8) ve %0,1 Bromofenol mavi.
- %8'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli: 2,5 ml 1,5M Tris (pH:8,8), 100µl SDS (%10), 2 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 5.5 ml ddH₂O.
- %4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli: 2,5 ml 0,5M Tris (pH:6,8), 100µl SDS (%10), 1 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 6,4 ml ddH₂O.

- Elektroforez Yürütme Tamponu: 25 mM Tris base, 190 mM glycine ve 0.1% SDS ile hazırlanan tamponun pH'ı 8,3 getirilir.
- Transfer Tamponu: 190 mM glycine, 25 mM Tris base, 0.1% SDS ve %10 metanol.
- WB Blocking Solüsyonu: %5 Yağsız süt tozu ve 1X TBS-T.
- IF Blocking Solüsyonu: %2 BSA ve 1X TBS-T.
- 10X Bağlanma Tamponu: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl ve 2.5 mM CaCl₂.

3.5. Primerler

Tez çalışması sırasında kullanılan primerler İontek firması tarafından temin edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: İleri ve geri primer listesi.

	ileri primer (5'-3')	geri primer (5'-3')
CD90	GTCCTTTCTCCCCAATCTC	ACGAAGGCTCTGGTCCACTA
EpCAM	GGATCTGGATCCTGGTCAAAC	GCTATCACCACAACCACAATAAC
Snail	CTCTAGGCCCTGGCTGCTAC	TGACATCTGAGTGGGTCTGG
ZEB1	GATCAAAGACATGTGACGCAG	TGTGTGAGCTATAGGAGCCAG
BRCA1	GGAATCAGCCTCTTCTCTGATG	TGCAGAGGTTGAAGATGGTATG
ABCC1	CAAGTCATCCTTGCTCTCTAC	CACCTGATACGTCTTGGTCTT
CK19	CCGCGACTACAGCCACTACT	AGAGCCTGTTCCGTCTCAAA
CEACAM6	ATGTGCCAAGCCCATAACTC	GTCTGGTCCAATCTGCCAGT
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA

3.6. Antikorlar, Boyalar ve Ftalosiyenin Maddeleri

Western blot antikorları; β -actin (Cell Signaling, 1/5000), PARP (Cell Signaling, 1/1000), ERK (Cell Signaling, 1/1000), p-ERK1/2 (Cell Signaling, 1/1000), AKT (Cell Signaling, 1/1000), p-AKT (Cell Signaling, 1/1000), Antimouse-HRP ve antirabbit-HRP sekonder antikorlar (Cell Signaling, 1/4000).

Akım Sitometresi Antikorları; AnnexinV-APC (BD), 7ADD (Miltenyi Biotech).
Boyalar; Kristal Viole (BD), DAPI (Thermo Scientific) , TMRE (Thermo Scientific),
Cell mask (Thermo Scientific), H2AX Alexa-593 (Biolegend).

3.7. Kitler

NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, ABD), High-Capacity cDNA
Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, ABD), Maxima Cybergreen Master Mix
(Thermo Scientific, ABD), Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü

Kullanılan hücre hatları sıvı azot tankından çıkartılıp oda sıcaklığında eritildikten sonra üzerlerine yavaşça 5 mL %10 Fötal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 non-essential aminoasit ile desteklenen yüksek-glukoz içeren DMEM besiyeri eklendi ve 400 g'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildikten sonra hücre pelleti besiyeri ile çözülerek 60mm'lik kültür petri kabınlarına ekim yapıldı. Hücreler büyümesi için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

100 veya 60 mm kültür petri kablarında bulunan hücreler haftada iki kez pasajlanarak çoğaltıldı. Kısaca, hücreler Petrinin %80-90'ını kapladıklarında besiyeri aspire edilip 1X PBS eklenerek yıkandıktan sonra 2X tripsin eklendi ve inkübatörde 3 dk tutularak hücrelerin kültür petri kabının yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Hücre pasajı ihtiyaca ve hücre türüne bağlı olarak 1/2 - 1/6 dilüsyonlarında yapıldı.

4.2. Hücre Stoklarının Oluşturulması

Hücreler stok yapma amacıyla dondurularak saklandı. Petri kapının %80-90'nını kaplayan hücreler tripsinle kaldırıldıktan sonra 400 g'de 5 dk santrifüjlendi. Sonra üst sıvı aspire edildi ve hücre pelletinin üzerine hücre dondurma ortamı eklendi. 2ml kriyo tüplerde hücreler önce -80°C derin dondurucuya alınıp bir gün bekletildikten sonra uzun süre saklanmaları için sıvı azot tankına aktarıldı.

4.3. Fonksiyonel Analizler

Fitolasiyanin türevli maddelerin HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri ışık varlığında ve yokluğunda değerlendirildi. Bundan dolayı her deney için aydınlık (light) ve karanlık (dark) olarak iki ana grup oluşturuldu.

Fitolasiyanin türevi maddeler öncelikle DMSO içerisinde çözülerek 10 mM konsantrasyonunda bir ana stok oluşturuldu. Daha sonra ise deneylerde kullanılmak üzere bu ana stok DMEM besiyeri ile seyreltilerek 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında hücrelere uygulandı.

4.3.1. Hücre Proliferasyonu Analizi

HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücre hatları kuyu başına 1×10^4 olacak şekilde ekilerek 24 saat boyunca büyütüldü. *Pc5a* ve *Pc4a*'nın hücrelere 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Daha sonra 2 Jcm^{-2} ışık ile uyarıldığı (Light) ve uyarılmadığı (Dark) şartlarda hücre proliferasyonları üzerindeki etkisi 72 saat boyunca xCELLigence cihazı ile gerçek zamanlı olarak incelendi.

Farklı zaman aralıklarındaki “normalize hücre indeksi” değerleri kullanılarak hücrelerin proliferasyon yeteneklerindeki değişikliklerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism6 programı ile t-testi kullanılarak yapıldı ve grafikler elde edildi.

Işık kaynağı olarak, non-coherent (lazer olmayan, ışığı doğrusal olarak vermeyen) LumaCare Model LC-122 cihazı kullanıldı. Cihaz, 100 W gücünde ışık verebilen kuartz halojen bir lamba, kontrol paneli, güç kaynağı ve 400-800 nm dalga boyu aralığındaki ışık için uygun filtreye sahip değiştirilebilir FOP'lardan (Fiber Optic Probe-FOP) oluşmaktadır. FOP'lar ışığın dalga boyuna bağlı olarak 20 mW.cm^{-2} 'den 1.0 W/cm^2 'ye kadar güç yoğunluğu sağlayabilmektedir. Işık kaynağı olarak LumaCare Model LC-122'nin kullanıldığı uygulamalarda, PDT ajanı için aktivasyon dalga boyuna uygunluk gösteren FOB kullanılacaktır. Işık kaynağından gelen ışığın güç yoğunluğu (Watt/cm^2), silikon detektöre sahip bir güç ölçer (Powermeter-OPHIR) ile belirlenmiştir. Işık uygulanan yüzeydeki güç, yüzeyin farklı bölgelerinden elde edilen güç değerlerinin ortalamalarının alınmasıyla elde edilecektir. Yüzeydeki ortalama ışık gücünün belirlenmesinin ardından 2 Jcm^{-2} enerji yoğunluğu için hücrelerin ışığa maruz kalacağı süre:

$t = P \backslash E$ formülüyle hesaplandı. Burada t, zaman (dakika); P, güç (Watt); E ise enerji (Joule) dir.

2 Jcm⁻²'nin üzerindeki enerjilerde, hücreler için optimal büyüme koşullarına uygun olmayan ortamda bulunma süresi artacağından, bu tez çalışmasında PDT uygulamalarında 2 Jcm⁻² ışık enerjisi kullanılarak deneyler gerçekleştirildi.

4.3.2. Hücre Canlılığı Analizi

HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücreleri kuyu başına 7.5x10³ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat sonra 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında *Pc5a* içeren besiyeri ile eski besiyerleri değiştirilerek 24 saat inkübe edildi. Sonra *Pc5a* içeren besiyerleri uzaklaştırılıp taze besiyerleri eklenerek aydınlık gruba dahil olan plakalar 2 Jcm⁻² ışık ile uyarıldı. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılarak yavaşça PBS ile yıkandıktan sonra hücreleri fikse etmek için her bir kuyuya 500 µl %4 formaldehit eklendi ve 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile yıkanan fikse edilmiş hücrelerin üzerine 300 µl %1 Kristal viole eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra ortamdaki boya uzaklaşana kadar plakalar distile su ile yıkandı. Kuruyan plakaların fotoğrafları Azur 600 görüntüleme sistemi kullanılarak çekildi. Fotoğraflama işleminin ardından, hücrelerdeki kristal violeyi çözmek için %10 metanol %10 acetic-asid ve %80 su içeren çözücü hazırlanarak her kuyuya 200 µl eklendi. Daha sonra her bir kuyudan 100 ul alınarak 96-kuyucuklu plakaya aktarıldı ve OD 590 nm de Thermo Varioskan Flash cihazında okutuldu.

4.3.3. Hücresel Alım

HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 2.5x10⁵ hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 µM *Pc5a* içeren besiyeri ile değiştirilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanarak 2X tripsin ile kaldırıldı. 2000 g'de +4 °C 5 dakika santrifüjlenek hücre pelleti elde edildi. Ardından hücre pelleti bir kez PBS ile yıkanarak çöktürüldü. Pelletlerin üzerine 500 µl DMSO eklenip iyice vortekslendikten sonra Bioruptor Pico (Diagenode) ile 30-sec-on/30-sec-off olacak şekilde 10 döngü sonike edildi. Sonikasyondan sonra 10.000 rpm de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj yapıldı ve üst-sıvılar başka ependorfa aktarıldı. Elde

edilen üst-sıvıların her birinden 150 µl alınarak 96 kuyulu siyah plate (Thermo Scientific™ Black 96-Well Plates) aktarıldı. Örneklerin floresans şiddeti 690-700 nm de Thermo Varioskan Flash cihazında kullanılarak ölçüldü.

4.3.4. Apoptozun Belirlenmesi

Akım Sitometresi ile

HUH-7 ve HeLa hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücrelerin besiyeri 10 µM konsantrasyonlar da *Pc5a* içeren besiyeri ile değiştirildi. Ertesi gün *Pc5a* içeren besiyerleri uzaklaştırılarak her kuyuya taze besiyeri eklenip aydınlık gruplar 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldıktan sonra 24 saat büyütölmeye devam edilirdi. 24 saat sonra hücreler toplandı ve santrifüj işleminin ardından 4 mM EDTA solüsyonu ile 10 dk inkübe edilerek hücre kümelerinin birbirinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanarak 300 g'de 5 dk santirüjlendi. Hücreler mL'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde 1X bağlanma tamponunda çözüldü ve 100 µl hücre 5 µl AnnexinV-APC (BD, ABD) ve 5 µl PI (BD, ABD) ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Apoptotik ve canlı hücre hücre yüzdesi Accuri C6 akım sitometresi cihazı incelendi.

Western Blotlama ile

Pc5a'nın pro-apoptotik etkilerini incelemek amacıyla HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücre hatları 60 mm kültür kaplarına ertesi gün %70-80 dolulukta olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücrelere 10 µM *Pc5a* eklenerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından *Pc5a* içeren besiyerleri taze besi yerleri ile değiştirilip aydınlık grup 2J ışığa maruz bırakıldı ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra tripsin ile kaldırılarak western blot ile kesilmiş PARP proteini ifadesine bakıldı.

10 µM *Pc5a* uygulanan hücre hatlarında protein ifadesinin belirlenmesi amacıyla total protein lizatları elde edildi.

Kısaca pelletlerin üzerine 2x Laemmli buffer eklenerek vortexlendikten sonra buzda 20 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Bioruptor Pico (Diagenode) cihazı kullanılarak 30-saniye-on/30-saniye-off olacak şekilde 6 döngü sonike edildi. Son olarak örnekler 14000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk santrifüjlenerek üst-sıvı kesimi yeni bir ependorfa aktarılıp protein lizatı olarak -20°C 'de saklandı.

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlendi. 40 µg protein 4x yükleme tamponu ile karıştırılarak 10 dakika 90°C' de inkübe edilerek yüklemeye hazır hale getirildi. Örnekler %10'luk SDS-PAGE jele yüklendikten sonra üst jelden geçene kadar 80 V'ta devamında ise 120 V'ta yürütüldü. Proteinleri PVDF membrana aktarımını sağlamak için TransBlot (Biorad) cihazı yüksek moleküler ağırlığı programında, 30 dk kullanıldı. Membranlar %5 Tween-20 içeren yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Bloklanan membranlar primer antikorlar ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Membranlar 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandıktan sonra uygun sekonder antikorlar ile 1,5 saat inkübe edildi. Ardından 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkanan membranlara Amersham ECL Select (GE Healthcare) kemilüminesan substratı uygulanarak proteinler Görüntü Analiz Sisteminde (Biorad) fotoğraflanarak dosyalandı.

4.4. Konfokal Hücre Görüntülemesi

İlk olark *Pc5a*'nın hücre içerisine girdiği gösterildi. Ardında *Pc5a*'nın mitokondri membran potansiyeli ve DNA hasarı üzerindeki etkileri konfokal mikroskopu kullanılarak analiz edildi.

4.4.1. Hücre-içi Ftalosiyanın Türevlerinin Görüntülenmesi

6-kuyucuklu plakalara steril edilmiş lameller yerleştirildikten sonra kuyu başı 2.5×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 µM *Pc5a* içeren besiyerleri ile değiştirildi. 24 saatlik inkübasyonun sonunda önce *Pc5a* içeren besiyerleri taze besiyeri ile değiştirildi ve aydınlık gruba dahil olanlar 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. 24 saat sonra slaytlar chamber glasslara yerleştirildi. Slaytların üzerine 1 mL DMEM eklendi. Ardından chamber glassların üzeri bir lamel ile kapatıldı. Hazırlanan örnekler Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.4.2. DNA Kırığı Analizi

Pc5a'nın HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı H2AX boyaması ile gösterildi. 6-kuyucuklu plakalara steril edilmiş lameller yerleştirildikten sonra kuyu başı 2.5×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri $10 \mu\text{M}$ *Pc5a* içeren besiyerleri ile değiştirilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda önce *Pc5a* içeren besiyerleri taze besiyeri ile değiştirildi ve aydınlık gruba dahil olanlar 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. 24 saat sonra hücreler 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra %2 Paraformaldehit (PFA) ile 10 dakika fikse edildi. Ardından 3 kere PBS ile yıkanan hücreler önce %0,5 TritonX-100 içeren PBS ile 10 dakika inkübe edildikten sonra %2 BSA-PBS ile 60 dakika oda sıcaklığında blokladı. Bloklama işleminin ardından, hücreler $2 \mu\text{g}$ H2AX- Alexa 594 antikoru ile 2 saat inkübe edildi. Ardından 3 kere PBS ile yıkanan örnekler 15 dakika DAPI (1:1000) solüsyonu içerisinde inkübe edildi. Son olarak sırasıyla birer kere PBS ve distile su ile yıkanan örnekler sabitleme ajanı (%80 gliserol) yardımıyla lam üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Hazırlanan slaytlar Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.4.3. Mitokondri Potansiyelinin Analizi

Pc5a'nın mitokondri potansiyeli üzerindeki etkisi Tetrametilhodamin, etil ester (TMRE) boyaması ile gösterildi. 6-kuyucuklu plakalara steril edilmiş lameller yerleştirildikten sonra HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücreleri kuyu başı 2.5×10^5 olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri $10 \mu\text{M}$ *Pc5a* içeren besiyerleri ile değiştirilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda önce *Pc5a* içeren besiyerleri taze besiyeri ile değiştirildi ve aydınlık gruba dahil olanlar 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. 24 saat sonra slaytlar chamber glasslara yerleştirildi. Slaytların üzerine DMEM ile 1,5X'e seyreltilen Cell Mask dan 1 mL eklendi ve 10 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından 2 kez PBS ile yıkanan slaytların üzerine DMEM ile seyreltilmiş 1X TMRE boyasından 1mL eklenerek 20 dk inkübatörde bekletildi. 20 dakikanın ardından chamber glassların üzeri bir lamel ile kapatıldı. Hazırlanan örnekler Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.4.4. Pc5a Uygulanan Hücrelerin Gen İfadesi Analizleri

Gen ifadesi analizleri için öncelikle HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücreler ertesi gün %70-80 dolulukta olacak şekilde 60 mm petri kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelerin besiyerleri 10 μ M *Pc5a* içeren besiyeri ile değiştirilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelere taze besiyeri verildi ve aydınlık gruba dahil olanlar 2 Jcm⁻² ışığa maruz bırakılarak yine 24 saat inkübe edildi. Hücreler 2xTripsin ile kaldırılarak pelletleri -80 °C de saklandı.

4.4.5. RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, hücre pelleti RE buffer ile çözüldükten sonra hücreler lizis tamponu kullanılarak ile lizis edildi. Lizis işleminin ardından filtrelendi ve RNA-bağlama solüsyonu eklenerek total RNA'yı tutacak olan kolondan geçirildi. Daha sonra kolon yıkama solüsyonları ile yıkandı ve yüksek saflıkta RNA elde etmek için elüsyon 30 μ l dH₂O kullanılarak yapıldı.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflıkları OD 260/280 de NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80°C derin dondurucuda saklandı.

İzole edilen total RNA örnekleri, 65°C'de 5 dakika inkübe edilerek buza alındı. Örnekler 6X DNA yükleme boyası ile son hali 2X olacak şekilde karıştırılıp %2'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu kullanılarak yürütüldü. Jelde yürütülen nükleik asitler, ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

4.4.6. cDNA Sentezi

RT-qPCR analizi için izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, ABD) kiti kullanılarak üretici firmanın

talimatlarına uygun olarak yapıldı. Kısaca, her 20 µl reaksiyon için 2 µg total RNA kullanıldı. İlk olarak 2X RT master karışımı Tablo 4.1 de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 4.1: 2X RT master karışımı.

10X RT tampon	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	2 µl
dH ₂ O	4.2 µl
Toplam hacim	10 µl

Hazırlanan 2X RT master karışımından 10 µl alınarak içerisinde 10 µl total RNA örneği (2 µg total RNA) bulunan PCR tüpüne aktarıldı. Finalde hacmi 20 ul olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirilerek kitin belirttiği döngü şartlarında cDNA sentezi yapıldı. (Tablo 4.2). PCR işleminin ardından sentezlenen cDNA'lar, -20°C derin dondurucuda saklandı.

Tablo 4.2: cDNA sentezi için gerekli olan PCR döngü şartları.

	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dk)	10	120	5	∞

4.4.7. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi

Gen ifadesi değişimlerini kantitatif olarak belirleyebilmek için 40 ng cDNA, 2X master mix, primerler ve nuclease-free dH₂O kullanılarak 20 µl'lik RT-qPCR reaksiyon hacmi hazırlandı (Tablo 4.3). RT-qPCR reaksiyonu Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak Kitin önerdiği döngü şartlarında gerçekleştirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

2X master mix	10 µl
İleri primer (125 mM)	0,25 µl
Geri primer (125 mM)	0,25 µl
cDNA (40 ng)	2 µl
NF dH ₂ O	7.5µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 4.4: RT-qPCR döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 döngü	95	10 dk
45 döngü	95	20 sn
	60	30 sn
	72	30 sn
Erime eğrisi	55 - 95	0.1 sıcaklık değişiminde ölçüm

Gen ifadesi analizleri *ddCt* formülü ile internal kontrol olan *GAPDH*'a göre normalize edilerek hesaplandı.

$$ddCt = E_{gen}^{dCt_{gen}(kalibratör-örnek)} / E_{norm.}^{dCt_{norm.}(kalibratör-örnek)} \quad (4.1)$$

$$\text{Relative ekspresyon} = \log_2(ddCt) \quad (4.2)$$

qRT-PCR reaksiyonu duplike yapılmış ve deneyler 2'şer kez tekrarlanmıştır.

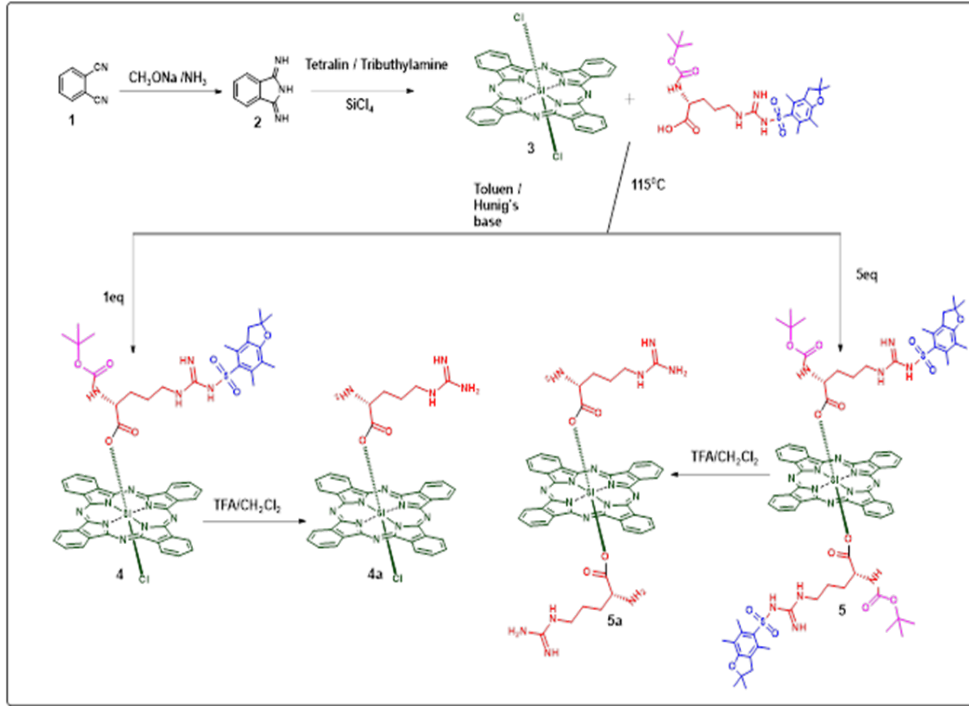
4.5. İstatistiksel Analizler

Görüntü analizleri ImageJ programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler de GraphPad Prism 6 programında Student's t-test yapılarak gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1. Ftalosiyenin Türevlerinin Sentezi

Önerilen tez çalışmasında kullanılan *Pc4a* ve *Pc5a* PDT ajanları Doç. Dr. Meltem GÖKSEL ŞAHİN tarafından sentezlenmiştir. Bu ajanların sentezlenmesi için ikinci nesil fotosensör olan silicon(IV) phthalocyanine (Pc4) kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan PDT ajanlardan *Pc4a*, Pc4'e bir tane arjinin eklenmesi ile *Pc5a* ise Pc4'e iki tane arjinin eklenmesi ile elde edilmiştir (Şekil 5.1).

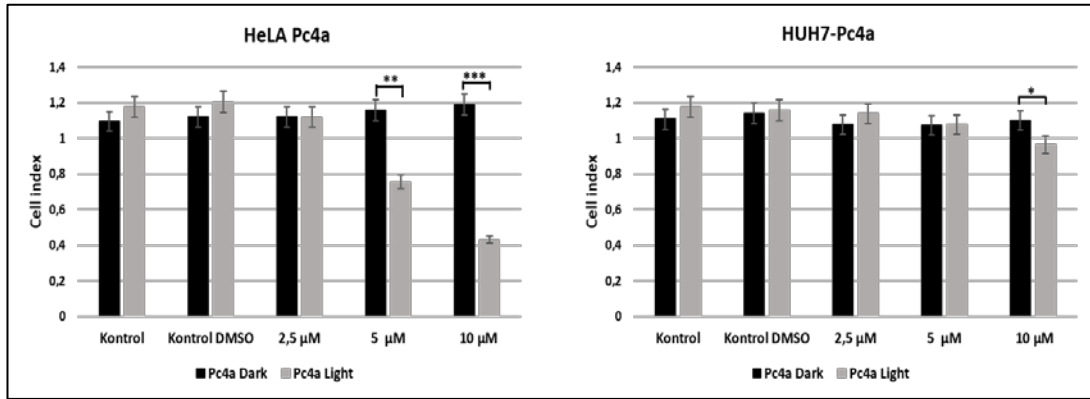


Şekil 5.1: *Pc4a* ve *Pc5a* maddelerinin yapısı

5.2. Ftalosiyenin Türevlerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

5.2.1. *Pc4a*'nın Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Pc4a'nın HeLa (insan rahim ağzı kanseri hücre hattı) ve HuH-7 (Hepatoselüler karsinoma hücre hattı) hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi kullanılarak araştırıldı (Şekil 5.2). Analiz sonuçlarına göre 5 ve 10 μM *Pc4a* 2 Jcm^{-2} ışık ile uyarıldığı zaman (Light) HeLa hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azaldığı HUH-7 hücre hattında ise sadece 10 μM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı.

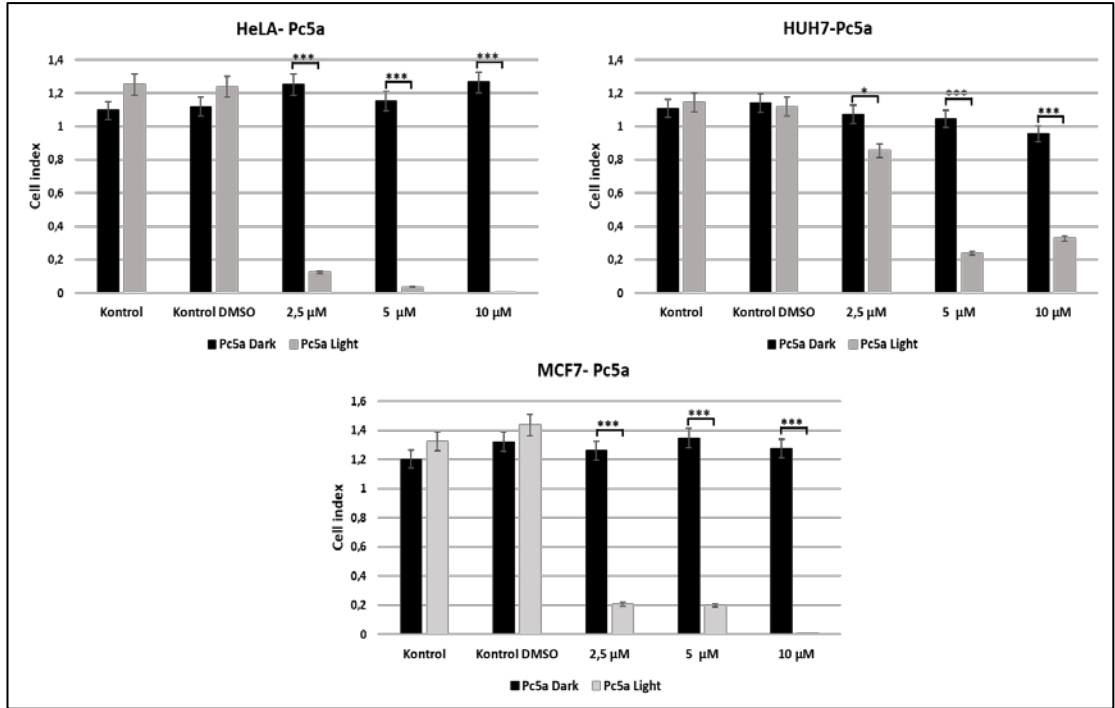


Şekil 5.2: *Pc4a*'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin xCELLigence analiz sistemi ile incelenmesi. *Pc4a* 0, 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında HeLa, HU7 ve MCF-7 hücrelerine verildikten 24 saat sonra aydınlık grup 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. Işık verme işleminden 24 saat sonra hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler dark ve light olarak her bir konsantrasyon için karşılaştırıldı. Kontrol: Sadece DMEM de büyütülen, Kontrol-DMSO: 1:1000 oranında DMSO içeren DMEM de büyütülen hücreler ($p = * < 0.05$, $** < 0.001$, $*** < 0.0001$).

xCELLigence sonucuna göre *Pc4a*'nın 10 μM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu etkilediği saptanmış olmasına karşın apoptoz analizlerinde beklenen etki saptanamadığı için tez çalışmasının devamında *Pc4a* kullanılmamıştır.

5.2.2. Pc5a'nın Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Diğer bir Ftalosiyanin türevi olan *Pc5a*'nın HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi xCELLigence cihazı ile gerçek zamanlı olarak incelendi. xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi sonuçlarına göre HeLa ve MCF-7 hücre hatları 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında *Pc5a* ile muamele edilip 2 Jcm^{-2} ışık ile uyarıldığında tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı. HUH-7 hücre hattı için ise 5 ve 10 μM da hücre proliferasyonunun önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.3).



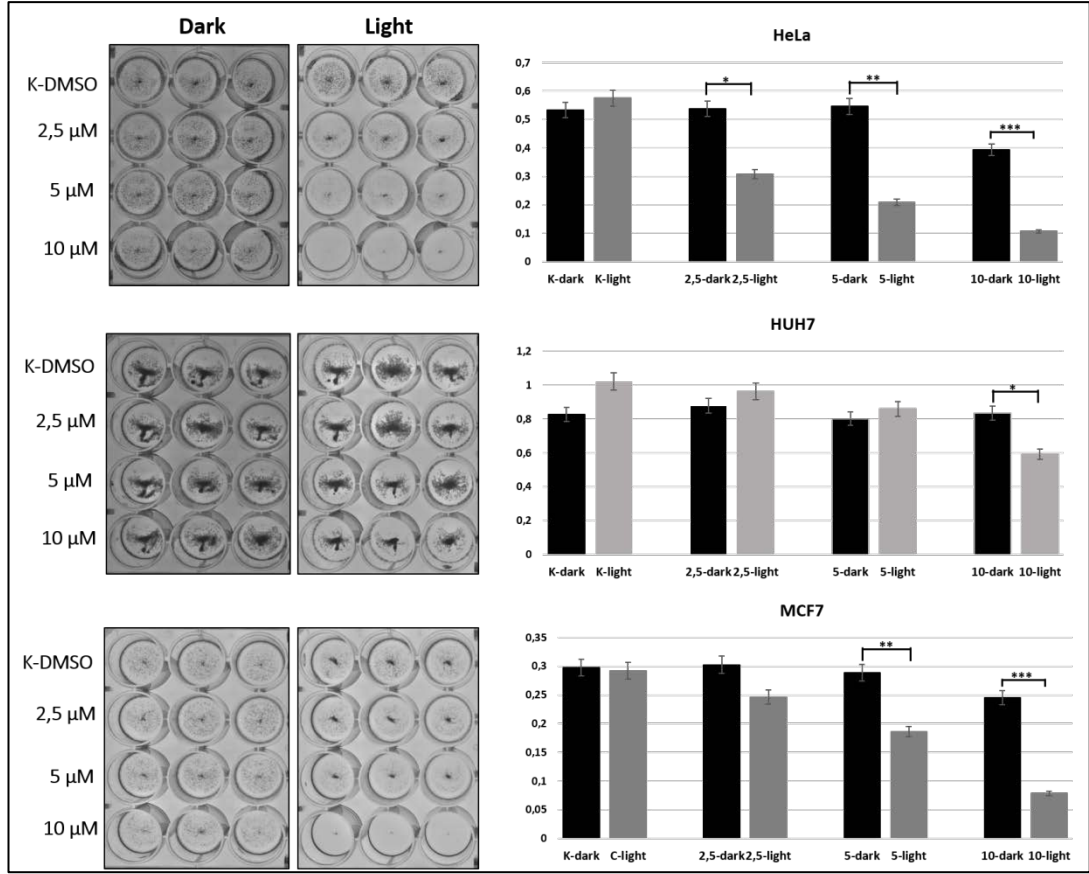
Şekil 5.3: *Pc5a*'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin xCELLigence analiz sistemi ile incelenmesi. *Pc5a* 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında HeLa, HU7 ve MCF-7 hücrelerine verildikten 24 saat sonra aydınlık grup 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. Işık verme işleminden sonra 24 saat sonra hücre proliferasyonunda meydana gelen değişimler dark ve light olarak her konsantrasyonda karşılaştırıldı. Kontrol: sadece DMEM de büyütülen, Kontrol-DMSO: 1:1000 oranında DMSO içeren DMEM de büyütülen hücreler ($p = *$ <0.05, $**$ <0.001, $***$ <0.0001).

Bu bulgular ışığında, her 3 hücre hattında da *Pc5a*, 5 ve 10 μM konsantrasyonda kullanılıp 2 Jcm^{-2} ışık ile uyandırıldığı zaman hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir.

5.3. Ftalosiyanin Türevinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

xCELLigence ile hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelenen *Pc5a*'nın hücre canlılığı üzerine etkisi koloni oluşturma kapasitesine dayanan kristal viyole testi ile incelenmiştir. HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücre hatlarına 0, 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonların da *Pc5a* verildikten 24 sonra hücreler ışık verilmiş (light) ve ışık verilmemiş (dark) şartlarda 48 saat büyütüldü ve hücre canlılığı kristal viyole boyaması ile görüntülendi (Şekil 5.4). Kristal viole ile boyanan hücrelerin fotoğraflarına ve OD (optic density) sonuçlarına göre *Pc5a*'nın ışık varlığında tüm konsantrasyonlarda HeLa hücrelerinin canlılığını büyük ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. MCF-7 ve HUH-7 hücre hatlarında ise özellikle 10 μM *Pc5a* uygulanıp ışık ile uyarılan hücrelerin canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır.

Pc5a ile yapılan hücre proliferasyonu ve hücre canlılığı deneylerinin sonucu birlikte değerlendirildiği zaman 10 μM konsantrasyonunun her üç hücre hattı için de en etkin doz olduğu saptandı. Bundan dolayı, çalışmanın devamında hücrelere 10 μM *Pc5a* uygulanarak deneyler gerçekleştirildi. Ayrıca hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine etkisinin hücre-içine alınmasından mı yoksa hücreler arası ortamda ürettiği ROS'lar aracılığıyla olduğunun incelenmesi için *Pc5a* ile hücre-içerisine alım deneyleri yapıldı.

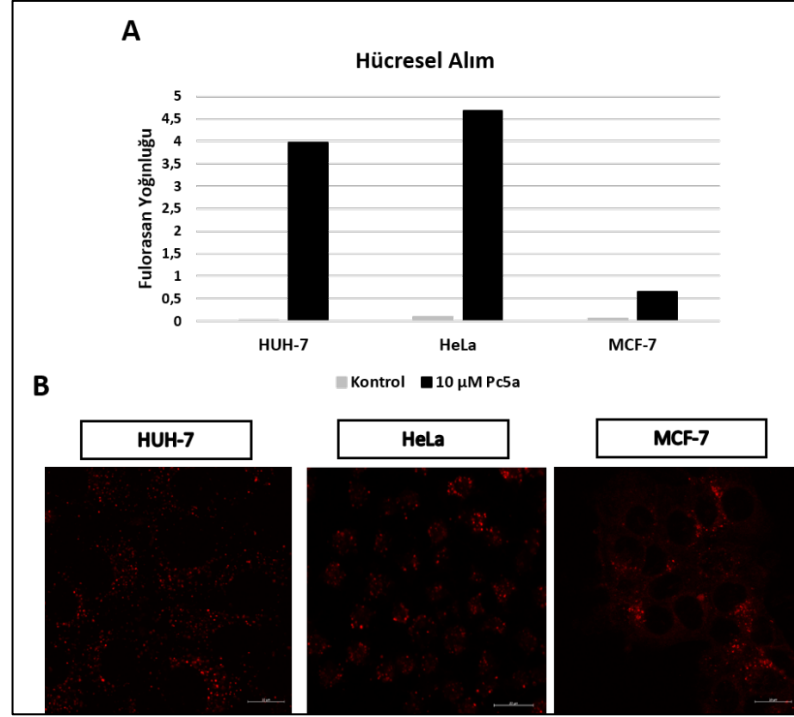


Şekil 5.4: *Pc5a*'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin ışık verildiği ve vermediği durumlarda kristal viole gösterilmesi. HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücre hatlarına 0, 2.5, 5 ve 10 µM *Pc5a* uygulandıktan 24 saat sonra light grup 2 Jcm⁻² ışık ile uyarıldı. Bu işlemten 48 sonra hücre canlılığı kristal viole analizi ile test edilerek kristal viyole ile boyanmış hücreler Azur600 da fotoğraflandı. Daha sonra, kuyulardaki kristal viyole metanol ile çözüldükten sonra hücre gruplarındaki kristal viyole yoğunluğu Thermo Varioskan Flash görüntüleme sistemi ile OD 590 nm de belirlendi. K-DMSO: 1:1000 oranında DMSO içeren DMEM de büyütülen hücreler. Her grup kendi içerisinde dark ve light olarak karşılaştırıldı ($p = * < 0.05$, $** < 0.001$, $*** < 0.0001$).

5.4. Ftalosiyanın Türevinin Hücre-içine Alınmasının Gösterilmesi

Pc5a'nın hücre-içine alınabildiği hem florometrik olarak hem de konfokal görüntüleme ile araştırıldı. 10 µM *Pc5a* HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücrelerine uygulanıp 24 saat beklendikten sonra analizler gerçekleştirildi (Şekil 5.5). Florometrik ölçüm sonuçları madde verilmemiş kontrol hücrelerine göre artan floresan yoğunluğundan *Pc5a*'nın HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücrelerinin içerisine alındığını gösterdi (Şekil 5.5a). *Pc5a*'nın hücre içersine alınması konfokal görüntüleme ile de incelendi. Bu analiz

sırasında canlı hücre görüntüleme yöntemi kullanıldı. *Pc5a* hücrelere verildikten 24 saat sonra hücreler yıkandı ve chamber glass içerisinde görüntüler alındı. Konfokal görüntüleri analiz edildiğinde ise *Pc5a*'nın bütün hücre hatlarında, hücrenin içerisine girebildiği tespit edilmiş olup florometrik ölçüm sonuçları da doğrulanmıştır (Şekil 5.5b).

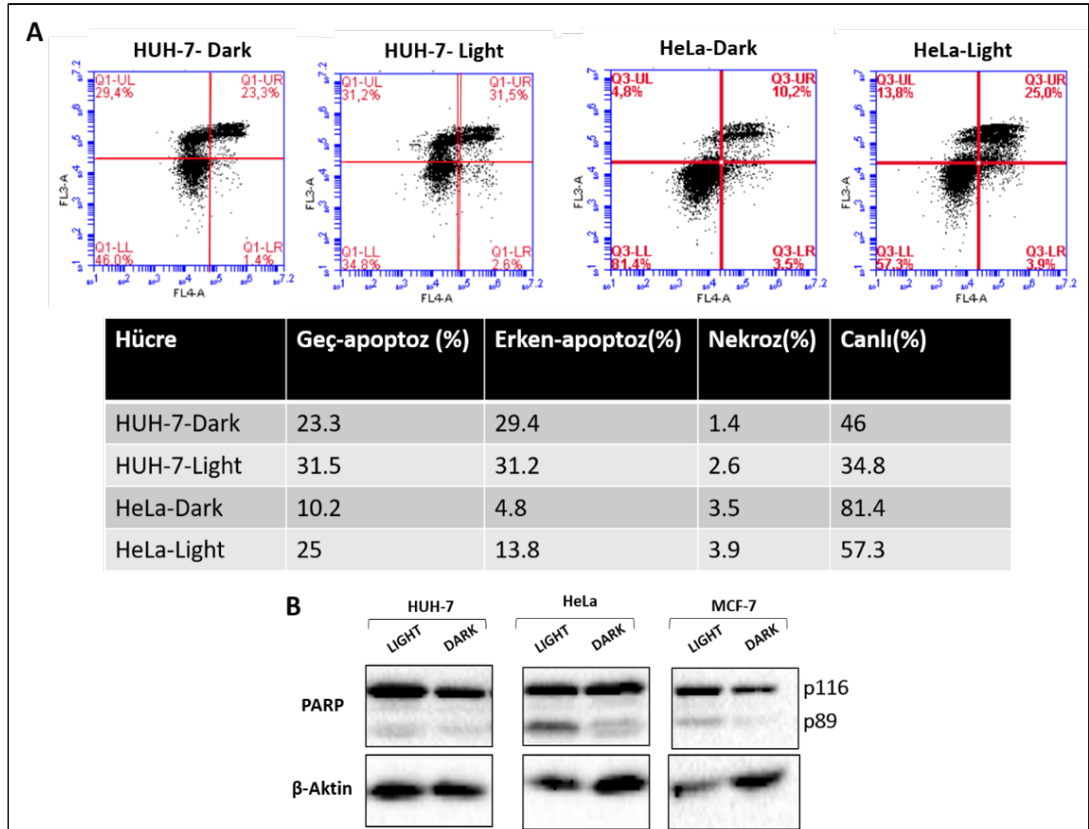


Şekil 5.5: *Pc5a*'nın hücre içerisine alındığının gösterilmesi. A) HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerine 10 µM *Pc5a* verildikten 24 saat sonra hücreler DMSO ile patlatıldı ve hücre içerisindeki *Pc5a*'nın florasan yoğunlukları 690\700 nm de Thermo Varioskan Flash ile ölçüldü. B) HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerine 10 µM *Pc5a* uygulandıktan 24 saat sonra hücreler canlı hücre görüntüleme yöntemi ile konfokal mikroskopta görüntülendi. *Pc5a*: 633 nm lazer ile uyarıldı ve 650-720 nm filtre aralıklarında görüntülendi.

Fluometrik ölçüm sonuçlarına göre *Pc5a*'nın hücelere farklı miktarlarda alındığı ve en çok HeLa hücrelerinde biriktiği görülmektedir. Bununla birlikte konfokal mikroskop ile yapılan canlı hücre analizi sonucunda hücre çekirdeği yani nükleus çoğunlukla hücrelerin ortasında siyah bir boşluk şeklinde görülmekte ve *Pc5a*'da nükleusun çevresinde yaygın boyama göstermektedir. *Pc5a*'nın hücre içerisine alındığı başarılı bir şekilde gösterildikten sonra *Pc5a*'nın etkilediği hücre fonksiyonları daha ayrıntılı bir şekilde incelendi.

5.5. Ftalosiyanin Türevinin Apoptotik Etkisi

10 μM *Pc5a*'nın apoptoz üzerine etkisi akım sitometresi kullanılarak AnnexinV-7AAD boyamasıyla ve western blotlama tekniği ile PARP kesimi üzerinden incelendi. Akım sitometresi analizleri HeLa ve HuH-7 hücreleri ile gerçekleştirildi. 10 μM *Pc5a* uygulanan hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra iki gruba ayrıldı ve bu gruplardan bir tanesi 2 Jcm^{-2} ışık ile uyarılırken diğer grup herhangi bir uyarıya maruz bırakılmadı. Bu işlemten 24 saat sonra apoptotik, nekrotik ve canlı hücre yüzdeleri AnnexinV-7AAD boyaması ile belirlendi. Akım sitometrisi sonuçlarına göre 10 μM *Pc5a* uygulamasının sonucunda karanlık ve aydınlık koşullarda canlı hücre oranları karşılaştırıldığında HUH-7 için ışık varlığında Annexin V⁺ / 7ADD⁺ canlı hücre oranında anlamlı bir azalma saptanmadı. Fakat HeLa hücre hattında ışık varlığında canlı hücre oranının yaklaşık %30 azaldığı saptandı (Şekil 5.6a). Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA ipliği kopmalarını tespit edebilen ve baz eksizyon onarımında rol oynayan bir nükleer DNA bağlayıcı proteindir. PARP apoptoz sırasında kaspaz tarafından parçalandığında, DNA onarım fonksiyonu bozulur. Bu nedenle, kesilmiş PARP Western blotlama analizinde apoptozun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır [71]. Western Blotlama sonucuna göre HuH-7'de kesilmiş PARP açısından ışık verilmiş ve verilmemiş duruma göre bir farklılık gözlenmemiş iken HeLa ve MCF-7 hücrelerinde *Pc5a*'nın ışık ile uyarılmasına bağlı olarak PARP kesiminin büyük ölçüde arttığı PARP (p89) bandının artışından görülmektedir (Şekil 5.6b) .

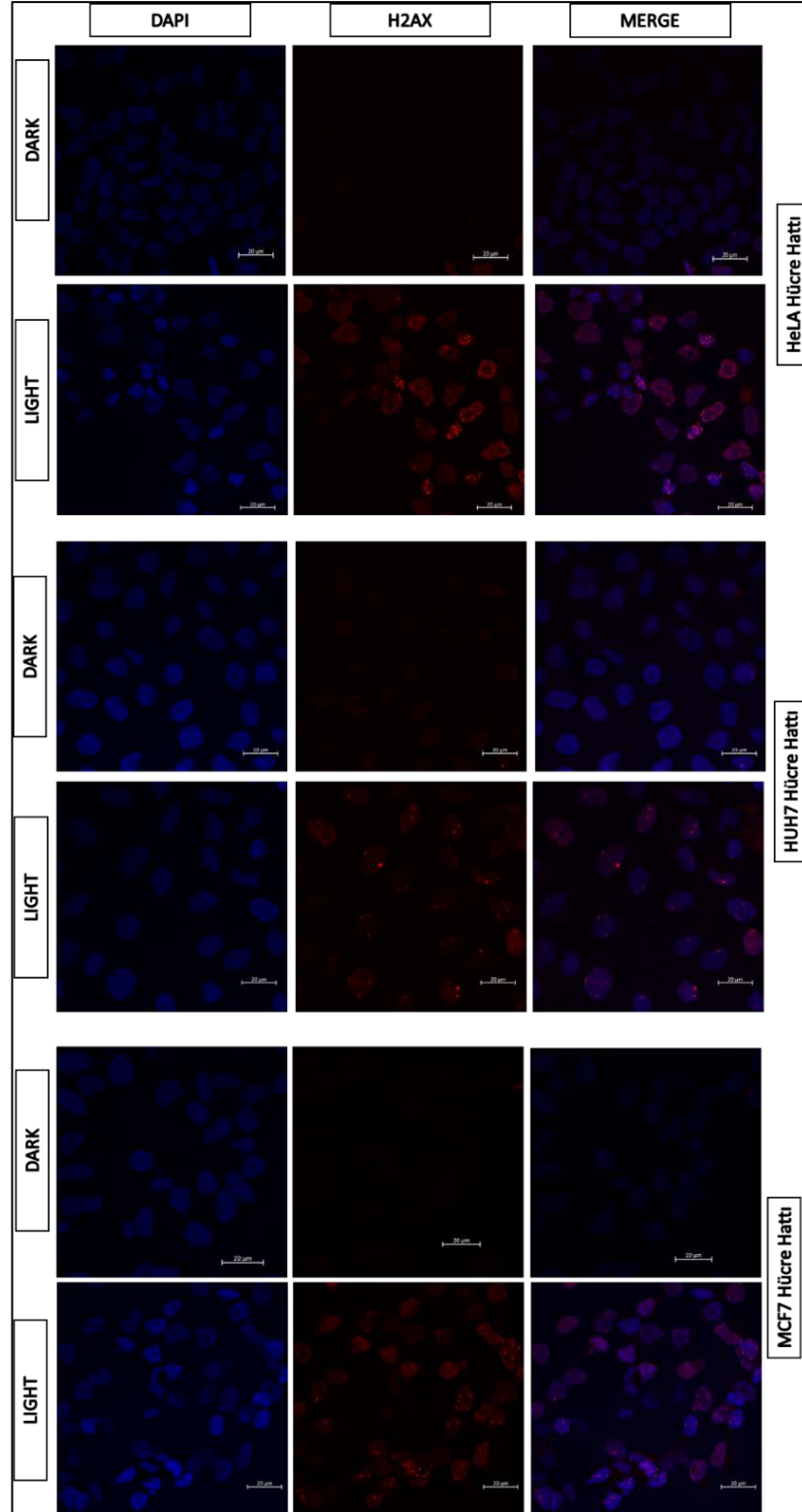


Şekil 5.6: *Pc5a*'nın apoptotik etkisinin akım sitometresi ve western blotlama ile gösterilmesi. A) HeLa ve HUH-7 hücre hatlarına 10 μ M *Pc5a* uygulandıktan 24 saat sonra bir grup 2 Jcm⁻² ışık ile uyarıldı. Bu işlemten 24 sonra hücre gruplarındaki apoptotik hücre oranı AnnexinV/7-ADD boyaması ile akım sitometresi kullanılarak gösterildi. B) HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerine 10 μ M *Pc5a* uygulandıktan 24 saat sonra bir grup 2 Jcm⁻² ışık ile uyarıldı. Bu işlemten 24 sonra elde edilen total hücre lizatlarında apoptoz analizi c-PARP kesimine dayanan western blotlama yöntemi ile analiz edildi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

Yeni sentezlenen ftalosiyanın türevi *Pc5a*'nın apoptotik etkisi hem akım sitometresi hem de western blotlama ile incelendiğinde özellikle HeLa ve MCF-7 üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Ftalosiyanın hücre-içi lokalizasyonlarına bağlı olarak etkilediği moleküllerin farklı oluşundan dolayı çalışmanın devamında DNA ve mitokondri üzerine etkileri de ayrıca incelendi.

5.6. Ftalosiyanin Türevinin DNA Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Hücrelere *Pc5a* uygulanmasından sonra hücrelerdeki DNA hasarı H2AX boyaması ile incelendi. DNA sarmalının her iki iplikciğinde meydana gelen kopmalar (DSB'ler) H2AX histon varyantının eklenmesi ile işaretlenmekte ve onarılmadan bırakılırsa, kromozom anormalliklerine, genomik instabiliteye veya hücre ölümüne yol açmaktadır. H2AX'ın fosforilasyonu hasar görmüş kromatin içeren bölgelerde DNA onarım proteinlerinin birleştirilmesi ve aktivasyonu için gereklidir. Dolayısıyla, nükleustaki H2AX varlığının saptanması DNA hasarının analizinde kullanılmaktadır [72, 73]. HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücre hatlarına 10 μ M *Pc5a* verildikten sonra ışık verildiği veya verilmediği durumda 24 saat sonra H2AX boyaması ile DNA hasarı analizi gerçekleştirildi (Şekil 5.7). HeLa ve MCF-7 hücrelerinde sadece ışık verildiği durumda H2AX boyaması gözlenmekte iken HuH-7 hücre hattında ışık verildiği durumda daha fazla H2AX boyaması bulunmasına karşılık ışık verilmediği durumda da hafifte olsa H2AX boyaması gözlenmektedir.

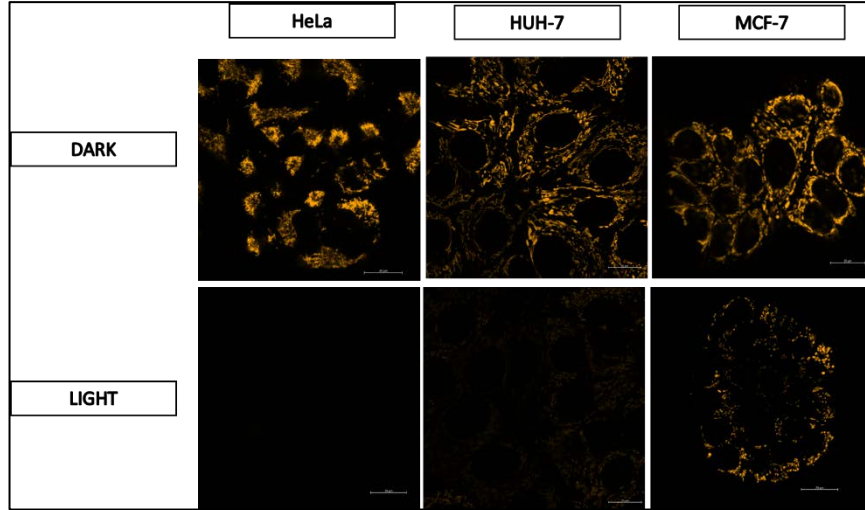


Şekil 5.7: *Pc5a* uygulanan hücrelerde H2AX boyaması. HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücrelerine 10 μ M *Pc5a* uygulaması yapıldıktan sonra light grup 2 Jcm⁻² ışığa maruz bırakıldı. Bu işlemin 24 saat ardından hücrelerde H2AX boyaması yapıldı ve konfokal mikroskobu ile görüntüldü. DAPI: 405 nm lazer ile uyarıldı ve 410-579 nm filtre aralığında görüntüldü. H2AX: 543 nm lazer ile uyarıldı ve 585-733 nm dalga boylarında görüntüldü.

Pc5a''nın sadece HuH-7 hücrelerinde ışık verilmediği durumda az bir miktar DNA hasarına sebep olduğu görülmesine karşın her 3 hücre hattında da ışık verildiği durumda belirgin ve karanlık duruma göre anlamlı bir DNA hasarına sebep olmaktadır.

5.7. Ftalosiyanın Türevinin Mitokondri Potansiyeli Üzerine Etkisinin Analizi

Ftalosiyanın türevlerinin ışık ile aktivasyonu sonucunda oluşan ROS'ların etkilediği önemli hücre-içi organellerden biri de mitokondridir. Mitokondri polaritesindeki değişimler TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) boyaması ile araştırılmaktadır. Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) mitokondriyal aktivitenin önemli bir göstergesidir, çünkü ATP üretiminin arkasındaki itici güç olan elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyon sürecini yansıtır. TMRE $\Delta\Psi_m$ ile ters orantılı olarak birikir, yani $\Delta\Psi_m$ ne kadar negatif yüklü olursa, TMRE o kadar fazla birikir. Bu da sağlıklı bir hücrenin daha fazla boya içereceği, apoptotik bir hücrenin ise daha az boya içereceği anlamına gelmektedir [74, 75]. HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücreleri 10 μ M *Pc5a* uygulandıktan sonra ışık ile uyarılma ve karanlık koşullarda mitokondri potansiyelindeki değişimler açısından TMRE boyası ile konfokal mikroskop kullanılarak incelendi (Şekil 5.8). TMRE boyamasının sonucuna göre HeLa ve MCF-7 hücrelerindeki mitokondri potansiyelinin HuH-7'ye göre daha yüksek olduğu aynı lazer ve filtre ayarları ile alınan görüntülerde daha parlak boyama ile anlaşıldı. Bununla birlikte her üç hücrede de ışık verilmemiş ve kontrol hücrelere göre ışık verildiği durumda mitokondri potansiyelinin anlamlı ölçüde azaldığı saptandı.



Şekil 5.8: *Pc5a* uygulanan hücrelerde TMRE boyaması. HeLa, HUH-7 ve MCF-7 hücrelerine 10 μM *Pc5a* uygulandıktan 24 saat sonra gruplardan biri 2 Jcm^{-2} ışığa maruz bırakıldı. Bu işlemten 24 saat sonra hücrelerin mitokondri polaritelerinin incelenmesi amacıyla hücrelere TMRE verildi ve 20 dk hücrelerin ekildiği lameller chamber glass'a aktarıldı ve konfokal mikroskobu ile fotoğraflandı. TMRE: 543 nm lazer ile uyarıldı ve 458/543 aralığında görüntülendi.

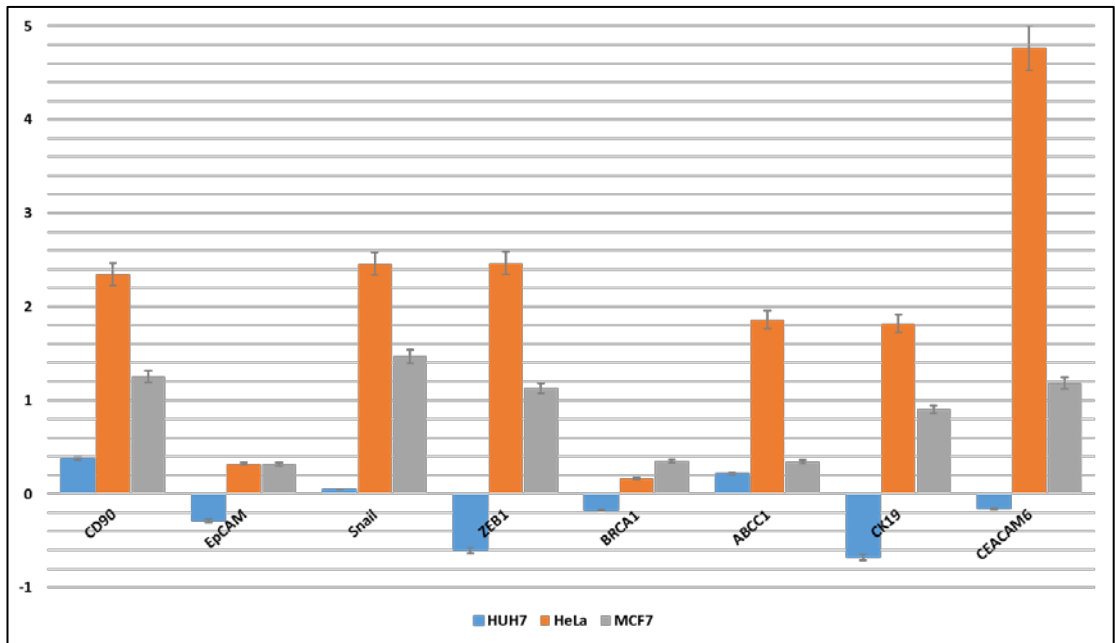
Mitokondri potansiyelinindeki değişimlerin TMRE boyaması ile analizi sonucuna göre *Pc5a*'nın hücre canlılığına mitokondri üzerinden de etki ettiği floresan boyanın daha zayıf olması ile saptandı. Ayrıca, HeLa hücrelerine uygulanan *Pc5a*'nın 2J ışık uyarısından sonra hücrelerin mitokondri potansiyellerinin neredeyse saptanamayacak seviyeye indirdiği açıkça görülmektedir.

Yeni sentezlenen ftalosiyanın türevinin farklı kanser hücrelerindeki apoptotik, DNA hasarı ve mitokondri potansiyeli üzerine etkilerinin farklı olduğunun anlaşılmasından sonra gen ve protein ifadesi düzeyindeki değişiklikler de son olarak incelenmiştir.

5.8. Ftalosiyanın Türevinin Gen İfadesi Üzerinden etkisinin Araştırılması

Son olarak *Pc5a*'nın HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücrelerine 10 μM dozunda uygulanmasının ardından ışık ile aktive olduğu durumda karanlık duruma göre hücrelerde değişen gen ifadesi incelendi. Kanser hücrelerinin heterojen yapıda olması ve hücre grubunun içerisinde mezenkimal özellikte ve kanser kök hücre benzeri özellikler taşıyan küçük bir grubun metastatik kapasite göstermesi ve tümör nüksü ile

ilişkilendirilmesinden dolayı sentezlenen ftalosiyasin türevinin bu küçük grup üzerine etkisi gen ifadesi düzeyinde analiz edildi. Bu analizlerde; EMT ve Kök Hücre Özelliği ile ilişkili genlerden *SNAIL*, *ZEB1*, *CK19*, *CD90* ve *EpCAM*, ilaç direnci ile ilişkili olan genlerden de *BRCA1*, *ABCC1* ve *CEACAM6* genlerinin ifadesi RT-qPCR ile incelendi (Şekil 5.9). *Pc5a*'nın uygulandığı HeLa ve MCF-7 hücrelerinde ışık verildiği durumda EMT ve Kök hücre özelliği ile ilişkili olan genlerin ifadesi artarken HuH-7 hücrelerinde ışık varlığında sadece *CD90* ve *SNAIL* ifadeleri artmakta buna karşın diğer genlerin ifadesi azalmaktadır. Bununla birlikte, yine HeLa ve MCF-7 hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifadesi artarken HuH-7'de sadece *ABCC1* ifadesi artmakta ve geri kalan genlerin ifadesi azalmaktadır.



Şekil 5.9: *Pc5a* uygulaması sonucunda HUH-7, HeLa ve MCF-7 hücrelerindeki EMT, Kök Hücre Özelliği ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifade analizi. 10 μ M *Pc5a* uygulanan hücrelerin 2Jcm⁻² ışık ile uyarıldığı ve uyarılmadığı durumlarda *CD90*, *EpCAM*, *Snail*, *ZEB1*, *BRCA1*, *ABCC1*, *CK19* ve *CEACAM6* gen ifadelerindeki değişikliklerin RT-qPCR ile karşılaştırılması. Gen ifadeleri *GAPDH*'a göre normalize edilerek ddCT metodu ile hesaplandı.

Gen ifadesi analiz sonuçlarına göre *Pc5a* hem HeLa hem de MCF-7 hücre hatlarında benzer bir profil sergilemekte ancak HuH-7 üzerindeki etkisi incelenen 8 genin 5'inde genel duruma göre ters bir profil göstermektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, hücrelerin genetik ve çevresel etmenlere bağlı olarak kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucunda ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır [10]. Kanserın görölme sıklığı ve mortalite oranları her yıl artış göstermekte olup dünya sağlık örgütü 2030 yılında dünya çapında 12 milyondan fazla kişinin kanser nedeni ile hayatını kaybedeceği öngörmektedir. Bundan dolayı özgül olarak kanser hücrelerini hedef alan etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik kapsamlı araştırmalar tüm hızıyla artarak devam etmektedir. Bu kapsamda yapılan araştırmaların bir kısmını radyasyon ve kemoterapi gibi konvansiyonel tedaviler oluştururken önemli bir kısmında da fotodinamik terapi (PDT) gibi farklı teknolojik yaklaşımlar ve hedefe-yönelik tedaviler yer almaktadır [2, 76, 77].

PDT bir fotosensörün (PS) zararsız bir ışık ile uyarılmasına bağlı olarak aktif hale gelmesi sonucunda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretilmesi ile kanser hücrelerinin öldürölmesine dayanan bir tedavi yöntemidir[2]. Bu tez çalışmasında PS olarak merkezinde silisyum atomu içeren, agregasyon eğilimleri düşük, singlet oksijen verimleri yüksek olan ftalosiyanın türevi Si(IV)Pc kullanılmıştır. Si(IV)Pc kanser tedavilerinde kullanılan klinik çalışmaları tamamlanmış ve ticari olarak satılan bir PDT ajanı olup fototoksitesitesi V79, MCF-7ve HUH-7 hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* düzeyde gösterilmiştir [58, 59, 78, 79]. Bununla birlikte PS'lere oligopeptitler ve amino asitler gibi küçük biyomoleküller eklenerek hücrelerdeki agregasyonunun azaltılması ve/veya kanser hücrelerinin hedeflenmesi sağlanabilmektedir [80]. Jia-Wen ve arkadaşları, Pc4'ü arjinin içeren oligopeptiler (Arg-Arg, Cys-Arg, ve Cys-Arg-Arg) ile konjuge ettikleri zaman sulu çözeltilerde agregasyonunun azaldığını, hem HepG2 hem de HeLa hücreleri tarafından alımının arttığını ve bu hücrelere karşı yüksek fotositotoksitesite sergilerdiklerini gösterdiler[81]. Buradan yola çıkarak Doç. Dr. Meltem Göksel Şahin'in laboratuvarında Si(IV)Pc'ye bir (Pc4a) ve iki tane (Pc5a) arjinin konjugasyonu ile elde edilen yeni ftalosiyanın türevlerinin anti-kanser etkinlikleri ve kanser tedavisinde PDT ajanı olarak kullanılabilirlikleri bu tez çalışmasında incelenmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar ile yeni sentezlenen ftalosiyanın türevlerinin farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu ve hücre

canlılığı üzerine etkisi incelendikten sonra daha ileri çalışmalar ile apoptotik etkisi, DNA hasarı ve mitokondri potansiyeli üzerindeki etkileri araştırıldı. Son olarak bu PDT ajanlarının ışık yokluğunda, ışık ile uyarıldığı duruma göre hücrelerde EMT-Kök hücre ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişiklikler mRNA düzeyinde ve hücre sağ kalımı üzerine etkisi de protein düzeyinde incelendi.

Öncelikle *Pc4a* ve *Pc5a*'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisi xCELLigence ile gerçek zamanlı olarak incelendi. Tek arjinin eklenmiş *Pc4a*'nın en yüksek konsantrasyon olan 10 μ M'da HuH-7 hücrelerinde ışık varlığında yaklaşık olarak %30 oranında hücre proliferasyonunu baskıladığı saptandı. Bununla birlikte HeLa hücrelerinde bu oran daha yüksek olmasına karşın iki arjinin içeren *Pc5a*'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin göreceli olarak çok daha yüksek olmasından dolayı çalışmanın devamında sadece *Pc5a* kullanıldı. Si(IV)Pc'ye çift arjinin eklenmesinin bu maddeye selektif bir avantaj sağladığı her 3 hücre hattında hücre proliferasyonunun daha etkin baskılanmasından anlaşılmaktadır.

Pc5a'nın hücre proliferasyonu üzerine etkisinin saptanmasından sonra hücre canlılığı üzerine etkisi de farklı konsantrasyonlarda ve ışık varlığı ile yokluğunda HeLa, HuH-7 ve MCF-7 hücre hatlarında koloni oluşumu temeline dayanan kristal viyole boyaması ile incelendi. HeLa ve MCF-7 hücrelerinde xCELLigence sonuçları ile tutarlı bir şekilde hücrelerin artan *Pc5a* konsantrasyonlarında ışık verildiğinde koloni oluşturma kapasitelerinin azaldığı saptandı. HuH-7 hücre hattında ise sadece 10 μ M konsantrasyonda hücrelerin canlılığında anlamlı bir azalma saptandı. Buraya kadar elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde *Pc5a*'nın her 3 hücre hattında farklı seviyelerde de olsa hücre proliferasyonu ile hücre canlılığını azalttığı görülmektedir. Ve yine her 3 hücre hattında da etkin olduğu doz olarak 10 μ M'lık konsantrasyon seçilmiş ve devam eden çalışmalarda bu doz kullanılmıştır.

Literatürde yer alan çalışmalarda PDT ajanının konsantrasyon ve lokalizasyonuna göre kanser hücrelerinde apoptoz ya da nekroz yollarını aktive ettiği gösterilmiştir [49]. Mfouo-Tynga ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada metaloftalosiyenin aracılı PDT'nin MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptotik hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir [82]. Bununla birlikte, benzer şekilde HCC ve serviks kanserlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da Ftalosiyenin aracılı PDT'nin apoptotik hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır [79, 83]. Tez çalışması kapsamında

karakterize edilen ftalosiyenin türevi Pc5a'nın meme, HCC ve serviks kanseri hücre hatlarında apoptotik etkisi incelendiğinde literatür ile uyumlu bir şekilde erken ve geç apoptotik grup olarak tanımlanan AnnexinV⁺/7AAD⁻ ile AnnexinV⁺/7AAD⁺ hücre sayılarının arttığı saptandı. Bununla birlikte, apoptoz analizi sırasında HuH-7 HCC hücre hattında ışık verilmediği durumda da apoptotik yüzdenin göreceli olarak yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum, aynı zamanda DNA hasarı ve mitokondri potansiyeli analizlerinde de ayrıca görüldü. Hücrelerin apoptoz yolağı ile öldüğünün saptanmasında kullanılan diğer bir yöntem olan PARP kesimi sonuçları da Pc5a'nın apoptoz yolağı üzerinden hücre ölümüne sebep olduğunu doğrulamaktadır.

PS'ler hücre-içi lokalizasyonlarına göre ışıkla aktive hale geldikten sonra ürettikleri ROS'lar ile çevrelerindeki makromolekülleri etkilemektedir. PDT'nin DNA hasarı ve mitokondri potansiyeli üzerine etkisine dair literatür de çalışmalar bulunmaktadır [84-89]. Meme, Serviks ve HCC kanserlerinde sırasıyla sülfonlanmış çinko ftalosiyenin (ZnPcSmix), beta-karbolin türevli ve indosiyonin yeşili aracılı PDT'ler sonucunda hücrelerde hücre canlılığı üzerine olan etkinin yanında DNA hasarının da olduğu rapor edilmiştir [84, 86, 87]. H2AX'ın fosforilasyonu hasar görmüş kromatin içeren bölgelerde DNA onarım proteinlerinin birleştirilmesi ve aktivasyonu için gereklidir [90]. Bu yeni sentezlenen ftalosiyenin türevi Pc5a'nın da her 3 hücrede de farklı seviyelerde DNA hasarına neden olduğu konfokal mikroskop kullanılarak hücrelerin nükleuslarında daha fazla H2AX sinyalinin kaydedilmesi ile gösterilmiştir. Özellikle HeLa hücrelerinde diğer iki kanser hücre hattına oranla DNA hasarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

PDT'nin mitokondri potansiyelini azalttığına dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır. HCC'de ftalosiyenin ışık ile uyarılmasından sonra apoptozun efektörlerinden olan caspase-3 aktivasyonunun arttığı ve mitokondri potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) azaldığı gösterilmiştir [79]. Diğer bir çalışmada, PDT ajanı olarak kullanılan veterpofin'nin mitokondride lokalize olduğunu ve singlet oksijen türevlerinin oluşumu ile mitokondri membran potansiyelini azalttığı saptanmıştır [91]. Bu tez çalışmasında da Pc5a'nın mitokondri potansiyeli üzerindeki etkisi mitokondri potansiyeli ile doğru orantılı olarak mitokondrilerde biriken TMRE boyaması ile incelendi. Yapılan TMRE boyaması sonucunda, Pc5a'nın uygulandığı her 3 hücre grubunda da ışık varlığında boyamanın yani mitokondri potansiyelinin azaldığı

saptandı. Bununla birlikte, *Pc5a*'nın özellikle HeLa hücrelerinin mitokondri potansiyelini büyük ölçüde azalttığı hatta tamamiyle durdurduğu gösterilmiştir.

Pc5a'nın Meme, HCC ve Serviks kanseri hücrelerine uygulanmasından sonra EMT-Kök hücre özelliği ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişiklikler RT-qPCR yöntemi ile mRNA düzeyinde incelendi. Bu kapsamda ilginç sayılabilecek sonuçlar elde edildi. Yakın zamanda Zhang ve Weinberg'in yayınladıkları derleme makalesinde konvansiyonel olarak kullanılan birçok kemoterapi ajanının tümör kitlesindeki kanser kök hücre özelliği göstermeyen büyük bir hücre grubunu hedef aldığı ancak metastaz ve tümör nüksü ile ilişkilendirilen mezenkimal hücre özelliğindeki kanser kök hücre grubunu etkilemediği belirtilmektedir [92]. Buradan yola çıkarak, *Pc5a*'nın hücrelere uygulanmasından sonra geriye kalan hücrelerin direnç kazanması ya da yeni sentezlenen ftalosiyanın türevleri ile dormant haldeki kanser kök hücre benzeri özellik gösteren mezenkimal hücre grubunu hedef alamaması ve/veya zenginleştirmesinden dolayı HeLa ve MCF-7 hücre hatlarında bu genlerin ifadesinde anlamlı bir artış saptandı. Buna karşın HuH-7 hücre hattında bu genlerden *CD90*, *SNAIL* ve *ABCC1* dışında kalan diğer genlerin ifadesi genel duruma göre azaldı. Bu durumun hücre tipinden ya da ftalosiyanın HCC hücre hattında etkileşime girdiği moleküllerin farklı olmasından kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.

Yapılan tüm bu çalışmalar ile yeni sentezlenen ftalosiyanın türevi *Pc5a*'nın meme, HCC ve serviks kanseri hücre hatlarına farklı seviyelerde de olsa benzer etkiler gösterdiği saptandı. Bununla birlikte, özellikle HeLa serviks kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu, canlılığını ve mitokondri potansiyelini önemli ölçüde düşürürken, bu hücrelerde DNA hasarı ve apoptozu arttırdığı açıkça görülmektedir. Sonuç olarak, kadınlarda en sık görülen dördüncü kanser türü olan serviks kanserinde bu ftalosiyanın türevinin etkinliği *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiş olup, gen ifadesi sonuçları da göz önüne alındığında, *Pc5a*'nın serviks kanseri tedavisinde PDT ajanı olarak tek başına veya metastatik hücreleri de hedef alan başka tedavilerle kombinasyonunun pre-klinik olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Chen Q., Chen M., Liu Z., (2019), "Local biomaterials-assisted cancer immunotherapy to trigger systemic antitumor responses", *Chemical Society Reviews*, 48 (22), 5506-5526.
- [2] Stepp H., (2003), "Principles of clinical photodynamic therapy", *Acta Endoscopica*, 33 (4).
- [3] Kessel D., (2019), "Photodynamic Therapy: A Brief History", *Journal of Clinical Medicine*, 8 (10), 1581.
- [4] Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P., (2007), "Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1776 (1), 86-107.
- [5] Zhang P., Steelant W., Kumar M., Scholfield M., (2007), "Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation", *Journal of the American Chemical Society*, 129 (15), 4526-4527.
- [6] Brown S., (2008), "Two photons are better than one", *Nature Photonics*, 2 (7), 394-395.
- [7] Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C. J., Sibata C. H., (2004), "Photosensitizers in clinical PDT", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1 (1), 27-42.
- [8] Boutin C., Schlessner M., Frenay C., Astoul P., (1998), "Malignant pleural mesothelioma", *European Respiratory Journal*, 12 (4), 972-981.
- [9] Sharman W. M., Allen C. M., Van Lier J. E., (1999), "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications", *Drug discovery today*, 4 (11), 507-517.
- [10] Ferguson L. R., Chen H., Collins A. R., Connell M., Damia G., Dasgupta S., Malhotra M., Meeker A. K., Amedei A., Amin A., (2015). "Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition", *Seminars in cancer biology*, S5-S24.
- [11] Lichtenstein P., Holm N. V., Verkasalo P. K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminki K., (2000), "Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland", *New England journal of medicine*, 343 (2), 78-85.

- [12] Anand P., Kunnumakara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., Sung B., Aggarwal B. B., (2008), "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes", *Pharmaceutical research*, 25 (9), 2097-2116.
- [13] Kalluri R., Weinberg R. A., (2009), "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *The Journal of clinical investigation*, 119 (6), 1420-1428.
- [14] Cooper G. M., Hausman R. E., (2000), "The development and causes of cancer", *The cell: A molecular approach*, 725-766.
- [15] Hoadley K. A., Yau C., Hinoue T., Wolf D. M., Lazar A. J., Drill E., Shen R., Taylor A. M., Cherniack A. D., Thorsson V., (2018), "Cell-of-origin patterns dominate the molecular classification of 10,000 tumors from 33 types of cancer", *cell*, 173 (2), 291-304. e296.
- [16] Lemoine N. K., Nicholas R., (2001), "Progress in pathology", London: Greenwich Medical Media, 52.
- [17] Yang J., Ren Z., Du X., Hao M., Zhou W., (2014), "The role of mesenchymal stem/progenitor cells in sarcoma: update and dispute", *Stem cell investigation*, 1.
- [18] Tobias J. S., Hochhauser D., Souhami R. L., (2010), "Cancer and its management", Edition, Wiley Online Library.
- [19] Gosling P., (2003), "Dorland's Illustrated Medical Dictionary", *Australasian Chiropractic & Osteopathy*, 11 (2), 65.
- [20] Varricchio C. G., Ades T. B., Hinds P. S., (2004), "A cancer source book for nurses", Edition, Jones & Bartlett Learning.
- [21] Bailey M. H., Tokheim C., Porta-Pardo E., Sengupta S., Bertrand D., Weerasinghe A., Colaprico A., Wendl M. C., Kim J., Reardon B., (2018), "Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations", *cell*, 173 (2), 371-385. e318.
- [22] Hanahan D., Weinberg R. A., (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *cell*, 144 (5), 646-674.
- [23] Weinberg R., Hanahan D., (2000), "The hallmarks of cancer", *cell*, 100 (1), 57-70.
- [24] Hanahan D., Weinberg R. A., (2000), "The hallmarks of cancer", *cell*, 100 (1), 57-70.

- [25] Evan G. I., Vousden K. H., (2001), "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer", *Nature*, 411 (6835), 342.
- [26] McClatchey A. I., Yap A. S., (2012), "Contact inhibition (of proliferation) redux", *Current opinion in cell biology*, 24 (5), 685-694.
- [27] Elmore S., (2007), "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516.
- [28] Bergers G., Benjamin L. E., (2003), "Tumorigenesis and the angiogenic switch", *Nature reviews cancer*, 3 (6), 401-410.
- [29] Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F., (2018), "Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018)", *International Agency for Research on Cancer (IARC) Cancer Base* (15), 2018.
- [30] Nagai H., Kim Y. H., (2017), "Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns", *Journal of thoracic disease*, 9 (3), 448.
- [31] Holland J. F., Pollock R. E., (2010), "Holland-Frei cancer medicine 8", Edition, PMPH-USA.
- [32] Bomford C., Kunkler I., (2015), "Walter and Miller's Textbook of Radiation therapy , p311".
- [33] Prince J. M., Crowther D., McMorran S., Youngmin S., Wacogne I., Pleat J., (2015), "Clive." tumour radiosensitivity–General Practice Notebook", Archived from the original on, 24.
- [34] Lind M., (2008), "Principles of cytotoxic chemotherapy", *Medicine*, 36 (1), 19-23.
- [35] Waldmann T. A., (2003), "Immunotherapy: past, present and future", *Nature medicine*, 9 (3), 269-277.
- [36] Espinoza-Sánchez N. A., Götte M., (2020). "Role of cell surface proteoglycans in cancer immunotherapy", *Seminars in cancer biology*, 48-67.
- [37] Galluzzi L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.-M., Buqué A., Senovilla L., Baracco E. E., Bloy N., Castoldi F., Abastado J.-P., Agostinis P., (2014), "Classification of current anticancer immunotherapies", *Oncotarget*, 5 (24), 12472.
- [38] Chodon T., Koya R. C., Odunsi K., (2015), "Active immunotherapy of cancer", *Immunological investigations*, 44 (8), 817-836.

- [39] DeVita Jr V. T., Lawrence T., Rosenberg S. A., (2012), "Cancer: principles & practice of oncology: annual advances in oncology", Edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- [40] Traynor A., (1995), "Recent advances in hormonal therapy for cancer", *Current opinion in oncology*, 7 (6), 572-581.
- [41] Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K., (2003), "Photodynamic therapy for cancer", *Nature reviews cancer*, 3 (5), 380-387.
- [42] Chen J., Keltner L., Christophersen J., Zheng F., Krouse M., Singhal A., Wang S.-s., (2002), "New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy", *The Cancer Journal*, 8 (2), 154-163.
- [43] Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q., (1998), "Photodynamic therapy", *JNCI: Journal of the national cancer institute*, 90 (12), 889-905.
- [44] Rossi R., Mori M., Lotti T., (2007), "Actinic keratosis", *International journal of dermatology*, 46 (9), 895-904.
- [45] Zhang P., Huang H., Banerjee S., Clarkson G. J., Ge C., Imberti C., Sadler P. J., (2019), "Nucleus-Targeted Organoiridium–Albumin Conjugate for Photodynamic Cancer Therapy", *Angewandte Chemie International Edition*, 58 (8), 2350-2354.
- [46] Saini R., Lee N. V., Liu K. Y., Poh C. F., (2016), "Prospects in the application of photodynamic therapy in oral cancer and premalignant lesions", *Cancers*, 8 (9), 83.
- [47] Zhang Q., Li L., (2018), "Photodynamic combinational therapy in cancer treatment", *J. BUON*, 23 (3), 561-567.
- [48] Macdonald I. J., Dougherty T. J., (2001), "Basic principles of photodynamic therapy", *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5 (02), 105-129.
- [49] Robertson C. A., Evans D. H., Abrahamse H., (2009), "Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96 (1), 1-8.
- [50] Juzeniene A., Moan J., (2007), "The history of PDT in Norway: Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 4 (1), 3-11.
- [51] Dąbrowski J. M. (2017), "Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation". "Advances in Inorganic Chemistry", Elsevier.

- [52] Pazos M., Nader H. B., (2007), "Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40 (8), 1025-1035.
- [53] Hamblin M. R., Huang Y., (2013), "Handbook of photomedicine", Edition, Taylor & Francis.
- [54] Josefsen L. B., Boyle R. W., (2008), "Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers", *Metal-based drugs*, 2008.
- [55] Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T., (2009), "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects", *Lasers in medical science*, 24 (2), 259-268.
- [56] Ochsner M., (1996), "Light scattering of human skin: A comparison between zinc (II)—phthalocyanine and photofrin II®", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 32 (1-2), 3-9.
- [57] Wilson B. C., Patterson M. S., (2008), "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy", *Physics in Medicine & Biology*, 53 (9), R61.
- [58] Kenney M. E., Oleinick N. L., Rihter B. D., Li Y.-S., Phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy and methods for their use, in: (Ed.)^(Eds.), *Google Patents*, 1996, pp.
- [59] Maree M. D., Kuznetsova N., Nyokong T., (2001), "Silicon octaphenoxypthalocyanines: photostability and singlet oxygen quantum yields", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140 (2), 117-125.
- [60] Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L., (2003), "Necrosis: a specific form of programmed cell death?", *Experimental cell research*, 283 (1), 1-16.
- [61] Green D. R., (2011), "Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms", Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [62] Ketabchi A., MacRobert A., Speight P., Bennett J., (1998), "Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes", *Archives of oral biology*, 43 (2), 143-149.
- [63] Pan M., Peng Z.-h., Xiao S.-x., Ren J.-w., Liu Y., Li X.-l., Li Z.-x., (2008), "Apoptotic effect and mechanisms of AHPN on human skin malignant melanoma cell A375", *Journal of Nanjing Medical University*, 22 (1), 18-22.

- [64] MacCormack M. A., (2008). "Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes", *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 52-62.
- [65] Juzeniene A., Moan J., (2007), "The history of PDT in Norway: Part II. Recent advances in general PDT and ALA-PDT", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 4 (2), 80-87.
- [66] Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R., (2005), "Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2 (1), 1-23.
- [67] Tímár J., Mészáros L., Ladányi A., Puskás L., Rásó E., (2006), "Melanoma genomics reveals signatures of sensitivity to bio-and targeted therapies", *Cellular immunology*, 244 (2), 154-157.
- [68] Nowis D., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Jakóbisiak M., Gołąb J., (2005), "The influence of photodynamic therapy on the immune response", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2 (4), 283-298.
- [69] Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R., (2005), "Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2 (2), 91-106.
- [70] Schuitmaker J., Baas P., Van Leengoed H., Van der Meulen F., Star W., van Zandwijk N., (1996), "Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34 (1), 3-12.
- [71] Mullen P. (2004), "PARP cleavage as a means of assessing apoptosis". "Cancer Cell Culture", Springer.
- [72] Plappert-Helbig U., Libertini S., Frieauff W., Theil D., Martus H. J., (2019), "Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity in vivo", *Environmental and molecular mutagenesis*, 60 (1), 4-16.
- [73] Nagelkerke A., Span P. N. (2016), "Staining against phospho-H2AX (γ -H2AX) as a marker for DNA damage and genomic instability in cancer tissues and cells". "Tumor Microenvironment", Springer.
- [74] Crowley L. C., Christensen M. E., Waterhouse N. J., (2016), "Measuring mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining", *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016 (12), pdb. prot087361.
- [75] Barteneva N. S., Ponomarev E. D., Tsytsykova A., Armant M., Vorobjev I. A., (2014), "Mitochondrial staining allows robust elimination of apoptotic and

damaged cells during cell sorting", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62 (4), 265-275.

- [76] Yildizhan H., Barkan N. P., Turan S. K., Demiralp Ö., Demiralp F. D. Ö., Uslu B., Özkan S. A. (2018), "Treatment strategies in cancer from past to present". "Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems", Elsevier.
- [77] Guo C., Manjili M. H., Subjeck J. R., Sarkar D., Fisher P. B., Wang X.-Y. (2013), "Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future". "Advances in cancer research", Elsevier.
- [78] Xue L.-y., Chiu S.-m., Oleinick N. L., (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", *Experimental cell research*, 263 (1), 145-155.
- [79] Shao J., Xue J., Dai Y., Liu H., Chen N., Jia L., Huang J., (2012), "Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitizer PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest", *European Journal of cancer*, 48 (13), 2086-2096.
- [80] Iqbal Z., Chen J., Chen Z., Huang M., (2015), "Phthalocyanine-biomolecule conjugated photosensitizers for targeted photodynamic therapy and imaging", *Current drug metabolism*, 16 (9), 816-832.
- [81] Ying J. W., Sun Q., Yang L. F., Ke M. R., Huang J. D., (2020), "Synthesis, Spectroscopic Properties, and Photodynamic Anticancer Activities of Novel Arginine-modified Silicon (IV) Phthalocyanines", *Chinese Journal of Structural Chemistry* (1), 12.
- [82] Mfouo-Tynga I., Houreld N. N., Abrahamse H., (2014), "Induced cell death pathway post photodynamic therapy using a metallophthalocyanine photosensitizer in breast cancer cells", *Photomedicine and laser surgery*, 32 (4), 205-211.
- [83] Rello-Varona S., Stockert J. C., Cañete M., Acedo P., Villanueva Á., (2008), "Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn (II)-phthalocyanine", *International journal of oncology*, 32 (6), 1189-1196.
- [84] Hodgkinson N., Kruger C. A., Mokwena M., Abrahamse H., (2017), "Cervical cancer cells (HeLa) response to photodynamic therapy using a zinc phthalocyanine photosensitizer", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 177, 32-38.
- [85] Manisova B., Binder S., Malina L., Jiravova J., Langova K., Kolarova H., (2015), "Phthalocyanine-mediated Photodynamic Treatment of Tumoural and Non-tumoural cell lines", *Anticancer research*, 35 (7), 3943-3951.

- [86] Guan H., Liu X., Peng W., Cao R., Ma Y., Chen H., Xu A., (2006), " β -Carboline derivatives: Novel photosensitizers that intercalate into DNA to cause direct DNA damage in photodynamic therapy", *Biochemical and biophysical research communications*, 342 (3), 894-901.
- [87] Shirata C., Kaneko J., Inagaki Y., Kokudo T., Sato M., Kiritani S., Akamatsu N., Arita J., Sakamoto Y., Hasegawa K., (2017), "Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress", *Scientific reports*, 7 (1), 1-8.
- [88] Schwarz V., Hornung R., Fedier A., Fehr M., Walt H., Haller U., Fink D., (2002), "Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and-proficient tumour cells", *British journal of cancer*, 86 (7), 1130-1135.
- [89] Abo-Zeid M. A., Abo-Elfadl M. T., Mostafa S. M., (2018), "Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines", *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 21, 351-356.
- [90] Sedelnikova O. A., Pilch D. R., Redon C., Bonner W. M., (2003), "Histone H2AX in DNA damage and repair", *Cancer Biology and Therapy*, 2 (3), 233-235.
- [91] Mahalingam S. M., Ordaz J. D., Low P. S., (2018), "Targeting of a photosensitizer to the mitochondrion enhances the potency of photodynamic therapy", *ACS omega*, 3 (6), 6066-6074.
- [92] Zhang Y., Weinberg R. A., (2018), "Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities", *Frontiers of medicine*, 12 (4), 361-373.

ÖZGEÇMİŞ

Nazlı SALIK, 12 Kasım 1994’de Adıyaman’ın Gölbaşı ilçesinde doğdu. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitim süresi boyunca TÜBİTAK 1001 proje asistanı olarak çalıştı.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Salık, N., Ercin, PB., Ekineker, G., Göksel Şahin, M., Yağci, T. “New phthalocyanine derivatives for photodynamic cancer therapy “. 2020. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences.